

© 2024 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России
Поступила 05.12.2023
Принята к печати 08.04.2024



EDN: WGPSFP

Контактная информация:

Свешникова Анастасия Никитична,
д-р физ.-мат. наук, заведующая
лабораторией клеточной биологии и
трансляционной медицины ФГБУ «НМИЦ
ДГОИ им. Дмитрия Рогачева»
Минздрава России
Адрес: 117997, Москва,
ул. Саморы Машела, 1
E-mail: a.sveshnikova@physics.msu.ru

DOI: 10.24287/1726-1708-2024-23-2-222-230

Внутриклеточная сигнализация при феномене запрограммированной гибели нейтрофилов с появлением внеклеточных ДНК-ловушек при тромбообразовании

А.Н. Свешникова¹⁻³, Е.А. Адаманская^{1,3}, Ю.-Д.Д. Коробкина³, М.А. Пантелеев¹⁻³

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, Москва

²ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», Москва

³ФГБУН «Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии» РАН, Москва

Формирование внеклеточных ДНК-ловушек нейтрофилов (NET-оз) является важной составляющей многих патологических процессов, относящихся к областям современной гематологии, онкологии и иммунологии. Этот механизм запрограммированной клеточной смерти нейтрофилов и других лейкоцитов оказался вовлечен и в патогенез тромбозов и тромботических осложнений многих заболеваний. В данном обзоре мы рассматриваем пути внутриклеточной сигнализации, ведущие к активации нейтрофилов в условиях тромбоза и гемостаза. Несмотря на то, что биохимические реакции в клетке изучены достаточно хорошо, в NET-оз оказываются вовлечены такие специфические белки, как NADPH-оксидаза (NOX) и пептидил-аргинин деиминаза (PAD4), регуляция активности которых изучена недостаточно. Отдельно рассматриваются существующие подходы к фармакологической модуляции NET-оза.

Ключевые слова: нейтрофилы, ДНК-ловушки, внутриклеточная сигнализация, тромбозы

Свешникова А.Н. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2024; 23 (2): 222–30. DOI: 10.24287/1726-1708-2024-23-2-222-230

© 2024 by «D. Rogachev NMRCPHO»

Received 05.12.2023

Accepted 08.04.2024

Intracellular signaling involved in the programmed neutrophil cell death leading to the release of extracellular DNA traps in thrombus formation

A.N. Sveshnikova¹⁻³, E.A. Adamanskaya^{1,3}, Yu.-D.D. Korobkina³, M.A. Pantelev¹⁻³

¹Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology of Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow

²M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow

³Center for Theoretical Problems of Physical and Chemical Pharmacology, Russian Academy of Sciences, Moscow

The formation of extracellular DNA traps by neutrophils, or NETs (neutrophil extracellular traps) plays an essential role in many pathological processes related to hematological, oncological, and immunological diseases. This mechanism of the programmed cell death of neutrophils and other leukocytes appears to be also involved in the pathogenesis of thrombosis and thrombotic complications of a variety of disorders. In this review, we discuss the pathways of intracellular signaling leading to neutrophil activation in thrombosis and hemostasis. Even though the biochemical reactions in a cell are quite well investigated, the regulation of activity of specific proteins involved in NETosis, such as NADPH oxidase (NOX) and protein-arginine deiminase (PAD4), requires further investigation. Current approaches to the pharmacological modulation of NETosis are also specifically addressed here.

Key words: neutrophils, DNA traps, intracellular signaling, thrombosis

Sveshnikova A.N., et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology 2024; 23 (2): 222–30.

DOI: 10.24287/1726-1708-2024-23-2-222-230

Correspondence:
Anastasia N. Sveshnikova,
Dr. Sci. in Physics and Mathematics, Head
of the Laboratory of Cellular Biology
and Translational Medicine of the Dmitry
Rogachev National Medical Research Center
of Pediatric Hematology, Oncology
and Immunology, Ministry of Healthcare
of the Russian Federation
Address: 1 Samory Mashela St.,
Moscow 117997, Russia
E-mail: a.sveshnikova@physics.msu.ru

Внеклеточные ДНК-ловушки (neutrophil extracellular traps, NETs) – «выбрасываемые» активированными нейтрофилами отрицательно заряженные нити ДНК с ассоциированными с ними активными ферментами нейтрофилов (рисунки 1А) – представляют собой результат гиперактивации нейтрофилов при выполнении их функций. Формирование NETs (NET-оз) имеет и патологическую сторону: оно сопровождается любой тромботической процесс, в ряде случаев являясь его причиной [1]. NETs также считаются важной патогенной частью микроокружения опухоли и сопровождают рак-ассоциированный тромбоз [2]. В частности, при раке

молочной железы происходит значительное повышение доли нейтрофилов, переходящих в NET-оз [3] (рисунки 1Б). При этом, возможно, именно активированные тромбоциты являются индукторами NET-оза в окрестности опухоли [4]. При избыточной активации нейтрофилов в месте воспаления сосудистого эндотелия сети приходят в контакт с циркулирующей кровью и вызывают тромбообразование по внутреннему пути свертывания крови [5], что приводит, в частности, к венозным тромбозам [6].

Настоящий обзор посвящен одному из наиболее плохо изученных аспектов NET-оза – внутриклеточной сигнализации, управляющей происходящей

Рисунок 1

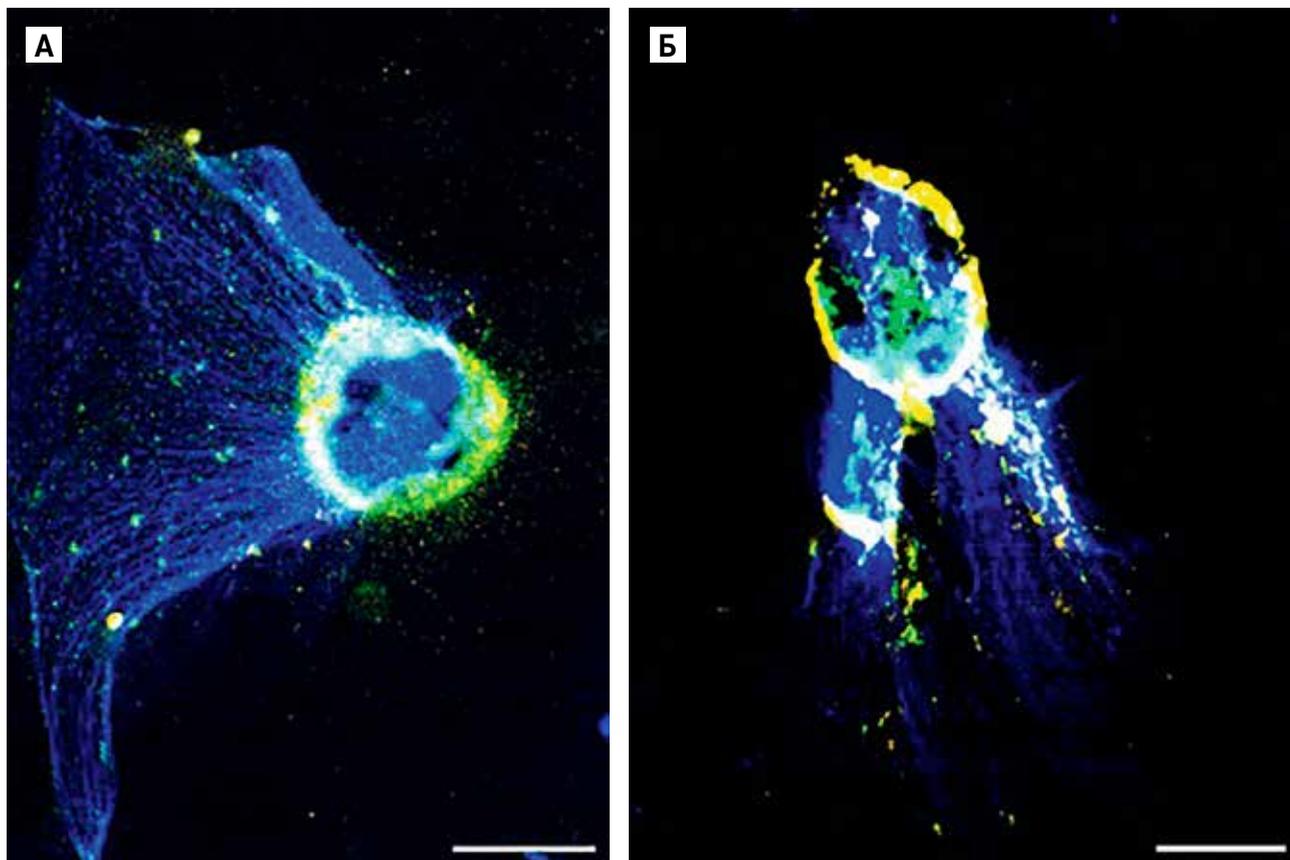
Конфокальная микроскопия PFA-фиксированных гранулоцитов (адаптировано из [3])

Синий цвет – ДНК (окраска Hoechst33342); зеленый цвет – миелопероксидаза (MPO); желтый цвет – эластаза (Ela; окраска флуоресцентно-мечеными антителами). Масштабный отрезок 10 мкм. А – типичный нейтрофил здорового донора, испытавший суицидальный NET-оз, можно видеть покрытые ферментами нити ДНК, выходящие за пределы мембраны клетки; Б – типичный NET-озный нейтрофил пациента с раком молочной железы

Figure 1

Confocal microscopy of PFA-fixed granulocytes (adapted from [3])

DNA is represented in blue (Hoechst33342 dye), myeloperoxidase (MPO) in green, and elastase (Ela) in yellow (a fluorescent antibody stain). Scale bar is 10 μ m. A, a typical neutrophil from a healthy donor undergoing suicidal NETosis: there are DNA strands coated with enzymes extending beyond the cell membrane; B, a typical NETotic neutrophil from a patient with breast cancer



в ситуации тромбообразования активацией нейтрофилов, и пути перехода в состояние гиперактивации, сопровождающееся NET-озом.

Условия возникновения ДНК-ловушек нейтрофилов

Нейтрофилы, или сегментоядерные лейкоциты, являются первой линией защиты организма от патогенов, осуществляемой за счет фагоцитоза и дегрануляции [7, 8]. В месте воспаления нейтрофилы оказываются благодаря их способности двигаться против градиента хемоаттрактантов [9], выделяемых другими клетками, бактериями, активированными тромбоцитами или самими нейтрофилами [10]. В случае воспаления или повреждения сосудистого эндотелия тромбоциты быстро адгезируют к активированным эндотелиоцитам или белкам межклеточного матрикса и образуют тромб [11], что привлекает нейтрофилы [12], которые проникают в область раны, фагоцитируют бактерии и производят цитокины, которые привлекают другие лейкоциты [13].

В условиях тромбовоспаления или другой гиперактивации нейтрофилов наблюдается высвобождение NETs, характеризующихся появлением внеклеточной ДНК с ассоциированными с ней белками нейтрофилов – MPO, Ela, а также цитрулированными гистонами [12].

Классический вариант NET-оза, суицидальный, в экспериментах *in vitro* наблюдается при активации нейтрофилов PMA – химическим агентом, напрямую активирующим протеинкиназу C (PKC) [14]. Считается, что активная PKC приводит к активации NADPH-оксидазы (NOX) нейтрофилов, что ведет к высвобождению активных форм кислорода (ROS), опосредующих окисление гистонов и расплетение хроматина, а также разрушение мембран гранул и выход гранулярных ферментов в цитозоль [15]. Другой вариант NET-оза, витальный, характеризуется выбросом ДНК без гибели клеток, запускается липополисахаридами или цитокинами и не зависит от NOX и ROS [16]. Ключевым ферментом в витальном NET-озе считается деиминаза PAD4, в частности,

деимилирующая аргинин в гистонах, что приводит к расплетению ДНК [17].

Внутриклеточная сигнализация, приводящая к высвобождению миелопероксидазы и эластазы

В гранулах гранулоцитов хранятся несколько ферментов, обладающих противомикробными функциями [18]. На NETs в первую очередь обнаруживают два из них – Ela и MPO (рисунки 1) [19]. Нейтрофильная Ela является сериновой протеазой, она выходит из гранул при активации нейтрофила [20, 21] и может разрушать клеточную стенку бактерий [22, 23]. Дополнительно Ela действует на иммунный ответ, модифицируя иммуноглобулины и компоненты комплемента [24]. Регуляция деятельности Ela проводится несколькими эндогенными ингибиторами (например, альфа-1-антитрипсин (A1AT)), которые ограничивают чрезмерную активность Ela [22, 25].

При выполнении защитной функции нейтрофильная Ela может вносить вклад и в патогенез таких заболеваний, как муковисцидоз и хроническая обструктивная болезнь легких [22, 26]. Проявляется это за счет чрезмерного выделения Ela, несущего за собой повреждение тканей организма и продуцирование воспаления. В связи с этим ингибиторы Ela рассматриваются как возможные средства лечения воспалительных и аутоиммунных заболеваний [27].

MPO – фермент нейтрофильных лизосом, является катализатором превращения перекиси водорода в хлорноватистую кислоту (HOCl) [28]. HOCl является достаточно мощным окислителем, уничтожающим бактерии, вирусы и иные патогены. Подобно Ela MPO играет важную роль в иммунном ответе организма, а чрезмерная активность этого фермента способствует повреждению тканей и развитию заболеваний. Хотя Ela и MPO выполняют разные функции, они могут регулировать активность друг друга. Так, Ela за счет расщепления пропептида активирует MPO, а MPO, окисляя остатки цистеина на ней, инактивирует Ela [29]. Тем не менее Ela, скорее, важна для антибактериальной активности NETs, нежели для регуляции их формирования. У мышей, не имеющих Ela, формирование NETs идет нормально как в ответ на стандартные агонисты, так и при тромбозе [30].

Состояние нейтрофилов в крови здорового человека называется «спящим состоянием» [31]. При появлении медиаторов воспаления нейтрофилы переходят в состояние «роллинга» – качения по эндотелию, заканчивающегося их экстравазацией к очагу воспаления. Основными медиаторами этого процесса являются интерлейкин-8 (IL-8), фактор активации тромбоцитов (PAF), лейкотриен B4 (LTB4), компонент комплемента C5a и др. [32]. Это означает, что классические хемоаттрактанты инициируют активацию нейтрофилов, достаточную для перестройки цитоске-

лета, – действительно, рецепторы ко всем перечисленным медиаторам, как и классические рецепторы к хемоаттрактантам (СХС-рецепторы), являются ассоциированными с G-белками рецепторами преимущественно Gi-типа [9]. Интересно, что сигнализация, вызываемая этими хемокинами – G $\beta\gamma$ -сигнализация, приводящая к слабой активации фосфолипазы C и PI3K γ , т. е. к кальциевой и фосфоинозитидной сигнализации, достаточна для перестройки цитоскелета и активации интегринов, необходимых для миграции и экстравазации нейтрофилов.

Однако внутриклеточная сигнализация изменяется при встрече с возбудителем – нейтрофилы распознают так называемые молекулярные паттерны, ассоциированные с патогенами (PAMP), обнаруженные в широком ряде микробов [33] через рецепторы распознавания образов на клеточной поверхности (PRR), такие как Toll-подобные рецепторы (TLR). Альтернативно нейтрофилы распознают опсонизированные иммуноглобулинами или компонентами комплемента чужеродные объекты или свои поврежденные клетки [21], используя рецепторы к иммуноглобулинам (FcR). Как PRR, так и FcR стимулируют фагоцитоз и активацию нейтрофила, приводящую к реакции, называемой «респираторный взрыв» [31]. При этом с фагосомой сливаются гранулы нейтрофилов, запуская к возбудителям антибактериальные пептиды и гидролазы, а на поверхности фагосомы активируется NOX, генерирующая супероксид-анион, далее преобразуемый в перекись водорода и гидроксильный радикал. Содержащаяся в гранулах MPO на их основе уже делает HOCl, разрушающую возбудителей. Интересно, что хемоаттрактанты нейтрофилов, действовавшие на первой стадии, обладают эффектом «праймирования»: в их отсутствии активация NOX происходит на порядок слабее [31].

Внутриклеточная сигнализация, приводящая к активации PAD4

Механизмы активации PAD4 до сих пор подлежат дискуссии [34], однако известно, что она опосредована набором сигнальных путей: ядерный фактор κ B (NF- κ B) и фактор, индуцируемый гипоксией (HIF-1 α) [35–38]. Отдельным вопросом является действие ионов кальция [39, 40]. С одной стороны, PAD4 содержит 5 сайтов связывания кальция, из которых 2 регулируют ее каталитическую активность, однако *in vitro* измеренная аффинность этих сайтов к кальцию составляет 5–10 мМ [41, 42], что на много порядков превышает встречающуюся в клетке. Кальций-зависимый NET-оз, симулируемый кальциевыми ионофорами, является PAD4-зависимым, однако в настоящем обзоре мы его рассматриваем как вариант суицидального NET-оза [43]. При встречающейся в

организме активации, как было описано выше, кальциевая сигнализация может запускаться при активации фосфолипазы C в результате G-белковой (цитокины) либо тирозинкиназной (иммуноглобулины) сигнализации [44]. В обоих случаях концентрация кальция не превышает 1 мкМ, что недостаточно для активации PAD4. Таким образом, сейчас рассматриваются дополнительные пути активации PAD4 [34]. Интересно, что PAD4 требует основной среды для реализации своей активности, а присутствие ROS ее ингибирует [45], в то время как восстановленный глутатион, наоборот, активирует [46].

Внутриклеточная регуляция перехода нейтрофила в NET-оз

Разберем последовательно внутриклеточные сигнальные события, ведущие к NET-озу при тромбозе. В данном случае мы не рассматриваем процессы, вызванные химическими агентами – кальциевыми ионофорами или PMA. В этом случае первична активация нейтрофила, вызываемая хемоаттрактантами через их рецепторы [31] (рисунки 2). Происходящие процессы можно разделить на 3 основных пути: активация через ассоциированные с G-белками рецепторы, активация через рецепторы, ассоциированные с тирозинкиназами, а также NF-κB и MAPK-сигнализацию.

Первый путь – это активация через рецепторы, ассоциированные с G-белками, основными из которых являются CXCR-рецепторы (рисунки 2). В свете тромбоза актуальны рецепторы CXCR1 и CXCR2 нейтрофилов, активируемые хемокинами тромбоцитарного происхождения – IL-8 и NAP-2 [47], а также хемокинами из других клеток иммунной системы и активированными или погибшими эндотелиоцитами [48]. Эти рецепторы ассоциированы с белками Gi и G₁₂ и запускают кальциевую и фосфоинозитидную сигнализацию, в первую очередь по Gβγ-пути. Кроме Rho-зависимой перестройки цитоскелета и поляризации клетки данной сигнализацией управляется активация малых растворимых GTP-аз Ras-семейства [49]. Хотя этой сигнализации недостаточно для полноценной активации PKC или генерации ROS митохондриями, она приводит к так называемому праймингу нейтрофилов, к дальнейшей активации [31]. Сочетание кальциевой и фосфоинозитидной сигнализации также приводит к секреции гранул [50]. Кроме того, дегрануляцию и активацию нейтрофилов при тромбозе может регулировать тромбин через ассоциированные с Gq рецепторы PAR-1, вызывающие кальциевую сигнализацию [51]. Существует мнение, что в G-белковой сигнализации также запускается MAPK-киназный каскад [52], конкретно киназы p38 и ERK, регулирующие экспрессию множества генов и запускающие, в частности, путь NF-κB [53]. Однако

окислительный стресс сам по себе является достаточно сильным активатором p38 [54], поэтому при активации нейтрофила MAPK-каскад запускается несколькими путями.

Роль кальциевой сигнализации в NET-озе исследовалась хелаторами кальция. В работе A. Teijeira и соавт. [55] продемонстрировано, что для индукции NET-оза необходимо на порядок больше IL-8, чем для индукции хемотаксиса нейтрофилов, при этом наблюдаемый суицидальный NET-оз успешно блокировался хелаторами кальция, что полностью согласуется с гипотезой PKC-зависимой активации.

Отдельным недавно выявленным феноменом является действие протеинкиназы A (PKA). Как отмечалось выше, активация NOX требует прайминга, который состоит в связывании цитозольных субъединиц NOX с мембранными субъединицами. Недавно было показано, что PKA-зависимое фосфорилирование мембранных субъединиц предотвращает активацию NOX PKC [56]. Многие рецепторы к цитокинам, в частности CXCR1 и CXCR2, активируют Gi-сигнализацию, в ходе которой ингибируется производство cAMP, а следовательно, снимается PKA-барьер на активации NOX. С точки зрения фармакологического воздействия на NET-оз это означает, что можно использовать увеличивающую концентрацию cAMP воздействие, например, ингибиторы фосфодиэстераз. Также адреналин оказывает ингибиторное воздействие на NET-оз, возможно, благодаря повышению содержания cAMP в результате активации β-адренорецепторов [57].

Второй набор путей внутриклеточной сигнализации, вызывающий активацию нейтрофилов, – это тирозинкиназная сигнализация (рисунки 2). В нейтрофилах, как и в тромбоцитах, основной тирозинкиназой считается Syk [44], хотя для тирозинкиназ характерен каскад взаимной активации и ингибирования. Классическими запускающими тирозинкиназную сигнализацию рецепторами нейтрофилов считаются интегрины, подающие сигнал снаружи-внутри (outside-in) при связывании мультивалентных лигандов [58]. Через интегрины нейтрофилы взаимодействуют как с тромбоцитами, так и с клетками эндотелия. Кроме того, Syk-опосредованную сигнализацию вызывает содержащий ITAM-последовательность PSGL-рецептор нейтрофилов [59], отвечающий за взаимодействие как с тромбоцитами, так и с эндотелием. Тирозинкиназная сигнализация приводит к сборке LAT-сигнаლოსомы [59, 60], в рамках которой происходит активация как PI3K (фосфоинозитидная сигнализация), так и PLC (кальциевая сигнализация), т. е. внутриклеточная сигнализация аналогична цитокиновой. Отличие состоит в том, что через сигнаლოსому активируется более стабильная изоформа β PI3K, в то время как в Gβγ-пути происходит акти-

вазия изоформы γ , в результате в тирозинкиназном пути происходит активация сериновой протеинкиназы Akt, фосфорилирующей множество мишеней в клетке [61], в том числе путь NF- κ B. К рецепторам, ассоциированным с тирозинкиназами, также относятся ITAM-содержащие Fc-рецепторы, активируемые при фагоцитозе опсонизированных антителами мишеней [52]. Syk-зависимая активация PKC опосредуется именно активацией кальциевой сигнализации в результате фосфорилирования PLC γ в LAT-сигнальномosome.

Третьей группой рецепторов, вызывающих активацию нейтрофилов, являются рецепторы, активирующие путь NF- κ B, в первую очередь TLR, особенно TLR-4, реагирующий на липополисахариды клеточной стенки грамотрицательных бактерий [62]. В предположении тромбоза, не связанного с бактериальным заражением, у TLR4 также есть активатор – белок HMGB1, секретируемый активированными тромбоцитами [63]. Аналогичная сигнализация также вызывается рецептором к фактору некроза опухоли- α [64]. Так как сигнализация NF- κ B в первую очередь регулирует секрецию гранул [65] и изменение экспрессии генов, то можно предположить, что возникновение NET-оза в ответ на запуск данной сигнализации является вторичным процессом: синтезируемые в ответ цитокины аутокринно активируют кальциевую сигнализацию в нейтрофиле [66, 67].

Роль перестройки цитоскелета в NET-озе

Существует ряд работ, указывающих на важную роль перестроек актинового цитоскелета в NET-озе. Актин, один из основных компонентов актинового цитоскелета, имеет 2 формы: мономерную (G-актин) и филаментозную (F-актин) [68]. Многие клеточные функции, включая подвижность, деление и дегрануляцию клеток, контролируются актиновым цитоскелетом [68]. В исследовании H.R. Thiam и соавт. [17] было продемонстрировано, что процесс NET-оза начинается с диссоциации актинового цитоскелета. В работах K.D. Metzler и соавт. показано, что при стимуляции нейтрофилов опсонизированным *C. albicans* происходит диссоциация азуромы (комплекс нейтрофильных белков и цитоскелета [69]), что способствует выходу нейтрофильной Ela из гранул в цитозоль [70]. Нейтрофильная Ela способна расщеплять F-актин и останавливать его полимеризацию, что ведет к иммобилизации нейтрофила [70]. В других работах быстрая разборка F-актина также наблюдалась, когда NET-оз был индуцирован PMA и иономицином [17, 71].

В ряде других исследований было показано, что при различных видах стимуляции, таких как PMA, *C. albicans*, кристаллы моноурата натрия и липополисахариды, ингибирование динамики F-актина,

наоборот, препятствует формированию NETs [72]. Также было установлено, что ингибирование немышечного миозина II также блокирует NET-оз [73]. У пациентов с дефектами в актиновом цитоскелете NET-оз либо нарушен, либо полностью отсутствует, даже если продукция ROS и Ela находится в норме или превышает ее [73].

Таким образом, можно предположить, что либо роль актина может быть различной при различных активаторах и условиях эксперимента, либо актин играет динамическую роль в NET-озе. На динамическую роль актинового цитоскелета в NET-озе указывает исследование H.R. Thiam и соавт. [17]. В данной работе было продемонстрировано, что обработка PMA постепенно увеличивает полимеризацию актина в нейтрофилах. Она достигает пика через 60 мин, после чего постепенно снижается до исходного уровня к 180 мин.

На ранней стадии NET-оза полимеризация актина может потребоваться для транслокации в ядро киназ, фосфорилирующих ламины, что необходимо для разрыва ядерной оболочки [74]. Диссоциация кортикального актина требуется для разрыва плазматической мембраны, что необходимо на поздней стадии NET-оза для высвобождения NETs [17].

Дополнительные особенности перехода в NET-оз

Для переключения в суицидальный NET-оз «точкой принятия решения» можно считать уровень генерации ROS NOX и/или митохондриями. В нейтрофилах, как и в других клетках, существует мощная система антиоксидантной защиты, лимитирующая действие NOX фагосомами [75, 76]. Можно предположить, что, если эта система перегружена, то ROS начинают проникать в цитоплазму, разрушать гранулы и окислять гистоны, что и приводит к суицидальному NET-озу. Эта гипотеза подтверждается эффективным предотвращением NET-оза с помощью антиоксидантов [77, 78].

Есть точка зрения, что размер фагоцитируемого объекта влияет на переключение в NET-оз – если объект слишком большой, содержащие Ela гранулы сливаются с ядром, что приводит к деконденсации хроматина и NET-озу [79]. Однако исследованы случаи, когда мелкие микроорганизмы способны вызвать NET-оз. Происходит это в том случае, когда микроорганизму удается избежать фагоцитирующего действия нейтрофила [80]. Есть предположение, что вирулентные бактерии вызывают NET-оз, а умеренные – нет [81].

Стоит также отметить, что NET-оз не является проявлением апоптоза [82]. Аргументы включают как различия в морфологии – при апоптозе наблюдаются конденсация хроматина и сохранение

сегментной структуры ядра, без разрыва ядерной оболочки, органеллы не разрушены, в то время как при NET-озе разрушаются органеллы [82], так и реакцию на ингибирование апоптоза [77]. При этом при воздействии ультрафиолетового облучения нейтрофилы уходят в процесс, названный "ApoNETosis" – гибрид апоптоза и NET-оза, при котором происходят митохондриально-зависимое производство ROS и выход цитохрома С с одновременной активацией PAD4, возможно, зависящей от p38-МАРК-киназы [83].

Возможно, недостающим звеном в каскаде перехода нейтрофила в NET-оз является недавно открытый процесс, названный "transcriptional firing" («транскрипционная стрельба») [84] – процесс быстрой многоточечной транскрипции, запускаемый МАРК-киназами p38 и ERK в процессе NET-оза. Было показано, что ингибирование транскрипции пода-

вляет как витальный, так и суицидальный NET-оз, а также ApoNET-оз, вызываемый ультрафиолетом [83, 84].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Можно предположить, что управление NET-озом проходит в несколько стадий: первичная активация/прайминг нейтрофила хемокинами или иными агентами через G-белок-ассоциированные рецепторы (способствующая в том числе движению к очагу процесса), за которой следует полноценная индукция NET-оза через прямые межклеточные контакты с активированными тромбоцитами и активированным эндотелием, стимулирующие тирозин-киназные рецепторы. Можно предположить, что активация NET-оза при тромбозе может как минимум частично регулироваться путями, которые отличаются от

Рисунок 2

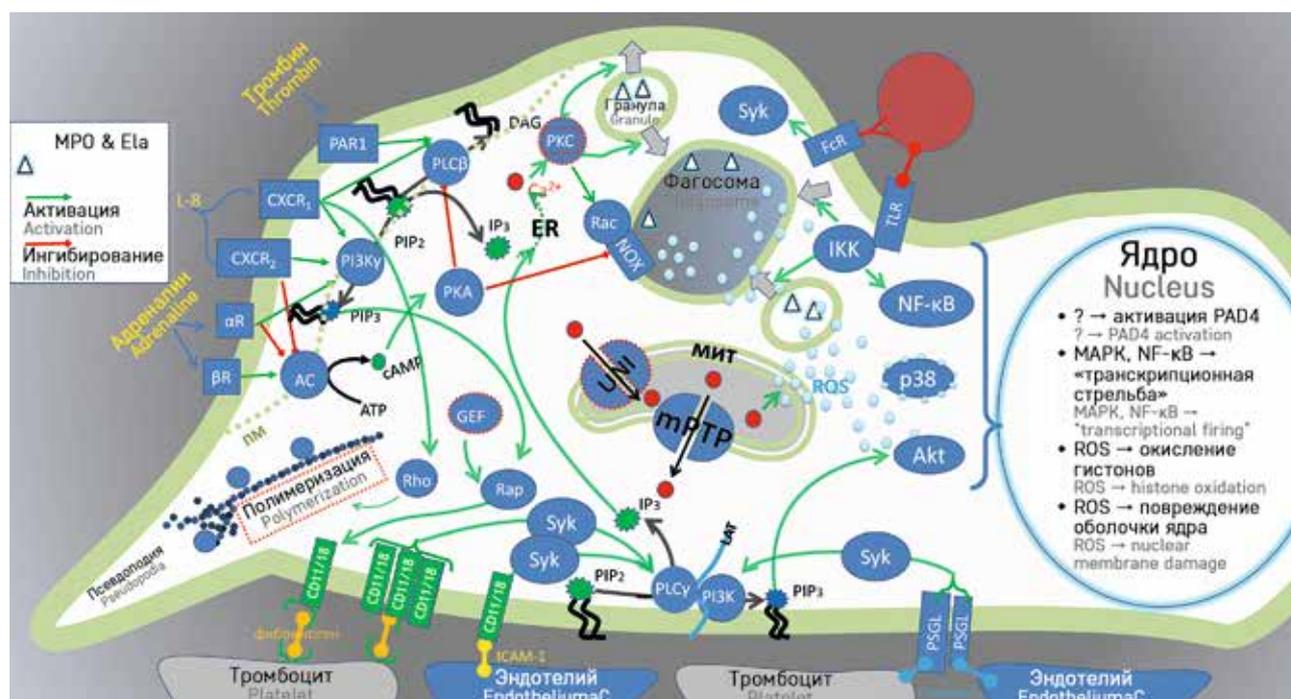
Схема путей внутриклеточной сигнализации, приводящих к активации NOX в нейтрофилах

Активация нейтрофила через рецепторы, ассоциированные с G-белками (на схеме CXCR1/2, PAR1 и рецепторы к адреналину), или через рецепторы, вызывающие тирозинкиназную сигнализацию (на схеме CD11/18, PSGL, Fc-рецептор), приводит к активации фосфолипазы С (PLC) и в большинстве случаев фосфоинозитид-3-киназы (PI3K). Эти ферменты запускают наработку 2 наиболее важных вторичных мессенджеров для активации нейтрофилов – кальция (красные кружки) и фосфоинозитид-3,4,5-трифосфата (PIP3). Хемотаксис, дегрануляция и активация NOX управляются либо одним, либо сразу обоими мессенджерами. Некоторые из известных кальций-чувствительных белков и процессов отображены красными точками; активация показана зелеными линиями; ингибирование – красными линиями. AC – аденилатциклаза; α R – α 2A-адренорецептор; β R – β 2-адренорецептор; GEF – кальций-диацилглицерол гуанодинотрифосфатный обменник I (CalDAGGEFI); DAG – диацилглицерол; ER – эндоплазматический ретикулум; IP3 – инозитол-1,4,5-трифосфат; мит – митохондрии; mPTP – митохондриальная пора; PAR – активируемый протеазой рецептор; PIP2 – фосфоинозитол-4,5-бисфосфат; UNI – митохондриальный унипортер

Figure 2

A schematic overview of intracellular signaling pathways leading to NADPH oxidase activation in neutrophils

Neutrophil activation through G protein coupled receptors (on the scheme: CXCR1/2, PAR1, and adrenaline receptors) or through receptors inducing tyrosine kinase signaling (on the scheme: CD11/18, PSGL, Fc receptor) leads to an activation of phospholipase C (PLC) and, in the majority of cases, phosphoinositide 3-kinase (PI3K). These enzymes initiate the production of two most important secondary messengers involved in neutrophil activation: calcium (red circles) and phosphoinositide-3,4,5-trisphosphate (PIP3). Chemotaxis, degranulation, and activation of NOX are regulated by one or by both messengers. Some of the well-known calcium-sensitive proteins and processes are shown by red dots; activation is shown by green lines and inhibition by red lines. AC – adenylate cyclase; α R – α 2A-adrenoceptor; β R – β 2-adrenoceptor; GEF – calcium diacylglycerol guanine nucleotide exchange factor I (CalDAGGEFI); DAG – diacylglycerol; ER – endoplasmic reticulum; IP3 – inositol 1,4,5-trisphosphate; mit – mitochondria; mPTP – mitochondrial permeability transition pore; PAR – protease-activated receptor; PIP2 – phosphoinositol 4,5-bisphosphate; PKA – protein kinase A; PKC – protein kinase C; UNI – mitochondrial uniporter



NET-оза в ответ на патогены. Конечный результат может быть как витальным, так и суицидальным. Лабораторное тестирование готовности нейтрофилов к NET-озу уже сейчас может дать клинически значимые результаты. В перспективе выявление путей управления этим процессом способно привести к появлению антитромботических препаратов нового поколения, избирательно и гемостатически безопасно блокирующих те или иные типы тромбообразования.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, проект №23-45-10039.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

ORCID

Sveshnikova A.N. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4720-7319>

Adamanskaya E.A. ORCID: <https://orcid.org/0009-0000-4828-4063>

Korobkina Yu.-D.D. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2762-5460>

Panteleev M.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8128-7757>

Литература / References

- Palacios-Acedo A.L., Mège D., Crescence L., Dignat-George F., Dubois C., Panicot-Dubois L. Platelets, Thrombo-Inflammation, and Cancer: Collaborating With the Enemy. *Front Immunol* 2019, 10: 1805. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01805
- Thålin C., Hisada Y., Lundström S., Mackman N., Wallén H. Neutrophil Extracellular Traps: Villains and Targets in Arterial, Venous, and Cancer-Associated Thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2019, 39 (9): 1724–38. DOI: 10.1161/ATVBAHA.119.312463
- Адаманская Е.А., Коробкина Ю.Д., Юшкова Е.В., Свешникова А.Н. Повышенное образование ДНК-ловушек нейтрофилов и особенности их хемотаксиса в образцах крови пациентов с раком молочной железы. Тезисы докладов Международной научной конференции, посвященной 50-летию института (Республика Беларусь, Минск, 26–27 октября 2023 г.). Минск, 2023. [Adamanskaya E.A., Korobkina Yu.-D.D., Yushkova E.V., Sveshnikova A.N. Increased formation of neutrophil DNA traps and the characteristics of neutrophil chemotaxis in blood samples from patients with breast cancer. Abstracts for International Scientific Conference to Mark the 50th Anniversary of the Institute (Republic of Belarus, Minsk, 26–27 October 2023). Minsk, 2023. (In Russ.).]
- Caudrillier A., Kessenbrock K., Gilliss B.M., Nguyen J.X., Marques M.B., Monestier M., et al. Platelets Induce Neutrophil Extracellular Traps in Transfusion-Related Acute Lung Injury. *J Clin Invest* 2012, 122: 2661–71. DOI: 10.1172/JCI61303
- Golas A., Parhi P., Dimachkie Z.O., Siedlecki C.A., Vogler E.A. Surface-Energy Dependent Contact Activation of Blood Factor XII. *Biomaterials* 2010, 31: 1068–79. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2009.10.039
- Fuchs T.A., Brill A., Wagner D.D. Neutrophil Extracellular Trap (NET) Impact on Deep Vein Thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012, 32: 1777–83. DOI: 10.1161/ATVBAHA.111.242859
- Borregaard N. Neutrophils, from Marrow to Microbes. *Immunity* 2010, 33: 657–70. DOI: 10.1016/j.immuni.2010.11.011
- Nathan C. Neutrophils and Immunity: Challenges and Opportunities. *Nat Rev Immunol* 2006, 6: 173–82. DOI: 10.1038/nri1785
- Petri B., Sanz M.-J. Neutrophil Chemotaxis. *Cell Tissue Res* 2018, 371: 425–36. DOI: 10.1007/s00441-017-2776-8
- Cassatella M.A. The Neutrophil: An Emerging Regulator of Inflammatory and Immune Response. Karger Medical and Scientific Publishers, 2003.
- Sveshnikova A., Stepanyan M., Panteleev M. Platelet Functional Responses and Signaling: The Molecular Relationship. Part 1: Responses. *Syst Biol Physiol Rep* 2021, 1: 20. DOI: 10.52455/sbpr.01.202101014
- Andrews R.K., Arthur J.F., Gardiner E.E. Neutrophil Extracellular Traps (NETs) and the Role of Platelets in Infection. *Thromb Haemost* 2014, 112: 659–65. DOI: 10.1160/TH14-05-0455
- Knorr D.A., Bachanova V., Vernieris M.R., Miller J.S. Clinical Utility of Natural Killer Cells in Cancer Therapy and Transplantation. *Semin Immunol* 2014, 26: 161–72. DOI: 10.1016/j.smim.2014.02.002
- Damascena H.L., Silveira W.A.A., Castro M.S., Fontes W. Neutrophil Activated by the Famous and Potent PMA (Phorbol Myristate Acetate). *Cells* 2022, 11: 2889. DOI: 10.3390/cells11182889
- Tatsiy O., McDonald P.P. Physiological Stimuli Induce PAD4-Dependent, ROS-Independent NETosis, With Early and Late Events Controlled by Discrete Signaling Pathways. *Front Immunol* 2018, 9: 2036. DOI: 10.3389/fimmu.2018.02036
- von Köckritz-Blickwede M., Winstel V. Molecular Prerequisites for Neutrophil Extracellular Trap Formation and Evasion Mechanisms of *Staphylococcus Aureus*. *Front Immunol* 2022, 13.
- Thiam H.R., Wong S.L., Qiu R., Kittisopikul M., Vahabikashi A., Goldman A.E., et al. NETosis Proceeds by Cytoskeleton and Endomembrane Disassembly and PAD4-Mediated Chromatin Decondensation and Nuclear Envelope Rupture. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2020; 117: 7326–37. DOI: 10.1073/pnas.1909546117
- Borregaard N., Sørensen O.E., Theilgaard-Mönch K. Neutrophil Granules: A Library of Innate Immunity Proteins. *Trends Immunol* 2007; 28: 340–45. DOI: 10.1016/j.it.2007.06.002
- Boettcher M., Esser M., Trah J., Klohs S., Mokhaberi N., Wenskus J., et al. Markers of Neutrophil Activation and Extracellular Traps Formation Are Predictive of Appendicitis in Mice and Humans: A Pilot Study. *Sci Rep* 2020; 10: 18240. DOI:10.1038/s41598-020-74370-9
- Rosales C. Neutrophil: A Cell with Many Roles in Inflammation or Several Cell Types? *Front Physiol* 2018; 9.
- Witko-Sarsat V., Rieu P., Descamps-Latscha B., Lesavre P., Halbwachs-Mecarelli L. Neutrophils: Molecules, Functions and Pathophysiological Aspects. *Lab Invest* 2000; 80: 617–53. DOI: 10.1038/labinvest.3780067
- Polverino E., Rosales-Mayor E., Dale G.E., Dembowsky K., Torres A. The Role of Neutrophil Elastase Inhibitors in Lung Diseases. *Chest* 2017; 152: 249–62. DOI: 10.1016/j.chest.2017.03.056
- Voynow J.A., Shinbashi M. Neutrophil Elastase and Chronic Lung Disease. *Biomolecules* 2021; 11: 1065. DOI: 10.3390/biom11081065

24. Fu Z., Akula S., Thorpe M., Hellman L. Potent and Broad but Not Unselective Cleavage of Cytokines and Chemokines by Human Neutrophil Elastase and Proteinase 3. *Int J Mol Sci* 2020; 21: 651. DOI: 10.3390/ijms21020651
25. Hubbard R.C., Crystal R.G. Alpha-1-Antitrypsin Augmentation Therapy for Alpha-1-Antitrypsin Deficiency. *Am J Med* 1988; 84: 52–62. DOI: 10.1016/S0002-9343(88)80071-8
26. Groutas W.C., Dou D., Alliston K.R. Neutrophil Elastase Inhibitors. *Exp Opin Ther Pat* 2011; 21: 339–54. DOI: 10.1517/13543776.2011.551115
27. Sun R., Xu Z., Zhu C., Chen T., Muñoz L.E., Dai L., Zhao Y. Alpha-1 Antitrypsin in Autoimmune Diseases: Roles and Therapeutic Prospects. *Int Immunopharmacol* 2022; 110: 109001. DOI: 10.1016/j.intimp.2022.109001
28. Козлов С.О., Кудрявцев И.В., Грудина Н.А., Костевич В.А., Панасенко О.М., Соколов А.В., Васильев В.Б. Активированные нейтрофилы, продуцирующие НОСЛ, выявляющиеся при проточной цитометрии и конфокальной микроскопии с помощью целестинового синего В. *Acta Biomedica Scientifica* 2016; 1 (3(2)): 86–91. DOI: 10.12737/article_590823a4895537.04307905 [Kozlov S.O., Kudryavtsev I.V., Grudinina N.A., Kostevich V.A., Panasenko O.M., Sokolov A.V., Vasilyev V.B. Activated producing HOCL neutrophils revealed by flow cytometry and confocal microscopy with celestine blue B. *Acta Biomedica Scientifica* 2016; 1 (3(2)): 86–91. (In Russ.)].
29. Metzler K.D., Goosmann C., Lubojemska A., Zychlinsky A., Papayannopoulos V. A Myeloperoxidase-Containing Complex Regulates Neutrophil Elastase Release and Actin Dynamics during NETosis. *Cell Rep* 2014; 8: 883–96. DOI: 10.1016/j.celrep.2014.06.044
30. Martinod K., Witsch T., Farley K., Gallant M., Remold-O'Donnell E., Wagner D.D. Neutrophil Elastase-Deficient Mice Form Neutrophil Extracellular Traps in an Experimental Model of Deep Vein Thrombosis. *J Thromb Haemost* 2016; 14 (3): 551–8. DOI: 10.1111/jth.13239
31. El-Benna J., Hurtado-Nedelec M., Marzaioli V., Marie J.-C., Gougerot-Pocidal M.-A., Dang P.M.-C. Priming of the Neutrophil Respiratory Burst: Role in Host Defense and Inflammation. *Immunol Rev* 2016; 273: 180–93. DOI: 10.1111/imr.12447
32. Soehnlein O., Lindbom L., Weber C. Mechanisms Underlying Neutrophil-Mediated Monocyte Recruitment. *Blood* 2009; 114: 4613–23. DOI: 10.1182/blood-2009-06-221630
33. Prince L.R., Whyte M.K., Sabroe I., Parker L.C. The Role of TLRs in Neutrophil Activation. *Curr Opin Pharmacol* 2011; 11: 397–403. DOI: 10.1016/j.coph.2011.06.007
34. Liu X., Arfman T., Wichapong K., Reutelingsperger C.P.M., Voorberg J., Nicolaes G.A.F. PAD4 Takes Charge during Neutrophil Activation: Impact of PAD4 Mediated NET Formation on Immune-mediated Disease. *J Thromb Haemost* 2021; 19: 1607–17. DOI: 10.1111/jth.15313.
35. An Z., Li J., Yu J., Wang X., Gao H., Zhang W., et al. Neutrophil Extracellular Traps Induced by IL-8 Aggravate Atherosclerosis via Activation NF- κ B Signaling in Macrophages. *Cell Cycle* 2019; 18: 2928–38. DOI: 10.1080/15384101.2019.1662678
36. Garratt L.W. Current Understanding of the Neutrophil Transcriptome in Health and Disease. *Cells* 2021; 10: 2406. DOI: 10.3390/cells10092406
37. Thompson A.A.R., Elks P.M., Marriott H.M., Eamsamrongs S., Higgins K.R., Lewis A., et al. Hypoxia-Inducible Factor 2 α Regulates Key Neutrophil Functions in Humans, Mice, and Zebrafish. *Blood* 2014; 123: 366–76. DOI: 10.1182/blood-2013-05-500207
38. Yang M., Chen Q., Mei L., Wen G., An W., Zhou X., et al. Neutrophil Elastase Promotes Neointimal Hyperplasia by Targeting Toll-like Receptor 4 (TLR4) – NF- κ B Signaling. *Br J Pharmacol* 2021; 178: 4048–68. DOI: 10.1111/bph.15583
39. Douda D.N., Khan M.A., Grasmann H., Palaniyar N. SK3 Channel and Mitochondrial ROS Mediate NADPH Oxidase-Independent NETosis Induced by Calcium Influx. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015; 112: 2817–22. DOI: 10.1073/pnas.1414055112
40. Huang J., Hong W., Wan M., Zheng L. Molecular Mechanisms and Therapeutic Target of NETosis in Diseases. *MedComm (2020) 2022*; 3: e162. DOI: 10.1002/mco2.162
41. Liu Y.-L., Lee C.-Y., Huang Y.-N., Chen H.-Y., Liu G.-Y., Hung H.-C. Probing the Roles of Calcium-Binding Sites during the Folding of Human Peptidylarginine Deiminase 4. *Sci Rep* 2017; 7: 2429. DOI: 10.1038/s41598-017-02677-1
42. Arita K., Hashimoto H., Shimizu T., Nakashima K., Yamada M., Sato M. Structural Basis for Ca²⁺-Induced Activation of Human PAD4. *Nat Struct Mol Biol* 2004; 11: 777–83. DOI: 10.1038/nsmb799
43. Vorobjeva N., Galkin I., Pletjushkina O., Golyshev S., Zinovkin R., Prikhodko A. et al. Mitochondrial Permeability Transition Pore Is Involved in Oxidative Burst and NETosis of Human Neutrophils. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 2020; 1866: 165664. DOI: 10.1016/j.bbdis.2020.165664
44. Chen T., Li Y., Sun R., Hu H., Liu Y., Herrmann M., et al. Receptor-Mediated NETosis on Neutrophils. *Front Immunol* 2021; 12: 775267.
45. Damgaard D., Bjørn M.E., Jensen P.Ø., Nielsen C.H. Reactive Oxygen Species Inhibit Catalytic Activity of Peptidylarginine Deiminase. *J Enzyme Inhib Med Chem* 2017; 32: 1203–8. DOI: 10.1080/14756366.2017.1368505
46. Damgaard D., Bjørn M.E., Steffensen M.A., Pruijn G.J.M., Nielsen C.H. Reduced Glutathione as a Physiological Co-Activator in the Activation of Peptidylarginine Deiminase. *Arthritis Res Ther* 2016; 18: 102. DOI: 10.1186/s13075-016-1000-7
47. Schoenwaelder S.M., Ruggeri Z.M., Westein E., Kaplan Z.S., Jackson S.P., Ashworth K.J., et al. The CXCR1/2 Ligand NAP-2 Promotes Directed Intravascular Leukocyte Migration through Platelet Thrombi. *Blood* 2013; 121: 4555–66. DOI: 10.1182/blood-2012-09-459636
48. Rajagopalan L., Rajarathnam K. Ligand Selectivity and Affinity of Chemokine Receptor CXCR1: ROLE OF N-TERMINAL DOMAIN*. *J Biol Chem* 2004; 279: 30000–8. DOI: 10.1074/jbc.M313883200
49. Woulfe D., Jiang H., Mortensen R., Yang J., Brass L.F. Activation of Rap1B by Gi Family Members in Platelets. *J Biol Chem* 2002; 277: 23382–90. DOI: 10.1074/jbc.M202212200
50. Eckly A., Rinckel J.Y., Proamer F., Ulas N., Joshi S., Whiteheart S.W., Gachet C. Respective Contributions of Single and Compound Granule Fusion to Secretion by Activated Platelets. *Blood* 2016; 128: 2538–49. DOI: 10.1182/blood-2016-03-705681
51. Kannan S. Role of Protease-Activated Receptors in Neutrophil Degranulation. *Med Hypotheses* 2002; 59: 266–7. DOI: 10.1016/S0306-9877(02)00214-1
52. Futosi K., Fodor S., Mócsai A. Neutrophil Cell Surface Receptors and Their Intracellular Signal Transduction Pathways. *Int Immunopharmacol* 2013; 17: 638–50. DOI: 10.1016/j.intimp.2013.06.034
53. Zarubin T., Han J. Activation and Signaling of the P38 MAP Kinase Pathway. *Cell Res* 2005; 15: 11–8. DOI: 10.1038/sj.cr.7290257
54. Anerillas C., Abdelmohsen K., Gorospe M. Regulation of Senescence Traits by MAPKs. *GeroScience* 2020; 42: 397–408. DOI: 10.1007/s11357-020-00183-3
55. Teijeira A., Garasa S., Ochoa M.D.C., Cirella A., Olivera I., Glez-Vaz J., et al. Differential Interleukin-8 Thresh-

- olds for Chemotaxis and Netosis in Human Neutrophils. *Eur J Immunol* 2021; 51: 2274–80. DOI: 10.1002/eji.202049029
56. Raad H., Mouawia H., Hassan H., El-Seblani M., Arabi-Derkawi R., Boussetta T., et al. The Protein Kinase A Negatively Regulates Reactive Oxygen Species Production by Phosphorylating Gp91phox/NOX2 in Human Neutrophils. *Free Radic Biol Med* 2020; 160: 19–27. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2020.07.021
 57. Chhatar S., Lal G. Role of Adrenergic Receptor Signalling in Neuroimmune Communication. *Curr Res Immunol* 2021; 2: 202–17. DOI: 10.1016/j.crimmu.2021.11.001
 58. Mócsai A., Walzog B., Lowell C.A. Intracellular Signalling during Neutrophil Recruitment. *Cardiovasc Res* 2015; 107: 373–85. DOI: 10.1093/cvr/cvv159
 59. Cappenberg A., Kardell M., Zarbock A. Selectin-Mediated Signaling—Shedding Light on the Regulation of Integrin Activity in Neutrophils. *Cells* 2022; 11: 1310. DOI: 10.3390/cells11081310
 60. Канева В.Н., Мартянов А.А., Морозова Д.С., Пантелеев М.А., Свешникова А.Н. Механизмы активации и кластеризации тромбоцитарных интегринов $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ и их роль в гетерогенности структуры тромба. *Биологические мембраны* 2019; 36 (1): 15–31. DOI: 10.1134/S0233475519010031 [Kaneva V.N., Martyanov A.A., Morozova D.S., Panteleev M.A., Svshnikova A.N. The mechanisms of activation and clustering of platelet integrins $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ and their role in thrombus structural heterogeneity. *Biological membranes* 2019; 36 (1): 15–31. (In Russ.)].
 61. Moroi A.J., Watson S.P. Impact of the PI3-Kinase/Akt Pathway on ITAM and hemITAM Receptors: Haemostasis, Platelet Activation and Antithrombotic Therapy. *Biochem Pharmacol* 2015; 94: 186–94. DOI: 10.1016/j.bcp.2015.02.004
 62. Lu Y.-C., Yeh W.-C., Ohashi P.S. LPS/TLR4 Signal Transduction Pathway. *Cytokine* 2008; 42: 145–51. DOI: 10.1016/j.cyto.2008.01.006
 63. Vogel S., Bodenstern R., Chen Q., Feil S., Feil R., Rheinlaender J., et al. Platelet-Derived HMGB1 Is a Critical Mediator of Thrombosis. *J Clin Invest* 2015; 125 (12): 4638–54. DOI: 10.1172/JCI81660DS1
 64. Lin H.-R., Wu Y.-H., Yen W.-C., Yang C.-M., Chiu D.T.-Y. Diminished COX-2/PGE2-Mediated Antiviral Response Due to Impaired NOX/MAPK Signaling in G6PD-Knockdown Lung Epithelial Cells. *PLoS One* 2016; 11: e0153462. DOI: 10.1371/journal.pone.0153462
 65. Мартянов А.А., Балабин Ф.А., Майоров А.С., Шамова Е.В., Пантелеев М.А., Свешникова А.Н. Компьютерное моделирование внутриклеточной сигнализации при активации тромбоцитов крови фукоиданом. *Биологические мембраны* 2018; 35: 364–75. DOI: 10.1134/S0233475518040102. [Martyanov A.A., Balabin F.A., Mayorov A.S., Shamova E.V., Panteleev M.A., Svshnikova A.N. Computer Modelling of Intracellular Signaling in Platelet Activation by Fucoidan. *Biological membranes* 2018; 35: 364–75. (In Russ.)].
 66. Taylor P.R., Roy S., Leal S.M., Sun Y., Howell S.J., Cobb B.A., et al. Activation of Neutrophils by Autocrine IL-17A–IL-17RC Interactions during Fungal Infection Is Regulated by IL-6, IL-23, ROR γt and Dectin-2. *Nat Immunol* 2014; 15: 143–51. DOI: 10.1038/ni.2797
 67. Bao Y., Ledderose C., Seier T., Graf A.F., Brix B., Chong E., Junger W.G. Mitochondria Regulate Neutrophil Activation by Generating ATP for Autocrine Purinergic Signaling. *J Biol Chem* 2014; 289: 26794–803. DOI: 10.1074/jbc.M114.572495
 68. Fletcher D.A., Mullins R.D. Cell Mechanics and the Cytoskeleton. *Nature* 2010; 463: 485–92. DOI: 10.1038/nature08908
 69. Kenny E.F., Herzig A., Krüger R., Muth A., Mondal S., Thompson P.R., et al. Diverse Stimuli Engage Different Neutrophil Extracellular Trap Pathways. *Elife* 2017; 6: e24437. DOI: 10.7554/eLife.24437
 70. Metzler K.D., Fuchs T.A., Nauseef W.M., Reumaux D., Roesler J., Schulze I., et al. Myeloperoxidase Is Required for Neutrophil Extracellular Trap Formation: Implications for Innate Immunity. *Blood* 2011; 117: 953–9. DOI: 10.1182/blood-2010-06-290171
 71. Neubert E., Meyer D., Rocca F., Günay G., Kwaczala-Tessmann A., Grandke J., et al. Chromatin Swelling Drives Neutrophil Extracellular Trap Release. *Nat Commun* 2018; 9: 3767. DOI: 10.1038/s41467-018-06263-5
 72. Chatfield S.M., Grebe K., Whitehead L.W., Rogers K.L., Nebl T., Murphy J.M., Wicks I.P. Monosodium Urate Crystals Generate Nuclease-Resistant Neutrophil Extracellular Traps via a Distinct Molecular Pathway. *J Immunol* 2018; 200: 1802–16. DOI: 10.4049/jimmunol.1701382
 73. Sprenkeler E.G.G., Tool A.T.J., Henriët S.S.V., van Bruggen R., Kuijpers T.W. Formation of Neutrophil Extracellular Traps Requires Actin Cytoskeleton Rearrangements. *Blood* 2022; 139: 3166–80. DOI: 10.1182/blood.2021013565
 74. Neubert E., Meyer D., Kruss S., Erpenbeck L. The Power from within – Understanding the Driving Forces of Neutrophil Extracellular Trap Formation. *J Cell Sci* 2020; 133: jcs241075. DOI: 10.1242/jcs.241075
 75. Ogino T., Packer L., Maguire J.J. Neutrophil Antioxidant Capacity During the Respiratory Burst: Loss of Glutathione Induced by Chloramines. *Free Radic Biol Med* 1997; 23: 445–52. DOI: 10.1016/S0891-5849(97)00115-9
 76. Reshetnikov V., Hahn J., Maueröder C., Czegléy C., Muñoz L.E., Herrmann M., et al. Chemical Tools for Targeted Amplification of Reactive Oxygen Species in Neutrophils. *Front Immunol* 2018; 9: 1827. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01827
 77. Chamardani T.M., Amirivassoli S. Inhibition of NETosis for Treatment Purposes: Friend or Foe? *Mol Cell Biochem* 2022; 477: 673–688. DOI: 10.1007/s11010-021-04315-x
 78. Hallberg L.A.E., Barlous K., Hawkins C.L. Antioxidant Strategies to Modulate NETosis and the Release of Neutrophil Extracellular Traps during Chronic Inflammation. *Antioxidants* 2023; 12: 478. DOI: 10.3390/antiox12020478
 79. Papayannopoulos V. Neutrophil Extracellular Traps in Immunity and Disease. *Nat Rev Immunol* 2018; 18: 134–47. DOI: 10.1038/nri.2017.105
 80. Stevens M.P., Galyov E.E. Exploitation of Host Cells by *Burkholderia pseudomallei*. *Int J Med Microbiol* 2004; 293: 549–55. DOI: 10.1078/1438-4221-00292
 81. Vong L., Lorentz R.J., Assa A., Glogauer M., Sherman P.M. Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* Inhibits the Formation of Neutrophil Extracellular Traps. *J Immunol* 2014; 192: 1870–7. DOI: 10.4049/jimmunol.1302286
 82. Fuchs T.A., Abed U., Goosmann C., Hurwitz R., Schulze I., Wahn V., et al. Novel Cell Death Program Leads to Neutrophil Extracellular Traps. *J Cell Biol* 2007; 176: 231–41. DOI: 10.1083/jcb.200606027
 83. Azzouz D., Palaniyar N. ApoNETosis: Discovery of a Novel Form of Neutrophil Death with Concomitant Apoptosis and NETosis. *Cell Death Dis* 2018; 9: 1–3. DOI: 10.1038/s41419-018-0846-9
 84. Khan M.A., Palaniyar N. Transcriptional Firing Helps to Drive NETosis. *Sci Rep* 2017; 7: 41749. DOI: 10.1038/srep41749