

DOI: <https://doi.org/10.17816/KMJ691853> EDN: PBCVUY

Влияние нейтрофилов на ретракцию сгустков крови

Ш.М. Саляхутдинова¹, Р.Р. Хисматуллин¹, А.И. Хабирова¹, А.Н. Хузиахмедов^{1,2}, Р.И. Литвинов³¹ Институт фундаментальной медицины и биологии Казанского (Приволжского) федерального университета, г. Казань, Россия;² Городская клиническая больница № 7 им. М.Н. Садыкова, г. Казань, Россия;³ Пенсильванский университет, Филадельфия, Соединенные Штаты Америки

АННОТАЦИЯ

Обоснование. Иммунотромбоз, или воспалительный тромбоз, во многом определяет течение и исходы тяжёлых форм инфекционных и аутоиммунных заболеваний. Воспалительные тромбы богаты нейтрофилами, однако остаётся неизвестным, как воспалительные клетки влияют на сжатие (ретракцию) сгустка крови — важный процесс, определяющий течение и исходы гемостатических расстройств.

Цель исследования. Оценить влияние активированных нейтрофилов и нейтрофильных внеклеточных ловушек на скорость и степень ретракции сгустков крови, опосредованной сокращением активированных тромбоцитов.

Методы. Изолированные человеческие нейтрофилы активировали форбол-12-миристат-13-ацетатом для индукции образования нейтрофильных внеклеточных ловушек, которые визуализировали с помощью иммунофлуоресцентного окрашивания цитруллинированных H3-гистонов и флуоресцентного окрашивания ДНК, а также с помощью сканирующей электронной микроскопии. Сгустки, индуцированные тромбином, формировали для трёх групп образцов из цельной крови ($n=5$ для каждой группы) или богатой тромбоцитами плазмы ($n=4$ или $n=5$ для каждой группы), а именно: (1) без добавления нейтрофилов (контроль); в присутствии (2) неактивированных или (3) активированных нейтрофилов. Кинетику ретракции сгустка регистрировали оптически. Конечную степень ретракции определяли как разницу между исходным и конечным размерами сгустка, выраженную в процентах от исходного значения. Для статистической обработки применяли t -критерий Стьюдента, однофакторный дисперсионный анализ с апостериорным тестом Сидака и критерий Фридмана; уровень значимости составлял 95%.

Результаты. Форбол-12-миристат-13-ацетат вызывал активацию нейтрофилов и инициировал образование нейтрофильных внеклеточных ловушек, которые встраивались в структуру фибрина. При добавлении в кровь или богатую тромбоцитами плазму активированные нейтрофилы значимо ($p < 0,05$) увеличивали конечную степень ретракции сгустка ($50 \pm 5\%$ в крови, $86 \pm 3\%$ в богатой тромбоцитами плазме) по сравнению с контрольными неактивированными нейтрофилами ($45 \pm 3\%$ и $80 \pm 1\%$ соответственно). Кинетические параметры ретракции указывали на ускоренное сжатие в присутствии активированных нейтрофилов (увеличение средней скорости в богатой тромбоцитами плазме: $0,070 \pm 0,003\%/с$ против $0,065 \pm 0,001\%/с$; $p=0,03$). Стимулирующий эффект активированных нейтрофилов на ретракцию сгустков исчезал после расщепления нейтрофильных внеклеточных ловушек дезоксирибонуклеазой I как в цельной крови (степень ретракции $44 \pm 5\%$ против $54 \pm 2\%$; $p=0,02$), так и в богатой тромбоцитами плазме ($82 \pm 3\%$ против $87 \pm 2\%$, $p=0,03$), что указывает на ключевую роль нейтрофильных внеклеточных ловушек в составе сгустков.

Заключение. Активированные нейтрофилы ускоряют и усиливают ретракцию сгустков крови, и этот эффект обусловлен образованием нейтрофильных внеклеточных ловушек, встроенных в фибриновую сеть.

Ключевые слова: нейтрофилы; нейтрофильные внеклеточные ловушки; ретракция сгустка; иммунотромбоз; воспалительный тромбоз.

Как цитировать:

Саляхутдинова Ш.М., Хисматуллин Р.Р., Хабирова А.И., Хузиахмедов А.Н., Литвинов Р.И. Влияние нейтрофилов на ретракцию сгустков крови // Казанский медицинский журнал. 2025. DOI: 10.17816/KMJ691853 EDN: PBCVUY

DOI: <https://doi.org/10.17816/KMJ691853> EDN: PBCVUY

Influence of Neutrophils on Blood Clot Retraction

Shakhnoza M. Saliakhutdinova¹, Rafael R. Khismatullin¹, Alina I. Khabirova¹,
Anvar N. Khuziakhmedov^{1,2}, Rustem I. Litvinov³¹ Department of Morphology and General Pathology, Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, Russia;² City Clinical Hospital No. 7, Kazan, Russia;³ University of Pennsylvania, Philadelphia, USA

ABSTRACT

BACKGROUND: Immunothrombosis, or inflammatory thrombosis, largely determines the course and outcomes of severe infectious and autoimmune diseases. Inflammatory thrombi are rich in neutrophils; however, how inflammatory cells affect the contraction (retraction) of a blood clot, an important process that influences the course and outcomes of hemostatic disorders, remains unknown.

AIM: This study aimed to assess the effect of activated neutrophils and neutrophil extracellular traps on the rate and degree of blood clot retraction mediated by activated platelet contraction.

METHODS: Isolated human neutrophils were activated with phorbol 12-myristate 13-acetate to induce the formation of neutrophil extracellular traps, which were visualized using immunofluorescence (citullinated histone H3 and DNA) and scanning electron microscopy. Thrombin-induced clots were formed for three sample groups from whole blood ($n = 5$ for each group) or platelet-rich plasma ($n = 4$ or $n = 5$ for each group): (1) without added neutrophils (control), (2) with nonactivated neutrophils, and (3) with activated neutrophils. Clot-retraction kinetics were recorded optically. The final degree of retraction was the difference between the initial and final clot size, expressed as a percentage of the initial value. Statistical analysis was performed using the Student's t -test, one-way analysis of variance with a Sidak post hoc test, and the Friedman test. The significance level was set at 95%.

RESULTS: Phorbol 12-myristate 13-acetate induced the activation of neutrophils and formation of neutrophil extracellular traps, which merged into the fibrin structure. When added to whole blood or platelet-rich plasma, activated neutrophils significantly ($p < 0.05$) increased the final degree of clot retraction ($50\% \pm 5\%$ in blood and $86\% \pm 3\%$ in platelet-rich plasma) compared with nonactivated neutrophils ($45\% \pm 3\%$ and $80\% \pm 1\%$, respectively). The kinetic parameters of retraction demonstrated accelerated contraction in the presence of activated neutrophils (greater mean velocity in platelet-rich plasma: $0.070\%/s \pm 0.003\%/s$ vs. $0.065\%/s \pm 0.001\%/s$; $p = 0.03$). The stimulatory effect of activated neutrophils on clot retraction disappeared following neutrophil extracellular trap degradation with deoxyribonuclease I, in whole blood (degree of retraction $44\% \pm 5\%$ vs. $54\% \pm 2\%$; $p = 0.02$) and platelet-rich plasma ($82\% \pm 3\%$ vs. $87\% \pm 2\%$; $p = 0.03$), indicating a key role of neutrophil extracellular traps within clots.

CONCLUSION: Activated neutrophils accelerate and enhance blood clot retraction. This effect is mediated by the formation of neutrophil extracellular traps that merge into the fibrin network.

Keywords: neutrophils; neutrophil extracellular traps; clot retraction; immunothrombosis; thrombosis; inflammation.

To cite this article:

Saliakhutdinova ShM, Khismatullin RR, Khabirova AI, Khuziakhmedov AN, Litvinov RI. Influence of neutrophils on blood clot retraction. *Kazan Medical Journal*. 2025. DOI: 10.17816/KMJ691853 EDN: PBCVUY

ОБОСНОВАНИЕ

Воспалительный тромбоз, или иммунотромбоз, представляет собой патогенетическое звено между воспалением и свёртыванием крови, играя ключевую роль в развитии различных инфекционных и аутоиммунных заболеваний. Эти болезни широко распространены в России и во всём мире и являются значимой причиной инвалидизации и смертности пациентов [1, 2]. Тромбоз — смертельно опасное осложнение при сепсисе и тяжёлых вирусных инфекциях, таких как COVID-19 [3, 4], а также при ряде аутоиммунных заболеваний и патологических состояний, включая антифосфолипидный синдром, системную красную волчанку и ревматоидный артрит, при которых частота тромбозов в 2–10 раз выше, чем в общей популяции [5–7].

Иммунотромбоз связан с активацией иммунных клеток крови, прежде всего нейтрофилов и моноцитов, которые способствуют формированию тромба за счёт высвобождения прокоагулянтов и образования нейтрофильных внеклеточных ловушек (НВЛ, или NETs — neutrophil extracellular traps) [8]. НВЛ усиливают как свёртывание крови, так и локальные воспалительные реакции [9].

Важным, но сравнительно малоизученным аспектом тромбообразования является процесс ретракции (сжатия) сгустка, индуцируемый активированными тромбоцитами. Он традиционно используется *in vitro* для получения сыворотки крови и оценки функциональной активности тромбоцитов [10]. Сравнительно недавно было показано, что сжатие сгустков крови протекает и *in vivo*, представляя собой важный компонент гемостаза и тромбоза [11, 12]. Ретракция сгустка крови модулирует ключевые свойства внутрисосудистого тромба, включая его обструктивность, чувствительность к фибринолизу, механическую жёсткость, проницаемость и устойчивость к разрыву (эмболизации), что в совокупности определяет клиническое течение и исходы тромбоза [13]. Несмотря на высокую клиническую значимость, взаимосвязь между ретракцией сгустка и воспалением остаётся малоизученной.

Известно, что ретракция существенно зависит от точного состава сгустка крови, в частности от содержания тромбоцитов и эритроцитов [14]. Поскольку воспалительные тромбы богаты нейтрофилами, их присутствие потенциально может влиять на динамику и полноту ретракции и отличать их от невоспалительных тромбов. Активация нейтрофилов сопровождается нетозом — высвобождением компонентов ядерного хроматина (ДНК и гистонов), формирующих структурную основу НВЛ, под действием провоспалительных стимулов [8]. Хотя известно, что образование НВЛ усиливает свёртывание крови и способствует активации тромбоцитов, влияние НВЛ на ретракцию сгустков крови остаётся неясным.

Настоящее исследование направлено на восполнение этого пробела и изучает взаимосвязь между воспалением и ретракцией сгустков крови.

Цель исследования — определить влияние активированных нейтрофилов на скорость и степень ретракции сгустков крови, опосредованной тромбоцитами.

МЕТОДЫ

Получение крови и её компонентов

Все процедуры с участием людей одобрены этическим комитетом Казанского федерального университета (26 февраля 2025 г., протокол № 53). Для модельных экспериментов *in vitro* кровь была получена у 30 доноров, не принимавших антикоагулянты в течение двух недель до забора. Венозную кровь собирали в вакутейнеры (Vacuette, Greiner Bio-One), стабилизируя 3,2% цитратом натрия в соотношении 9:1 по объёму. Богатую тромбоцитами плазму (PRP) получали центрифугированием крови при 200 g в течение 10 мин; бедную тромбоцитами плазму (PPP) — центрифугированием PRP при 2000 g в течение 10 мин; бестромбоцитарную плазму (PFP) — центрифугированием PPP при 10 000 g в течение 5 мин. PPP использовали для получения PFP, которую применяли при сканирующей электронной микроскопии фибриновых сгустков в присутствии активированных нейтрофилов. Часть крови использовали для выделения нейтрофилов.

Выделение и активация нейтрофилов для получения нейтрофильных внеклеточных ловушек

Для выделения нейтрофилов 5 мл цитратной крови наслаивали на 5 мл среды для разделения клеток Lympholyte-Poly (Cedarlane) и центрифугировали при 500 g в течение 35 мин. Собирали белое кольцо нейтрофилов и трижды промывали клетки буфером Хэнкса (HBSS), не содержащим ионов Ca^{2+} и Mg^{2+} , ресуспендируя и центрифугируя при 300 g в течение 10 мин. Отмытые клетки ресуспендировали в 250 мкл HBSS. Число клеток определяли методом световой микроскопии в камере Горяева. Для получения НВЛ часть выделенных нейтрофилов активировали добавлением 100 нМ (конечная концентрация) форбол-12-миристал-13-ацетата (ФМА) и инкубировали 3,5 ч при 37 °C в CO₂-инкубаторе (New Brunswick Galaxy 170R, Marshall Scientific). Суспензию ФМА-активированных нейтрофилов или надосадов, образующийся после гравитационного осаждения клеток в течение 3,5 ч, использовали как источники НВЛ.

Проточная цитометрия изолированных нейтрофилов

Для оценки чистоты и функционального состояния нейтрофилов использовали проточную цитометрию с применением флуоресцентно меченых моноклональных антител. Изолированные нейтрофилы — как неактивированные, так и ФМА-активированные — инкубировали 10 мин в темноте с двумя типами меченых антител: 1) против человеческого белка CD16 (BD Biosciences); 2) против

человеческого активированного белкового рецептора CD11b, или Mac-1 (Biolegend). Проточную цитометрию проводили на приборах FACSCalibur (Beckman Dickinson) или CytoFlex (Beckman Coulter). Для каждого образца анализировали 5000 сигналов. Гейт нейтрофилов определяли по прямому (FSC) и боковому (SSC) светорассеянию, дополнительно идентифицируя нейтрофилы как CD16⁺ сигналы. Внутри гейта всех нейтрофилов CD16⁺ активированные нейтрофилы определяли как CD11b⁺ события и выражали их долю относительно всего CD16⁺ пула, принятого за 100%.

Гисто- и иммуногистохимическое исследование активированных нейтрофилов и нейтрофильных внеклеточных ловушек

Для гистологических исследований сгустки формировали в пробирке, предварительно ополоснутой 1% раствором Pluronic (детергент) для предотвращения прилипания к стенкам. Использовали сгустки из PRP с добавлением неактивированных или ФМА-активированных нейтрофилов. Образец PRP, содержащий $\sim 48 \times 10^6$ тромбоцитов, добавляли к $\sim 0,8 \times 10^6$ нейтрофилов в буфере Хэнкса (отношение числа клеток примерно 60:1) до конечного объёма образца 500 мкл. Образование сгустка инициировали добавлением 2 мМ CaCl₂ и 1 МЕ/мл тромбина (конечные концентрации). После 30-минутной инкубации сгустки фиксировали в 10% забуференном формалине, промывали водой и обезвоживали в изопропанолу с помощью тканевого процессора (STP420ES, Thermo Scientific) с последующей заливкой в парафин. Гистологические срезы толщиной 4 мкм депарафинировали и окрашивали гематоксилином и эозином (Thermo Scientific). Часть срезов использовали для иммуногистохимического окрашивания. Для конфокальной микроскопии нефиксированные гидратированные сгустки из PRP, содержащие активированные нейтрофилы, формировали в конфокальных чашках и подвергали иммунофлуоресцентному анализу. Аналогичные методы окрашивания использовали как для визуализации клеток и НВЛ в сгустках, так и в препаратах изолированных активированных нейтрофилов.

Срезы сгустков инкубировали с первичными кроличьими антителами против цитруллинированных гистонов человека citH3 (Abcam) в разведении 1:400. Срезы промывали в фосфатно-солевом буфере и инкубировали со вторичными биотинилированными антикроличьими антителами (Vector Laboratories) для пероксидазного метода визуализации. В качестве альтернативы использовали флуоресцентно меченые вторичные антитела (антикроличьи IgG, Alexa Fluor 488, Invitrogen) в разведении 1:400. Для визуализации ДНК фиксированные сгустки окрашивали DAPI (BioLegend). Гистологическое исследование проводили с помощью сканера Hamamatsu NanoZoomer 560 (Hamamatsu Photonics); световую конфокальную флуоресцентную микроскопию — с помощью сканирующего лазерного конфокального микроскопа LSM 780 (Carl Zeiss).

Сканирующая электронная микроскопия нейтрофилов и нейтрофильных внеклеточных ловушек

Для сканирующей электронной микроскопии высокого разрешения были подготовлены следующие образцы: 1) изолированные неактивированные и активированные нейтрофилы; 2) надосады активированных нейтрофилов; 3) сгустки из PFP, сформированные в присутствии активированных нейтрофилов. Фиксированные нейтрофилы или надосады настилали на покровные стёкла, предварительно обработанные 0,01% поли-L-лизинем (EMD Millipore), и инкубировали с последующей фиксацией в 2% глутаральдегиде. Сгустки из PFP в присутствии активированных нейтрофилов формировали на покровных стёклах, а затем фиксировали. Все фиксированные образцы трижды промывали, обезвоживали в возрастающих концентрациях этанола, погружали в гексаметилдицилазан и высушивали. Тонкую плёнку золота-палладия наносили на образцы с помощью установки для напыления Quorum Q 150T ES (Quorum). Микрофотографии получали посредством сканирующего электронного микроскопа (Merlin, Carl Zeiss).

Метод изучения ретракции кровяного сгустка

Ретракцию сгустков в цельной цитратной крови человека или PRP регистрировали оптически по уменьшению размера сгустка в отсутствие или в присутствии неактивированных или активированных нейтрофилов. В контрольных образцах добавляли соответствующий объём буфера HBSS. Кинетику ретракции сгустка отслеживали с помощью прибора «Регистратор тромбодинамики» (ООО «ГемаКор»). Для изучения эффектов неактивированных или активированных нейтрофилов 60–80 мкл HBSS, содержащего $\sim 8 \times 10^5$ нейтрофилов, добавляли к 120–140 мкл крови или PRP до конечного объёма 200 мкл. Образцы активировали 2 мМ CaCl₂ и 1 МЕ/мл человеческого тромбина (Sigma-Aldrich) (конечные концентрации). Перед формированием сгустка активированные образцы крови или PRP (80 мкл) переносили в прозрачные пластиковые кюветы, предварительно ополоснутые детергентом. Кювету помещали при 37 °C в камеру оптического анализатора. Изображения сгустков в процессе сжатия получали каждые 15 с в течение 20 мин. Серийные изображения сгустков анализировали с помощью компьютерной программы для построения кинетической кривой, определения конечной степени ретракции и расчёта кинетических параметров: лаг-периода (времени от добавления тромбина до появления первых признаков ретракции), площади под кривой и средней скорости ретракции, которая определялась как конечная степень ретракции, делённая на время (20 мин) [15]. Конечную степень ретракции определяли как разницу между исходным и конечным размерами сгустка, выраженную в процентах от исходного значения [15].

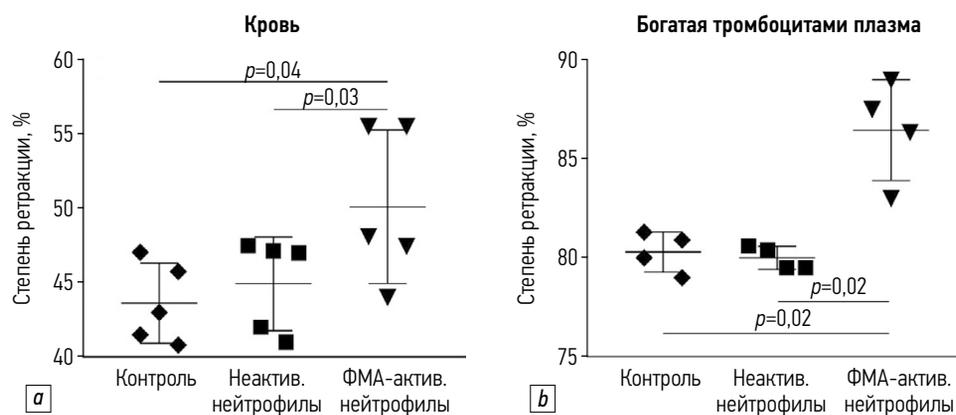


Рис. 1. Влияние фобол-12-миристан-13-ацетат (ФМА)-активированных и неактивированных нейтрофилов на конечную степень ретракции сгустка в цельной крови (а) и PRP (богатой тромбоцитами плазме) (б). Образование и ретракцию сгустка инициировали добавлением 1 МЕ/мл тромбина с последующей оптической регистрацией уменьшающегося размера сгустка. Конечная степень ретракции и другие кинетические параметры (см. табл. 1) измеряли в сгустках, сформированных в образцах цельной крови ($n=5$) и PRP ($n=4$), полученных от независимых доноров. Результаты представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение. Для сравнений использовали однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA).

Fig. 1. Effect of phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)-activated and nonactivated neutrophils on the final degree of clot retraction in whole blood (a) and platelet-rich plasma (PRP) (b). Clot formation and retraction were initiated by adding 1 IU/mL of thrombin, followed by optical recording of the decreasing clot size. The final degree of retraction and other kinetic parameters (see Table 1) were measured in clots formed in samples of whole blood ($n = 5$) and PRP ($n = 4$) obtained from independent donors. Results are presented as mean \pm SD. One-way analysis of variance (ANOVA) was used for comparisons.

Статистический анализ

Статистический анализ выполняли с использованием пакета программ GraphPad Prism 8 (GraphPad Software). Нормальность распределения данных оценивали с помощью критериев Шапиро–Уилка и Д’Агостино–Пирсона. Парные статистические различия оценивали посредством парного t -критерия Стьюдента (параметрический анализ). Статистические различия для множественных сравнений оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с апостериорным тестом Сидака. Многогрупповой анализ повторных измерений для данных с ненормальным распределением проводили с использованием непараметрического критерия Фридмана. Уровень значимости составлял 95% ($p < 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Влияние активированных нейтрофилов на ретракцию сгустков

В качестве модели воспалительного тромбоза мы изучили сгустки крови или богатой тромбоцитами плазмы (PRP), сформированные в присутствии ФМА-активированных нейтрофилов. Мы оценивали влияние активированных нейтрофилов на сжатие сгустков в сравнении с неактивированными нейтрофилами, добавленными в цельную кровь или плазму в количестве, соответствующем физиологическому содержанию нейтрофилов в крови (8000/мкл). Параметры ретракции сгустка в цельной крови (рис. 1, а; табл. 1) и PRP (рис. 1, б; см. табл. 1) показали, что конечная степень сжатия была значительно выше ($p < 0,05$) в присутствии ФМА-активированных

нейтрофилов по сравнению с неактивированными нейтрофилами и контрольными образцами (без добавления экзогенных нейтрофилов) как в цельной крови, так и в PRP.

Хотя не все параметры сжатия сгустка различались значительно (см. табл. 1), общая динамика, отражающая скорость ретракции, была значительно выше в присутствии ФМА-активированных нейтрофилов ($p < 0,0001$, критерий Фридмана). Примечательно, что наблюдалось увеличение средней скорости ретракции в сгустках из PRP в присутствии активированных нейтрофилов по сравнению с неактивированными ($p=0,03$) и с контрольными образцами без добавления нейтрофилов ($p=0,02$) (см. табл. 1). Кроме того, зафиксировано значительное уменьшение среднего лаг-периода в сгустках из цельной крови с добавлением активированных нейтрофилов по сравнению с контрольными образцами ($p=0,005$), а также в присутствии неактивированных нейтрофилов в сравнении с контролем ($p=0,04$), в то время как разница между активированными и неактивированными нейтрофилами была статистически незначима (см. табл. 1). Другие кинетические параметры сжатия сгустка, сформированного в цельной крови, также характеризовались тенденцией к ускорению ретракции под действием активированных нейтрофилов. В совокупности эти различия дают основания предполагать возможность ускоренной активации тромбоцитов и связанную с этим повышенную способность сгустка к сжатию в присутствии активированных нейтрофилов.

Для исключения того, что обнаруженное стимулирующее действие нейтрофилов, инкубированных с ФМА, на сжатие сгустка обусловлено прямым влиянием остаточного количества ФМА на тромбоциты или другие

Таблица 1. Кинетика ретракции сгустка в цельной крови и плазме, богатой тромбоцитами (PRP), без добавления (контроль) и с добавлением не-активированных или фобол-12-миристан-13-ацетат (ФМА)-активированных нейтрофилов**Table 1.** Kinetics of clot retraction in whole blood and platelet-rich plasma (PRP) without addition (control) and with addition of nonactivated or phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)-activated neutrophils

Параметры ретракции сгустка	Контроль (без добавления нейтрофилов)	Неактивированные нейтрофилы	Активированные нейтрофилы	<i>p</i> *
Цельная кровь				
Конечная степень ретракции (%)	44±3	45±3	50±5	<i>p</i> ₁ >0,05 <i>p</i>₂=0,04 <i>p</i>₃=0,03 <i>p</i>₄=0,046
Лаг-период, с	147±30	63±48	39±16	<i>p</i>₁=0,04 <i>p</i>₂=0,005 <i>p</i> ₃ >0,05 <i>p</i>₄=0,001
Площадь под кинетической кривой (y. e.)	351±42	426±72	427±86	<i>p</i> ₁ >0,05 <i>p</i> ₂ >0,05 <i>p</i> ₃ >0,05 <i>p</i> ₄ =0,2
Средняя скорость, %/с	0,036±0,002	0,036±0,002	0,039±0,003	<i>p</i> ₁ >0,05 <i>p</i> ₂ >0,05 <i>p</i> ₃ >0,05 <i>p</i> ₄ =0,07
Плазма, богатая тромбоцитами (PRP)				
Конечная степень ретракции (%)	80±1	80±1	86±3	<i>p</i> ₁ >0,05 <i>p</i>₂=0,02 <i>p</i>₃=0,02 <i>p</i>₄=0,0005
Лаг-период, с	99±4	94±10	108±21	<i>p</i> ₁ >0,05 <i>p</i> ₂ >0,05 <i>p</i> ₃ >0,05 <i>p</i> ₄ =0,4
Площадь под кинетической кривой (y. e.)	706±27	743±25	718±34	<i>p</i>₁=0,03 <i>p</i> ₂ >0,05 <i>p</i> ₃ >0,05 <i>p</i> ₄ =0,2
Средняя скорость, %/с	0,066±0,001	0,065±0,001	0,070±0,003	<i>p</i> ₁ >0,05 <i>p</i>₂=0,02 <i>p</i>₃=0,03 <i>p</i>₄=0,002

Примечание. Результаты представлены как среднее значение ± стандартное отклонение (n=5 для образцов цельной крови; n=4 для образцов богатой тромбоцитами плазмы (PRP), полученных из крови независимых доноров). Однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) для множественных сравнений (*p*₄) с апостериорным тестом Сидака для попарных сравнений (*p*₁, *p*₂, *p*₃). * *p*₁ — «контроль» против «неактивированных нейтрофилов», *p*₂ — «контроль» против «активированных нейтрофилов», *p*₃ — «неактивированные нейтрофилы» против «активированных нейтрофилов», *p*₄ — групповое сравнение («контроль» против «неактивированных нейтрофилов» и против «активированных нейтрофилов»). Полу жирным шрифтом выделены значимые значения.

клетки крови, мы провели контрольный эксперимент. Для этого ФМА (без нейтрофилов) добавляли в PRP в той же конечной концентрации (2,2 нмоль/л), что поступала в составе препаратов нейтрофилов, обработанных ФМА. Оказалось, что ФМА в такой малой концентрации не влиял ни на скорость, ни на конечную степень ретракции сгустка (*p*>0,05), которая оставалась на уровне 80–83%. Таким образом, потенциальный артефакт, связанный с остаточным количеством ФМА в препаратах нейтрофилов, был исключён.

Визуализация нейтрофильных внеклеточных ловушек, образованных активированными нейтрофилами

Обработка изолированных нейтрофилов 100 нМ ФМА при 37 °С в течение 3,5 ч вызвала их активацию, что было доказано увеличением поверхностной экспрессии активного интегрин Mac-1 (CD11b), измеренной с помощью проточной цитометрии (рис. 2). В пределах гейта нейтрофилов (CD16⁺ сигналов, принятых за 100%) средняя

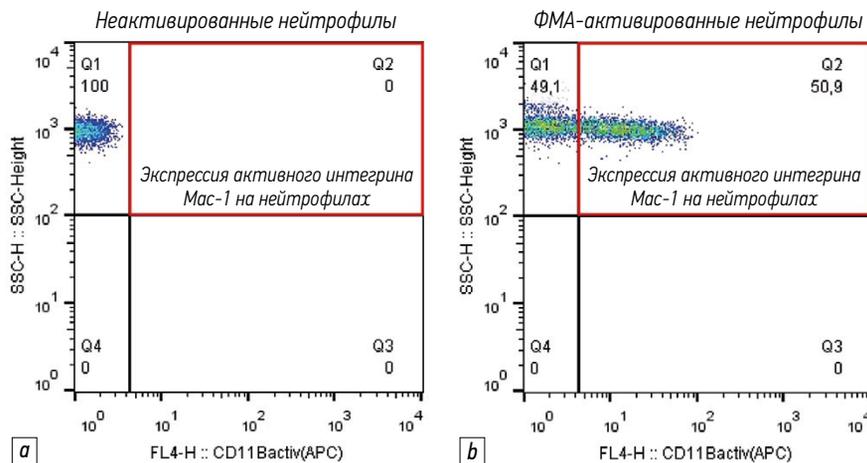


Рис. 2. Репрезентативные точечные диаграммы проточной цитометрии неактивированных и форбол-12-миристат-13-ацетат (ФМА)-активированных препаратов изолированных нейтрофилов: *a* — в контрольном препарате неактивированных нейтрофилов (Q2) не наблюдается экспрессии активного Мас-1 (CD11b); *b* — в препарате нейтрофилов, инкубированных с ФМА, выявляется большая доля CD11b⁺ нейтрофилов, экспрессирующих активный Мас-1 (Q2). Для обоих образцов анализ проводили в пределах гейта для нейтрофилов, принимая абсолютное количество CD16⁺ сигналов за 100%.

Fig. 2. Representative flow cytometry dot plots of nonactivated and phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)-activated preparations of isolated neutrophils: *a*, in the control preparation of nonactivated neutrophils (Q2), no expression of active Mac-1 (CD11b) is observed; *b*, in the preparation of neutrophils incubated with PMA, a larger proportion of CD11b⁺ neutrophils expressing active Mac-1 (Q2) is detected. For both samples, analysis was performed within the neutrophil gate, with the absolute number of CD16⁺ signals taken as 100%.

доля нейтрофилов, экспрессирующих активный CD11b, в контрольных необработанных образцах составила всего $0,9 \pm 1,3\%$ (рис. 2, *a*), в то время как в образцах, обработанных ФМА, средняя доля нейтрофилов, экспрессирующих активный интегрин Мас-1, достигла $49 \pm 16\%$ ($p=0,03$) (рис. 2, *b*), что указывает на сильную активацию нейтрофилов под действием ФМА. НВЛ не определялись на дот-плотах, поскольку они не несут антигена CD16.

Важнее всего, что в условиях эксперимента ФМА-активированные нейтрофилы образовывали НВЛ, которые были визуализированы как (иммуно)гистохимически после окрашивания на гистоны и ДНК (рис. 3, *a–c*), так и с помощью сканирующей электронной микроскопии (рис. 3, *d–g*). В качестве достоверного признака нетоза (образования НВЛ) в препаратах активированных нейтрофилов специфические для НВЛ цитруллинированные гистоны H3 и ДНК были отчётливо видны в виде внеклеточных структур (см. рис. 3, *a–c*). Сканирующая электронная микроскопия зафиксировала раннюю стадию нетоза с формирующейся начальной структурой НВЛ (см. рис. 3, *d*), а также завершающую фазу, когда внеклеточные НВЛ не были связаны с нейтрофилом (рис. 3, *e*). НВЛ удалось визуализировать не только среди активированных нейтрофилов, но и в надосадке препарата нейтрофилов, обработанных ФМА (рис. 3, *f, g*). Примечательно, что сканирующая электронная микроскопия выявила выраженную пористость плазматической мембраны ФМА-активированных нейтрофилов (см. рис. 3, *d*), что подтверждает способность неконденсированного хроматина (структурная основа НВЛ) выходить через эти

поры во внеклеточное пространство, как было показано ранее другими исследователями [16, 17].

Ключевая роль нейтрофильных внеклеточных ловушек в реализации влияния активированных нейтрофилов на ретракцию сгустка

Чтобы установить, что наблюдаемые эффекты активированных нейтрофилов на ретракцию сгустка обусловлены наличием НВЛ в препаратах нейтрофилов, мы визуализировали НВЛ в составе фибриновых сгустков, сформированных в присутствии активированных нейтрофилов. Эксперименты для сканирующей электронной микроскопии проводили в PFP, а не в PRP, поскольку присутствие тромбоцитов препятствует визуализации НВЛ и их взаимодействию с волокнами фибрина. Рис. 4 прямо доказывает, что НВЛ интегрированы в структуру сгустка, поскольку НВЛ визуализируются гистологически как с флуоресценцией, так и без неё (рис. 4, *a–f*). НВЛ обнаруживаются также при сканирующей электронной микроскопии сгустков (рис. 4, *g, h*), хотя отчётливо разграничить фибриллярные структуры хроматина и фибрина не всегда возможно [18]. Эти данные указывают на то, что свёртывание крови в присутствии нейтрофилов, предварительно активированных ФМА, приводит к встраиванию НВЛ в сгусток, что даёт веские основания предположить, что стимулирующее влияние активированных нейтрофилов на сжатие сгустка связано именно с наличием НВЛ.

Предположение о ключевой роли НВЛ в усилении ретракции сгустка было подтверждено экспериментами, в которых НВЛ внутри сгустка разрушали путём

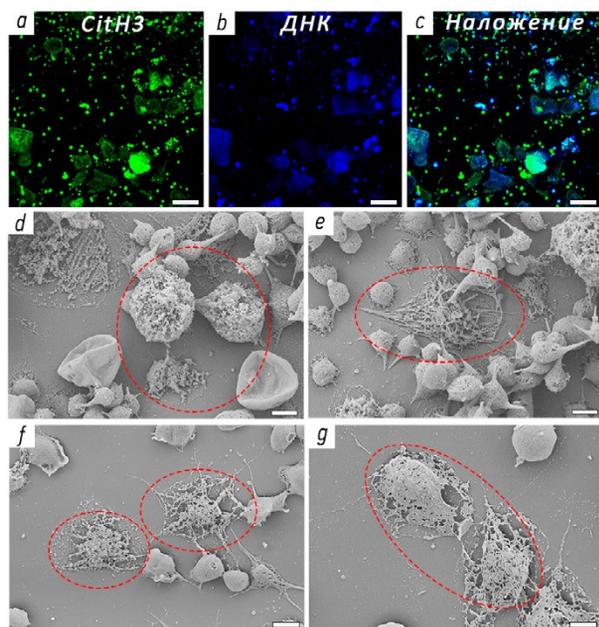


Рис. 3. Визуализация нейтрофильных внеклеточных ловушек, образованных форбол-12-миристант-13-ацетат (ФМА)-активированными нейтрофилами, с помощью иммуногистохимии и сканирующей электронной микроскопии: *a–c* — флуоресцентные микрофотографии препарата нейтрофилов, инкубированных с ФМА, с окраской на цитруллинированные гистоны CitH3 (зелёный) и ДНК (синий) для визуализации нейтрофилов и нейтрофильных внеклеточных ловушек. Изображения CitH3 (*a*), ДНК (*b*) и их наложение (*c*). *d, e* — репрезентативные сканирующие электронограммы: начальная стадия образования нейтрофильной внеклеточной ловушки, сохраняющей физическую связь с клеткой (*d*), и нейтрофильная внеклеточная ловушка, отделившаяся от нейтрофила (*e*). *f, g* — нейтрофильные внеклеточные ловушки, высвобождаемые активированными нейтрофилами, в надосадке с последующим осаждением на покровном стекле (внутри пунктирных овалов). Линейки: 50 мкм (*a–c*) и 2 мкм (*d–g*).

Fig. 3. Visualization of neutrophil extracellular traps formed by phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)-activated neutrophils using immunohistochemistry and scanning electron microscopy: *a–c*, Fluorescence micrographs of a preparation of neutrophils incubated with PMA with staining for citrullinated histones (CitH3; green) and DNA (blue). Images of CitH3 (*a*), DNA (*b*), and their overlay (*c*). *d, e*, Representative scanning electron micrographs: early stage of formation of a neutrophil extracellular trap that maintains a physical connection with the cell (*d*) and a neutrophil extracellular trap that has detached from the neutrophil (*e*). *f, g*, Neutrophil extracellular traps released by activated neutrophils into the supernatant, followed by deposition on a coverslip (within dashed ovals). Scale bars: 50 μm (*a–c*) and 2 μm (*d–g*).

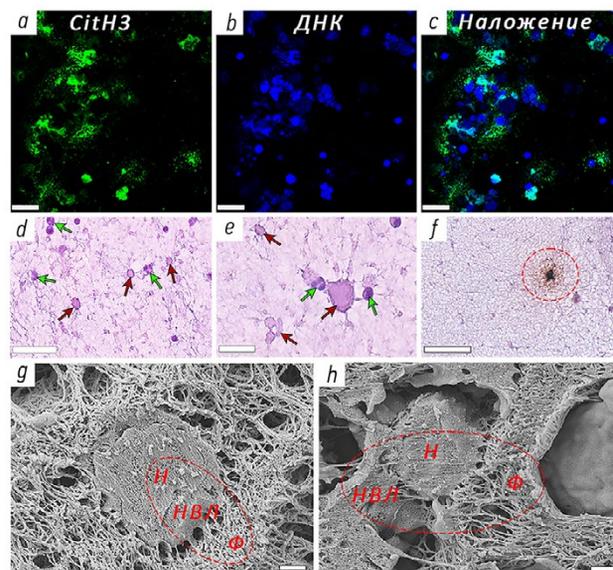


Рис. 4. Визуализация нейтрофильных внеклеточных ловушек (НВЛ), образованных из форбол-12-миристант-13-ацетат (ФМА)-активированных нейтрофилов и выявляемых в составе сгустков, образованных в плазме крови (бестромбоцитарной плазме для сканирующей электронной микроскопии): *a–c* — флуоресцентная микроскопия сгустков, содержащих активированные нейтрофилы и окрашенные на цитруллинированные гистоны CitH3 (*a*), ДНК (*b*) и их наложение (*c*). *d, e* — неактивированные сегментоядерные нейтрофилы (зелёные стрелки) и активированные безъядерные нейтрофилы неправильной формы с нечёткими клеточными мембранами и/или перичеселлюлярными структурами (красные стрелки); гематоксилин и эозин. *f* — активированные нейтрофилы в сгустке, окрашенные на цитруллинированные гистоны CitH3 (красный пунктирный круг) для визуализации ядра и перичеселлюлярного неконденсированного хроматина (нейтрофильных внеклеточных ловушек); докрасивание гематоксилином. *g, h* — сканирующие электронограммы сгустков из бестромбоцитарной плазмы с активированными нейтрофилами (*Н*) и окружающими фибриллярными структурами, состоящими из нейтрофильных внеклеточных ловушек и фибрина (*Ф*). Линейки: 20 мкм (*a–c*), 50 мкм (*d, f*), 25 мкм (*e*) и 1 мкм (*g, h*).

Fig. 4. Visualization of neutrophil extracellular traps (NETs) formed by phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)-activated neutrophils and detected within clots formed in blood plasma (platelet-free plasma for scanning electron microscopy): *a–c*, Fluorescence microscopy of clots containing activated neutrophils stained for citrullinated histones (CitH3) (*a*), DNA (*b*), and their overlay (*c*). *d, e*, Nonactivated segmented neutrophils (green arrows) and activated anucleate neutrophils of irregular shape with indistinct cell membranes and/or pericellular structures (red arrows); hematoxylin and eosin. *f*, Activated neutrophils in the clot stained for citrullinated histones (CitH3; red dashed circle) to visualize the nucleus and pericellular decondensed chromatin (NETs); counterstaining with hematoxylin. *g, h*, Scanning electron micrographs of clots formed in platelet-free plasma containing activated neutrophils (*N*) and surrounding fibrillar structures composed of NETs and fibrin (*F*). Scale bars: 20 μm (*a–c*), 50 μm (*d, f*), 25 μm (*e*), and 1 μm (*g, h*).

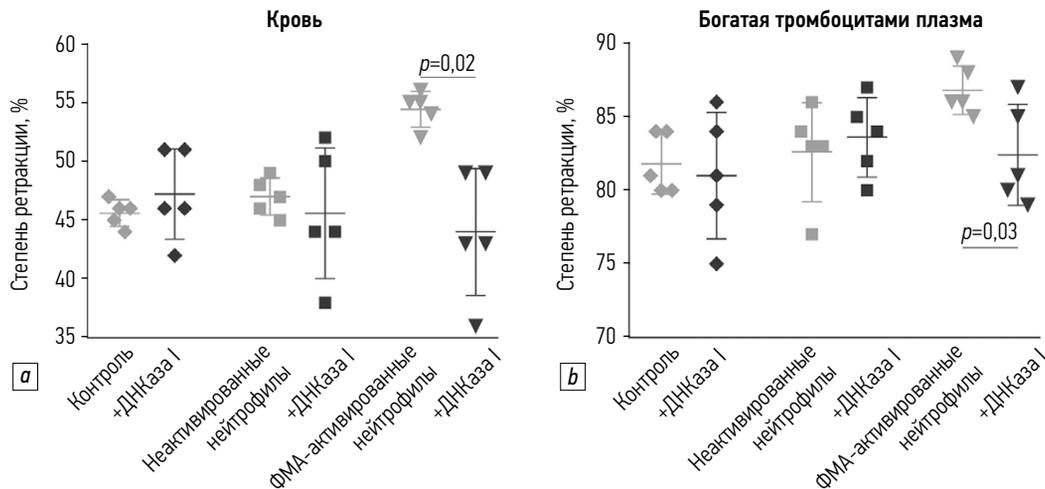


Рис. 5. Влияние дезоксирибонуклеазы (ДНКазы) I на конечную степень ретракции сгустка в цельной крови (а) и PRP (богатой тромбоцитами плазме) (b) в отсутствие (контроль) и в присутствии неактивированных или фобол-12-миристат-13-ацетат (ФМА)-активированных нейтрофилов. Образование и ретракцию сгустка инициировали добавлением 1 МЕ/мл тромбина с последующей оптической регистрацией размера сгустка. Конечную степень ретракции и другие кинетические параметры (см. табл. 2, 3) измеряли в сгустках, сформированных в образцах цельной крови (n=5) и PRP (n=5), полученных от независимых доноров. Результаты представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение. Для сравнения средних использовали парный t-критерий Стьюдента.

Fig. 5. Effect of deoxyribonuclease (DNase) I on the final degree of clot retraction in whole blood (a) and platelet-rich plasma (PRP) (b) in the absence (control) and presence of nonactivated or phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)-activated neutrophils. Clot formation and retraction were initiated by adding thrombin at 1 IU/mL, followed by optical recording of the clot size. The final degree of retraction and other kinetic parameters (see Tables 2 and 3) were measured in clots formed in samples of whole blood (n = 5) and PRP (n = 5) obtained from independent donors. Results are presented as mean \pm SD. Paired Student's *t*-test was used to compare means.

ферментативного расщепления ДНКазой I. Влияние ДНКазы I на ретракцию сгустка в отсутствие или в присутствии ФМА-активированных нейтрофилов продемонстрировано как в цельной крови (рис. 5, а; табл. 2), так и в PRP (рис. 5, b; табл. 3). Сама по себе ДНКаза I не вызвала видимых изменений, но полностью устраняла стимулирующий эффект активированных нейтрофилов на среднюю скорость ретракции и конечную степень сжатия сгустка в цельной крови (см. рис. 5, а; см. табл. 2). Аналогичный ингибирующий эффект ДНКазы I на ретракцию сгустка наблюдался в сгустках из PRP, содержащих активированные нейтрофилы, что заметно по конечной степени сжатия сгустка и площади под кинетической кривой (см. рис. 5, b; см. табл. 3). Таким образом, стимулирующие эффекты активированных нейтрофилов на ретракцию сгустка связаны именно с НВЛ в составе сгустков крови или плазмы.

ОБСУЖДЕНИЕ

Воспалительный тромбоз, или имунотромбоз, является угрожающим жизни осложнением, при котором сочетанная патологическая активация иммунной и свёртывающей систем крови приводит к формированию обструктивных тромбов с выраженным воспалительным компонентом [19]. Клиническое течение и исходы, а также эффективность лечения имунотромбоза в значительной степени определяются составом и динамическими свойствами образовавшегося тромба, такими

как механическая стабильность, проницаемость и чувствительность к лизису [20]. Одним из основных процессов, определяющих эти свойства, считается созревание и ремоделирование тромба, то есть его ретракция [11, 13]. Хотя важная роль тромбоцитов, эритроцитов и плазменных белков в модуляции ретракции сгустка крови известна [14], влияние лейкоцитов, особенно активированных нейтрофилов, встроенных в структуру сгустка крови, оставалось неясным. Для изучения проблемы мы использовали модель обогащения сгустков крови или плазмы активированными нейтрофилами, что позволило нам проанализировать, как именно локальное воспаление влияет на процесс ретракции сгустка.

Главный вывод состоит в том, что воспалительные клетки усиливают ретракцию сгустков крови, и этот эффект напрямую связан с образованием НВЛ, встроенных в фибриновую сеть. Этот вывод основан на том, что ретракция сгустка существенно усиливается в присутствии ФМА-стимулированных нейтрофилов (см. рис. 1; см. табл. 1), продуцирующих внеклеточные ловушки, которые представляют собой неконденсированный хроматин, состоящий из ДНК и гистонов (см. рис. 3, 4). С помощью гистохимических методов (см. рис. 4, а–f) и сканирующей электронной микроскопии (см. рис. 4, g, h) мы прямо показали, что НВЛ инкорпорированы в структуру фибринового сгустка. Примечательно, что стимулирующий эффект ФМА-активированных нейтрофилов на ретракцию сгустка как в цельной крови, так и в PRP (см. рис. 5;

Таблица 2. Влияние дезоксирибонуклеазы (ДНКазы) I на кинетику ретракции сгустка в цельной крови без добавления (контроль) и с добавлением неактивированных или фобол-12-миристан-13-ацетат (ФМА)-активированных нейтрофилов

Table 2. Effect of deoxyribonuclease (DNase) I on the kinetics of clot retraction in whole blood without addition (control) and with addition of nonactivated or phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)-activated neutrophils

Параметры ретракции сгустка	Контроль	+ДНКазы I	Неактивированные нейтрофилы	+ДНКазы I	Активированные нейтрофилы	+ДНКазы I
Конечная степень ретракции (%)	46±1	47±4	47±2	46±6	54±2	44±5
<i>p</i>		0,4		0,5		0,02
Лаг-период, с	60±31	48±22	55±25	100±52	28±12	36±13
<i>p</i>		0,6		0,04		0,2
Площадь под кинетической кривой (у. е.)	382±26	395±73	374±65	363±80	438±44	354±56
<i>p</i>		0,8		0,8		0,07
Средняя скорость, %/с	0,036±0,002	0,038±0,002	0,036±0,005	0,037±0,004	0,041±0,002	0,035±0,004
<i>p</i>		0,5		0,8		0,04

Примечание. Результаты представлены как среднее значение ± стандартное отклонение (n=5). Парный *t*-критерий Стьюдента. Полужирным шрифтом выделены значимые значения.

Таблица 3. Влияние дезоксирибонуклеазы (ДНКазы) I на кинетику ретракции сгустка в богатой тромбоцитами плазме (PRP) без добавления (контроль) и с добавлением неактивированных или фобол-12-миристан-13-ацетат (ФМА)-активированных нейтрофилов

Table 3. Effect of deoxyribonuclease (DNase) I on the kinetics of clot retraction in platelet-rich plasma (PRP) without addition (control) and with addition of nonactivated or phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)-activated neutrophils

Параметры ретракции сгустка	Контроль	+ДНКазы I	Неактивированные нейтрофилы	+ДНКазы I	Активированные нейтрофилы	+ДНКазы I
Конечная степень ретракции (%)	82±2	81±4	83±3	84±3	87±2	82±3
<i>p</i>		0,7		0,6		0,03
Лаг-период, с	109±15	150±69	130±52	105±12	135±39	180±40
<i>p</i>		0,3		0,5		0,1
Площадь под кинетической кривой (у. е.)	716±32	655±105	699±110	727±51	703±69	630±82
<i>p</i>		0,2		0,6		0,01
Средняя скорость, %/с	0,067±0,002	0,066±0,004	0,068±0,002	0,069±0,002	0,073±0,009	0,067±0,003
<i>p</i>		0,6		0,7		0,09

Примечание. Результаты представлены как среднее значение ± стандартное отклонение (n=5). Парный *t*-критерий Стьюдента.

см. табл. 2, 3) полностью устранялся после предварительной обработки ДНКазой I, катализирующей расщепление НВЛ. В совокупности эти результаты указывают на то, что НВЛ необходимы для стимуляции ретракции сгустка активированными нейтрофилами. Наши результаты согласуются с данными литературы, согласно которым НВЛ — это не просто структурные компоненты сгустков крови, но и активные участники формирования стабильных тромбов при различных протромботических состояниях [9, 21, 22]. Исследование механизмов, лежащих в основе усиления ретракции сгустков крови под действием НВЛ, является направлением будущих исследований.

Усиленная ретракция сгустка под влиянием активированных нейтрофилов и НВЛ имеет важные патофизиологические последствия, затрагивающие ключевые патогенные свойства тромбов, такие как обструктивность, чувствительность к фибринолизу и эмбологенность.

Во-первых, усиленная ретракция потенциально уменьшает общий объём сгустка, тем самым снижая степень сосудистой окклюзии. Это актуально для воспалительного венозного тромбоза, где уплотнение тромба может снижать степень обструкции кровотока по сравнению с объёмными тромбами [23]. Во-вторых, известно, что уплотнение фибрина во время ретракции сгустка повышает его чувствительность к эндогенному, физиологическому фибринолизу благодаря конденсации фибриновых волокон и увеличению соотношения количества тканевого активатора плазминогена к фибрину [24]. Это даёт основание предполагать, что усиленная ретракция воспалительных тромбов ускоряет естественный фибринолиз, способствуя более быстрому разрешению и тромба, и реканализации сосуда [25]. Последнее подтверждается данными, согласно которым фибриновая сеть, богатая НВЛ, расщепляется плазмином, что указывает на способность

воспалительного тромбоза к самоограничению [26]. В-третьих, эмбологенность воспалительных тромбов потенциально снижена, поскольку сжатый сгусток крови механически стабилен и меньше предрасположен к разрыву и фрагментации [12, 27]. По совокупности данных итоговая усиленная НВЛ-ретракция сгустков крови может снижать риск тромботической эмболии и способствовать растворению тромба [8, 28], несмотря на то, что системное воспаление создаёт гиперкоагуляционный фон, способствуя тромбообразованию.

Тяжесть локального воспаления и, следовательно, степень вовлечённости активированных нейтрофилов и НВЛ имеют большое клиническое значение для эффективности лечения. Наши данные позволяют предположить, что усиленное сжатие воспалительных окклюзирующих тромбов, приводящее к их уплотнению, понижает чувствительность к тромболитической терапии и механической тромбэктомии. Низкая порозность богатых НВЛ тромбов может снижать эффективность терапевтического тромболитизиса, поскольку сжатые сгустки менее проницаемы для экзогенных фибринолитических ферментов [24, 26, 29]. Поскольку усиление ретракции способствует повышению механической прочности и жёсткости тромбов [30, 31], механическая тромбэктомия также может быть затруднена.

Учитывая особенности механической и структурной перестройки воспалительных тромбов, оценка уровня растворимых биомаркёров НВЛ в крови [32] и/или разработка методов визуализации для обнаружения богатых НВЛ тромбов [33, 34] могут улучшить диагностику и помочь прогнозированию рисков при иммунотромбозе. Потенциально адьювантная терапия, направленная на расщепление НВЛ с помощью ДНКазы I или подавление нетоза ингибиторами пептидиларгининдеиминазы 4-го типа (PAD4 — фермента, катализирующего цитруллинирование гистонов H3, необходимого для нетоза [35, 36]) могла бы улучшить исходы иммунотромбоза, повысив эффективность терапевтического тромболитизиса и механической тромбэктомии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Иммунотромбоз сопровождается ускорением и усилением ретракции сгустков крови под действием активированных нейтрофилов, и этот эффект обусловлен формированием нейтрофильных внеклеточных ловушек, встроенных в фибриновую сеть. Полученные результаты позволяют предположить, что представления о воспалительном тромбозе, осложняющем течение многих инфекционных и аутоиммунных заболеваний, могут нуждаться в пересмотре и разработке новых подходов к лечению с учётом предрасположенности воспалительных тромбов к усиленной ретракции.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Вклад авторов. С.Ш.М. — проведение исследования, работа с данными, анализ данных; Х.А.И. — проведение исследования, работа с данными; Х.Р.Р. — анализ данных, валидация, визуализация, написание черновика рукописи; Х.А.Н. — пересмотр и редактирование рукописи; Л.Р.И. — определение концепции, валидация, пересмотр и редактирование рукописи. Все авторы одобрили рукопись (версию для публикации), а также согласились нести ответственность за все аспекты настоящей работы, гарантируют надлежащее рассмотрение и решение вопросов, связанных с точностью и добросовестностью любой её части.

Этическая экспертиза. Все процедуры с участием людей были одобрены локальным этическим комитетом Казанского федерального университета (протокол № 53 от 26.02.2025). От всех участников исследования получено подписанное информированное добровольное согласие на участие в исследовании, включая использование полученных в исследовании материалов. Исследование и его протокол не регистрировали.

Источники финансирования. Исследование выполнено за счёт гранта Российского научного фонда и Академии наук Республики Татарстан по проекту № 25-25-20017 (<https://rscf.ru/project/25-25-20017/>). Российский научный фонд и Академия наук Республики Татарстан не участвовали в организации, планировании и проведении исследования, сборе, хранении, анализе и интерпретации данных, подготовке рукописи и принятии решения о её публикации, а также в осуществлении надзора за исследованием. Источник финансирования не накладывал ограничения на использование данных и распространение результатов исследования.

Раскрытие интересов. Авторы заявляют об отсутствии отношений, деятельности и интересов за последние три года, связанных с третьими лицами (коммерческими и некоммерческими организациями), интересы которых могут быть затронуты содержанием статьи.

Оригинальность. При проведении исследования и создании настоящей статьи авторы не использовали ранее полученные и опубликованные сведения (данные, текст, иллюстрации).

Доступ к данным. Все данные, полученные в настоящем исследовании, представлены в статье.

Генеративный искусственный интеллект. При создании настоящей статьи технологии генеративного искусственного интеллекта не использовались.

Рассмотрение и рецензирование. Настоящая работа подана в журнал в инициативном порядке и рассмотрена по обычной процедуре. В рецензировании участвовали два внешних рецензента, член редакционной коллегии и научный редактор издания.

ADDITIONAL INFORMATION

Author contributions: S.Sh.M.: investigation, data curation, formal analysis; Kh.A.I.: investigation, data curation; Kh.R.R.: formal analysis, validation, visualization, writing—original draft; Kh.A.N.: writing—review & editing; L.R.I.: conceptualization, validation, writing—review & editing. All the authors approved the version of the manuscript to be published and agreed to be accountable for all aspects of the work, ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

Ethics approval: All human-related procedures were approved by the Local Ethics Committee of Kazan Federal University (Minutes No. 53, dated February 26, 2025). All participants provided written informed consent to participate in the study including the use of study data. The study and its protocol were not registered.

Funding sources: The study was supported by a grant from the Russian Science Foundation and the Academy of Sciences of the Republic of Tatarstan under project No. 25-25-20017 (<https://rscf.ru/project/25-25-20017/>). The Russian Science Foundation and the Academy

of Sciences of the Republic of Tatarstan were not involved in the study organization, planning, execution, or supervision; data collection, storage, analysis, or interpretation; manuscript preparation, or making the decision to submit it for publication. The funding source imposed no restrictions on data utilization or dissemination of study findings.

Disclosure of interests: The authors have no relationships, activities, or interests for the last three years related to for-profit or not-for-profit third parties whose interests may be affected by the content of the article.

Statement of originality: No previously obtained or published material (text, images, or data) was used in this study or article.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

- Slukhanchuk EV, Bitsadze VO, Solopova AG, et al. Immunothrombosis in cancer patients: contribution of neutrophil extracellular traps, ADAMTS-13 and von Willebrand factor. *Obstetrics, Gynecology and Reproduction*. 2022;16(6):648–663. doi: 10.17749/2313-7347/ob.gyn.rep.2022.364 EDN: FIYEKE
- Engelmann B, Massberg S. Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity. *Nat Rev Immunol*. 2013;13(1):34–45. doi: 10.1038/nri3345
- Rudd KE, Johnson SC, Agesa KM, et al. Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990–2017: analysis for the Global Burden of Disease Study. *Lancet*. 2020;395(10219):200–211. doi: 10.1016/S0140-6736(19)32989-7 EDN: JGNMNL
- Khismatullin RR, Ivaeva RA, Abdullayeva S, et al. Pathological manifestations of inflammatory microthrombosis in COVID-19. *Kazan medical journal*. 2022;103(4):575–586. doi: 10.17816/KMJ2022-575 EDN: GWVGLX
- Duarte-García A, Pham MM, Crowson CS, et al. The Epidemiology of Antiphospholipid Syndrome: A Population-Based Study. *Arthritis Rheumatol*. 2019;71(9):1545–1552. doi: 10.1002/art.40901
- Jorge A, Wallace ZS, Lu N, et al. Renal Transplantation and Survival Among Patients With Lupus Nephritis: A Cohort Study. *Ann Intern Med*. 2019;170(4):240–247. doi: 10.7326/M18-1570
- Holmqvist ME, Neovius M, Eriksson J, et al. Risk of venous thromboembolism in patients with rheumatoid arthritis and association with disease duration and hospitalization. *JAMA*. 2012;308(13):1350–1356. doi: 10.1001/2012.jama.11741
- Fuchs TA, Brill A, Duerschmied D, et al. Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(36):15880–15885. doi: 10.1073/pnas.1005743107
- Martinod K, Wagner DD. Thrombosis: tangled up in NETs. *Blood*. 2014;123(18):2768–2776. doi: 10.1182/blood-2013-10-463646
- Litvinov RI, Peshkova AD. Contraction of blood clots and thrombi: pathogenic and clinical significance. *Almanac of Clinical Medicine*. 2018;46(7):662–671. doi: 10.18786/2072-0505-2018-46-7-662-671 EDN: VNTSCI
- Cines DB, Lebedeva T, Nagaswami C, et al. Clot contraction: compression of erythrocytes into tightly packed polyhedra and redistribution of platelets and fibrin. *Blood*. 2014;123(10):1596–1603. doi: 10.1182/blood-2013-08-523860
- Khismatullin RR, Abdullayeva S, Peshkova AD, et al. Extent of intravital contraction of arterial and venous thrombi and pulmonary emboli. *Blood Adv*. 2022;6(6):1708–1718. doi: 10.1182/bloodadvances.2021005801 EDN: GYROXU
- Litvinov RI, Weisel JW. Blood clot contraction: Mechanisms, pathophysiology, and disease. *Res Pract Thromb Haemost*. 2022;7(1):100023. doi: 10.1016/j.rpth.2022.100023 EDN: RVAOAD
- Tutwiler V, Litvinov RI, Lozhkin AP, et al. Kinetics and mechanics of clot contraction are governed by the molecular and cellular composition of the blood. *Blood*. 2016;127(1):149–159. doi: 10.1182/blood-2015-05-647560 EDN: WPLPOR
- Lozhkin AP, Peshkova AD, Ataullakhanov FI, Litvinov RI. Development and applications of a new technique to study blood clot contraction (retraction). *Genes & Cells*. 2014;9(3):99–104. doi: 10.23868/gc120329 EDN: TVTSOX
- Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol*. 2007;176(2):231–241. doi: 10.1083/jcb.200606027
- Muraro SP, De Souza GF, Gallo SW, et al. Respiratory Syncytial Virus induces the classical ROS-dependent NETosis through PAD-4 and necroptosis pathways activation. *Sci Rep*. 2018;8(1):14166. doi: 10.1038/s41598-018-32576-y EDN: YIUCHR
- Onouchi T, Shiogama K, Matsui T, et al. Visualization of Neutrophil Extracellular Traps and Fibrin Meshwork in Human Fibrinopurulent Inflammatory Lesions: II. Ultrastructural Study. *Acta Histochem Cytochem*. 2016;49(4):117–123. doi: 10.1267/ahc.16016 EDN: XUCQHL
- Stark K, Massberg S. Interplay between inflammation and thrombosis in cardiovascular pathology. *Nat Rev Cardiol*. 2021;18(9):666–682. doi: 10.1038/s41569-021-00552-1 EDN: JVTDFY
- Weisel JW, Litvinov RI. Exploring the thrombus niche: lessons learned and potential therapeutic opportunities. *Blood*. 2025;146(12):1389–1399. doi: 10.1182/blood.2024025319 EDN: SXSKQX
- Thâlin C, Hisada Y, Lundström S, et al. Neutrophil Extracellular Traps: Villains and Targets in Arterial, Venous, and Cancer-Associated Thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2019;39(9):1724–1738. doi: 10.1161/ATVBAHA.119.312463
- Savchenko AS, Martinod K, Seidman MA, et al. Neutrophil extracellular traps form predominantly during the organizing stage of human venous thromboembolism development. *J Thromb Haemost*. 2014;12(6):860–870. doi: 10.1111/jth.12571
- Wakefield TW, Myers DD, Henke PK. Mechanisms of venous thrombosis and resolution. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008;28(3):387–391. doi: 10.1161/ATVBAHA.108.162289
- Tutwiler V, Peshkova AD, Le Minh G, et al. Blood clot contraction differentially modulates internal and external fibrinolysis. *J Thromb Haemost*. 2019;17(2):361–370. doi: 10.1111/jth.14370 EDN: WUOODE
- Henke PK, Wakefield T. Thrombus resolution and vein wall injury: dependence on chemokines and leukocytes. *Thromb Res*. 2009;123 Suppl 4:S72–S78. doi: 10.1016/S0049-3848(09)70148-3
- Longstaff C, Varjú I, Sótönyi P, et al. Mechanical stability and fibrinolytic resistance of clots containing fibrin, DNA, and histones. *J Biol Chem*. 2013;288(10):6946–6956. doi: 10.1074/jbc.M112.404301
- Bredikhin RA, Peshkova AD, Maliasev DV, et al. Decreased retraction of blood clots in patients with venous thromboembolic complications. *Angiology and vascular surgery. Journal named after academician A.V. Pokrovsky*. 2018;24(1):21–28. EDN: YSIUYR
- Gould TJ, Vu TT, Swystun LL, et al. Neutrophil extracellular traps promote thrombin generation through platelet-dependent and platelet-independent mechanisms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014;34(9):1977–1984. doi: 10.1161/ATVBAHA.114.304114
- Varjú I, Longstaff C, Szabó L, et al. DNA, histones and neutrophil extracellular traps exert anti-fibrinolytic effects in a plasma environment. *Thromb Haemost*. 2015;113(6):1289–1298. doi: 10.1160/TH14-08-0669 EDN: USDEHH
- Litvinov RI, Weisel JW. Fibrin mechanical properties and their structural origins. *Matrix Biol*. 2017;60–61:110–123. doi: 10.1016/j.matbio.2016.08.003 EDN: YDSSWP
- Wufsus AR, Macera NE, Neeves KB. The hydraulic permeability of blood clots as a function of fibrin and platelet density. *Biophys J*. 2013;104(8):1812–1823. doi: 10.1016/j.bpj.2013.02.055
- Borisoff JI, Joosen IA, Versteylen MO, et al. Elevated levels of circulating DNA and chromatin are independently associated with severe coronary

atherosclerosis and a prothrombotic state. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013;33(8):2032–2040. doi: 10.1161/ATVBAHA.113.301627

33. Knight JS, Luo W, O'Dell AA, et al. Peptidylarginine deiminase inhibition reduces vascular damage and modulates innate immune responses in murine models of atherosclerosis. *Circ Res.* 2014;114(6):947–956. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.114.303312

34. Laridan E, Martinod K, De Meyer SF. Neutrophil Extracellular Traps in Arterial and Venous Thrombosis. *Semin Thromb Hemost.* 2019;45(1):86–93. doi: 10.1055/s-0038-1677040 EDN: FMZXLX

ОБ АВТОРАХ

* **Хисматуллин Рафаэль Рафикович**, канд. мед. наук, доцент, каф. морфологии и общей патологии, научный сотрудник; врач-патологоанатом, патологоанатомическое отд.; адрес: Россия, 420141, Казань, ул. академика Завойского, д. 5, кв. 123;
ORCID: 0000-0001-8597-811X;
eLibrary SPIN: 2802-2405;
e-mail: rafael.khismatullin@gmail.com

Сяляхутдинова Шахноза Матмуратовна, преподаватель, каф. морфологии и общей патологии, младший научный сотрудник;
ORCID: 0000-0002-7647-2966;
eLibrary SPIN: 9591-6695;
e-mail: abdullayevashahnoza026@gmail.com

Хабирова Алина Ильшатовна, ассистент, каф. морфологии и общей патологии, младший научный сотрудник;
ORCID: 0000-0002-7243-8832;
eLibrary SPIN: 8388-2197;
e-mail: alina.urussu.95@gmail.com

Хузиахмедов Анвар Наилевич, канд. мед. наук, врач — сердечно-сосудистый хирург, отд. сосудистой хирургии № 1; старший преподаватель, каф. хирургических болезней постдипломного образования;
ORCID: 0000-0002-7606-1323;
eLibrary SPIN: 5780-3582;
e-mail: ava23@mail.ru

Литвинов Рустем Игоревич, д-р мед. наук, профессор, старший исследователь, Департамент клеточной биологии Медицинского факультета;
ORCID: 0000-0003-0643-1496;
eLibrary SPIN: 1327-1641;
e-mail: rustempa@gmail.com

35. Sabnis RW. Novel Peptidylarginine Deiminase Type 4 (PAD4) Inhibitors. *ACS Med Chem Lett.* 2022;13(10):1537–1538. doi: 10.1021/acsmchemlett.2c00387 EDN: TBGUOB

36. Aiken SG, Grimes T, Munro S, et al. A patent review of peptidylarginine deiminase 4 (PAD4) inhibitors (2014–present). *Expert Opin Ther Pat.* 2025;35(6):611–621. doi: 10.1080/13543776.2025.2484366

AUTHORS INFO

* **Rafael R. Khismatullin**, MD, Cand. Sci. (Medicine), Assistant Professor, Depart. of Morphology and General Pathology, pathologist, pathological anatomy depart.; address: 5 Academician Zavoisky st, apt 123, Kazan, Russia, 420141;
ORCID: 0000-0001-8597-811X;
eLibrary SPIN: 2802-2405;
e-mail: rafael.khismatullin@gmail.com

Shakhnoza M. Saliakhutdinova, Assistant Professor, Depart. of Morphology and General Pathology, junior research associate;
ORCID: 0000-0002-7647-2966;
eLibrary SPIN: 9591-6695;
e-mail: abdullayevashahnoza026@gmail.com

Alina I. Khabirova, Assistant Lecturer, Depart. of Morphology and General Pathology, junior research associate;
ORCID: 0000-0002-7243-8832;
eLibrary SPIN: 8388-2197;
e-mail: alina.urussu.95@gmail.com

Anvar N. Khuziakhmedov, MD, Cand. Sci. (Medicine), cardiovascular surgeon, Depart. of Vascular Surgery; Senior Lecturer, Depart. of Surgical Diseases of Postgraduate Education;
ORCID: 0000-0002-7606-1323;
eLibrary SPIN: 5780-3582;
e-mail: ava23@mail.ru

Rustem I. Litvinov, MD, Dr. Sci. (Medicine), Professor, Senior Research Investigator, Department of Cell and Developmental Biology, School of Medicine;
ORCID: 0000-0003-0643-1496;
eLibrary SPIN: 1327-1641;
e-mail: rustempa@gmail.com

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author