

Механизмы стимулирующего влияния нейтрофильных внеклеточных ловушек на ретракцию сгустков крови

Р.Р. Хисматуллин¹, Ш.М. Саляхутдинова¹, А.И. Хабирова¹, А.Н. Хузиахмедов^{1,2}, Р.И. Литвинов³

¹ФГАУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», Казань

²ГАЗУЗ «Городская клиническая больница №7 им. М.Н. Садыкова», Казань

³Пенсильванский университет, Филадельфия, Пенсильвания, США

Введение. Иммунный тромбоз существенно усугубляет течение и исходы воспалительных заболеваний. Иммунные тромбы содержат лейкоциты, прежде всего нейтрофилы, которые модулируют свойства тромбов, такие как устойчивость к лизису, механическая стабильность (эмбологенность) и др. Нами было показано, что активированные нейтрофилы усиливают сжатие (ретракцию) сгустков крови, однако пути и патогенетические последствия влияния воспалительных клеток на ретракцию сгустка неизвестны.

Цель исследования: установить механизмы стимулирующего влияния активированных нейтрофилов на скорость и полноту ретракции сгустков крови, опосредованной сокращением тромбоцитов.

Материалы и методы. Изолированные человеческие нейтрофилы активировали фторбол-12-миристан-13-ацетатом (ФМА). Индуцированные тромбоином сгустки формировали в цельной крови или богатой тромбоцитами плазме с добавлением неактивированных или ФМА-активированных нейтрофилов, образующих нейтрофильные внеклеточные ловушки (НВЛ). Кинетику ретракции сгустка регистрировали оптически, а его вязкоэластические свойства оценивали при помощи тромбоэластографии.

Результаты. ФМА-активированные нейтрофилы достоверно увеличивали скорость и конечную степень ретракции сгустка, и эти эффекты были обусловлены наличием НВЛ, которые обнаруживались в составе сгустков и расщепление которых устраняло стимулирующее влияние нейтрофилов. Экспериментально обнаруженные механизмы влияния НВЛ на ретракцию сгустков крови включали гиперстимуляцию тромбоцитов под действием эндогенного тромбина и/или изменение механических свойств сгустка. Так, ривароксабан (ингибитор фактора Ха) нейтрализовал стимулирующее влияние НВЛ на ретракцию сгустков в цельной крови и обогащенной тромбоцитами плазме, что указывает на важную роль образования активного тромбина и вторичной гиперактивации тромбоцитов в процессе ретракции. Кроме того, по данным тромбоэластографии в присутствии НВЛ сгустки были менее жесткими и, следовательно, легче подвергались компрессионной деформации.

Заключение. ФМА-активированные нейтрофилы в составе сгустков крови образуют НВЛ, которые встраиваются в фибриновую сеть и усиливают ретракцию сгустков благодаря 2 независимым механизмам: генерации эндогенного тромбина, вызывающего гиперактивацию тромбоцитов, и увеличению способности сгустка к механическому сжатию. Знание этих механизмов может облегчить разработку новых способов лечения имунотромбоза, основанных на модуляции образования НВЛ, а также их биологических и механических свойств, влияющих на ретракцию воспалительных сгустков крови и тромбов.

Ключевые слова: нейтрофилы, нейтрофильные внеклеточные ловушки, ретракция сгустка, имунотромбоз, воспалительный тромбоз

Хисматуллин Р.Р. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2025;24(4):83–94. DOI: 10.24287/j.1044

Mechanisms of the stimulatory effect of neutrophil extracellular traps on blood clot retraction

R.R. Khismatullin¹, Sh.M. Saliakhutdinova¹, A.I. Khabirova¹, A.N. Khuziakhmedov^{1,2}, R.I. Litvinov³

¹Kazan Federal University, Kazan

²The M.N. Sadykov City Clinical Hospital No.7, Kazan

³The University of Pennsylvania School of Medicine, Philadelphia, Pennsylvania, USA

Introduction. Immunothrombosis significantly exacerbates the course and outcomes of inflammatory diseases. Immune thrombi contain leukocytes, primarily neutrophils, that modulate their properties such as resistance to lysis, mechanical stability (embologenicity), and others. We have previously shown that activated neutrophils enhance clot contraction (retraction); however, the pathways and pathogenetic consequences of the influence of inflammatory cells on clot retraction remain unknown. **Aim:** to establish the mechanisms underlying the stimulatory effect of activated neutrophils on the rate and extent of blood clot retraction mediated by platelet contraction.

Materials and methods. Isolated human neutrophils were activated with phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA). Thrombin-induced clots were formed in whole blood or platelet-rich plasma with the addition of non-activated or PMA-activated neutrophils forming neutrophil extracellular traps (NETs). Clot retraction kinetics was tracked optically, and the viscoelastic properties of clots were measured using thromboelastography.

Results. PMA-activated neutrophils significantly increased the rate and the final extent of clot retraction. These effects were associated with the presence of NETs detected in the clots and their degradation which eliminated the stimulatory effect of neutrophils. The experimentally identified mechanisms of how NETs influence blood clot retraction included the hyperstimulation of platelets by endogenous thrombin and/or alterations in the mechanical properties of clots. Specifically, rivaroxaban, a factor

© 2025 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России

Поступила 16.10.2025

Принята к печати 27.10.2025



EDN: CXJIMQ

Контактная информация:

Хисматуллин Рафаэль Рафикович, канд. мед. наук, врач-патологоанатом, доцент кафедры морфологии и общей патологии Института фундаментальной медицины и биологии ФГАУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» Адрес: 420015, Казань, ул. Карла Маркса, 74 E-mail: rafael.khismatullin@gmail.com

© 2025 by «D. Rogachev NMRCPhOI»

Received 16.10.2025

Accepted 27.10.2025

Correspondence:

Rafael R. Khismatullin, Cand. Med. Sci., a pathologist, associate professor at the Department of Morphology and General Pathology of the Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan Federal University Address: 74 Karl Marx St., 420015 Kazan, Russia E-mail: rafael.khismatullin@gmail.com

Xa inhibitor, neutralized the stimulatory effect of NETs on clot and plasma retraction// on clot retraction both in whole blood and platelet-rich plasma, indicating the important role of active thrombin generation and secondary platelet hyperactivation in the process of retraction. Furthermore, according to the results of thromboelastography, in the presence of NETs clots were less stiff and, consequently, more susceptible to compressive deformation.

Conclusion. PMA-activated neutrophils within blood clots form NETs that incorporate into a fibrin network and enhance clot retraction via two independent mechanisms: the generation of endogenous thrombin causing platelet hyperactivation, and an increase in clot susceptibility to mechanical compression. Understanding these mechanisms may facilitate the development of novel treatments for immunothrombosis based on modulation of NETs formation, as well as on their biological and mechanical properties that influence the retraction of inflammatory blood clots and thrombi.

Keywords: neutrophils, neutrophil extracellular traps, clot retraction, immunothrombosis, inflammatory thrombosis

Khismatullin R.R. et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology 2025;24(4):83–94. DOI: 10.24287/j.1044

Воспалительный тромбоз патогенетически связывает между собой иммунную систему и систему гемостаза, играя важную роль в патогенезе многих воспалительных заболеваний различной этиологии. Инфекционные и другие иммуноопосредованные болезни широко распространены в нашей стране и во всем мире, являясь частой причиной инвалидизации и смерти пациентов [1, 2]. Тромбоз является угрожающим жизни состоянием при тяжелых инфекциях [3, 4], а также при многих аутоиммунных заболеваниях, при которых тромбоэмболические осложнения наблюдаются в несколько раз чаще, чем в общей популяции [5–7]. Иммунный тромбоз ассоциирован с активацией нейтрофилов и моноцитов, способствующих тромбообразованию, благодаря экспрессии и секреции прокоагулянтов, а также образованию нейтрофильных внеклеточных ловушек (НВЛ, neutrophil extracellular traps) [8]. Показано, что НВЛ способны усиливать как свертывание крови, так и локальные воспалительные реакции [9].

Важным патогенетическим механизмом тромбоза является процесс сжатия (ретракции) внутрисосудистого сгустка крови, который вызывается активированными тромбоцитами. Феномен ретракции сгустка отражает функциональную активность тромбоцитов и наблюдается не только *in vitro* [10], но и *in vivo* [11, 12], модулируя свойства прижизненных гемостатических сгустков и особенно тромбов. К таким свойствам относятся обструктивность тромбов, их проницаемость для фибринолитических ферментов, механическая жесткость и эмбологенность (устойчивость к разрыву), что в совокупности влияет на клиническое течение и исходы тромбоза [13]. Несмотря на клиническую значимость, взаимосвязь между ретракцией сгустков крови и воспалением изучена недостаточно.

Учитывая, что сжатие сгустка крови зависит от его клеточного состава [14], и принимая во внимание накопление нейтрофилов в составе воспалительных тромбов, ранее мы исследовали влияние активированных нейтрофилов на ретракцию сгустков крови [15]. Оказалось, что добавление в кровь активированных нейтрофилов сопровождается ускорением и усилением ретракции сгустков крови, и этот эффект тесно связан с внеклеточным деконденсированным ядерным хроматином (структурной основой НВЛ),

встроенным в фибриновую сеть, которая образует механический каркас сгустка.

Цель исследования – изучение механизмов стимулирующего влияния активированных нейтрофилов, прежде всего НВЛ, на скорость и степень ретракции сгустков крови, опосредованной тромбоцитами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Получение крови и ее компонентов

Для модельных экспериментов *in vitro* кровь была получена у 30 доноров, не принимавших антикоагулянты в течение 2 нед до взятия крови. Венозную кровь собирали в вакутейнеры (Vacuette, Greiner Bio-one), стабилизируя 3,2% цитратом натрия в соотношении 9:1 по объему. Богатую тромбоцитами плазму (platelet-rich plasma, PRP) получали центрифугированием крови при 200g в течение 10 мин. Часть крови была использована 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 500g в течение 35 мин. Собирали белое кольцо нейтрофилов и трижды промывали клетки буфером Хэнкса (HBSS), не содержащим ионы Ca^{2+} и Mg^{2+} , ресуспендируя и центрифугируя при 300g в течение 10 мин. Отмытые клетки ресуспендировали в 250 мкл HBSS. Число клеток определяли с помощью световой микроскопии в камере Горяева. Для образования НВЛ часть выделенных нейтрофилов активировали добавлением 100 нМ (конечная концентрация) форбол-12-миристан-13-ацетата (ФМА) и инкубировали 3,5 ч при 37°C в CO_2 -инкубаторе (New Brunswick Galaxy 170R, Marshall Scientific). Суспензию ФМА-активированных нейтрофилов использовали как источник НВЛ.

Метод изучения ретракции сгустков крови или плазмы

Ретракцию сгустков в цельной цитратной крови человека или PRP регистрировали оптически по

уменьшению размера сгустка в присутствии неактивированных или активированных нейтрофилов. Кинетику ретракции сгустка отслеживали с помощью «Регистратора 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 объема 200 мкл. Образцы активировали добавлением 2 мМ CaCl_2 и 1 МЕ/мл человеческого тромбина (Sigma-Aldrich) (конечные концентрации). Перед формированием сгустка активированные образцы крови или плазмы (80 мкл) переносили в прозрачные пластиковые кюветы, которые предварительно ополаскивали 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 анализировали с помощью компьютерной программы для построения кинетической кривой ретракции сгустка и извлечения кинетических параметров, описанных ранее [16].

Тромбоэластография

Тромбоэластограммы регистрировали с использованием прибора TEG 5000 (Haemoscope). Образцы цитратной крови или PRP смешивали либо с физиологическим раствором (контроль), либо с выделенными нейтрофилами (неактивированными или ФМА-активированными). Затем добавляли CaCl_2 (конечная концентрация 2 мМ) и человеческий тромбин (Sigma-Aldrich) (конечная концентрация 1 МЕ/мл), после чего 360 мкл смеси быстро переносили в предварительно нагретую до 37°C кювету и начинали измерение. После регистрации тромбоэластограммы определяли следующие параметры: R – время реакции (время от начала свертывания до начала формирования фибрина) и G – модуль упругости (эластический модуль) сгустка, рассчитанный из максимальной амплитуды (MA) в миллиметрах согласно формуле производителя:

$$G \text{ (дин/см}^2\text{)} = 5000 \times \text{MA} / (100 - \text{MA}).$$

Статистический анализ

Статистический анализ выполняли с использованием пакета программ GraphPad Prism 10 (GraphPad Software). Нормальность распределения данных оценивали с помощью критериев Шапиро–Уилка и Д’Агостино–Пирсона. Парные статистические различия оценивали с помощью парного t-критерия Стьюдента (параметрический анализ) и U-критерия Манна–Уитни или критерия Уилкоксона (непараметрический анализ). Статистические различия для множественных сравнений оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с

апостериорным тестом Сидака. Уровень значимости составлял 95% ($p < 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Кинетика ретракции сгустка в присутствии активированных и неактивированных нейтрофилов

Ранее было показано, что ретракция сгустка крови во времени протекает в 3 фазы: инициация ретракции (фаза 1), линейная ретракция (фаза 2) и механическая стабилизация сгустка (фаза 3) [14]. Мы провели фазовый анализ индивидуальных кинетических кривых ретракции сгустка в цельной крови и PRP, представленных на *рисунке 1*, после усреднения.

В сгустках, полученных как в цельной крови, так и в PRP, продолжительность фазы инициации (фаза 1) достоверно увеличивалась в присутствии ФМА-активированных нейтрофилов (*таблица 1*, *рисунок 1*). Этот результат подчеркивает определяющую роль реакций фазы 1 в общем усилении ретракции сгустка активированными нейтрофилами, показанном ранее [15]. Учитывая, что фаза инициации отражает активацию тромбоцитов под действием тромбина, как экзогенного, так и эндогенного, наблюдаемое удлинение фазы 1 в присутствии ФМА-активированных нейтрофилов косвенно указывает на усиленную, нарастающую во времени генерацию эндогенного тромбина и пролонгированную дополнительную активацию тромбоцитов.

В отличие от фазы 1 ретракции сгустков в присутствии активированных нейтрофилов продолжительность фаз 2 и 3 имела тенденцию к уменьшению при одновременном увеличении скорости (*таблица 1*). Поскольку фазы 2 и 3 в значительной степени являются механическими, т. е. отражают прогрессирующую компрессию сгустка и его механическую стабилизацию [14], наблюдаемые отличия в продолжительности и скорости этих фаз в присутствии активированных нейтрофилов косвенно свидетельствуют об изменениях механических свойств фибрина.

Таким образом, сравнительный кинетический анализ ретракции сгустков дал основания предположить вероятные механизмы, лежащие в основе стимулирующего влияния активированных нейтрофилов и НВЛ на ретракцию сгустка. Последующие разделы содержат прямые экспериментальные доказательства этих механизмов.

Стимулирующий эффект нейтрофильных внеклеточных ловушек на ретракцию сгустка опосредован усиленным образованием эндогенного тромбина

Удлинение фазы инициации под влиянием активированных нейтрофилов (*рисунок 1*) наводит на

мысль о том, что причиной усиления сжатия сгустка крови НВЛ является увеличение продукции эндогенного тромбина, что вызывает вторичную гиперактивацию тромбоцитов, включая повышение сократительной активности. В целях проверки

этого предположения мы проводили эксперименты в присутствии ривароксабана – ингибитора фактора Ха, способного предотвращать образование эндогенного тромбина. Перед формированием сгустка и его ретракцией ривароксабан

Рисунок 1

Сравнительный фазовый анализ усредненных кинетических кривых ретракции сгустков, образованных в цельной крови (А) и PRP (Б), в присутствии неактивированных и ФМА-активированных нейтрофилов. Образование и ретракцию сгустка инициировали добавлением 1 МЕ/мл тромбина с последующей оптической регистрацией размера сгустка во времени. На усредненных кинетических кривых переходы между фазами ретракции (вертикальные сплошные линии) определяли путем нахождения локальных максимумов и минимумов в мгновенных первых производных (пунктирные кривые). Кинетические кривые аппроксимировали с помощью кусочной функции, определяли длительность и константу скорости каждой фазы. Результаты представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение ($n = 5$ – для цельной крови и $n = 4$ – для PRP, полученных из крови независимых доноров)

Figure 1

A comparative phase analysis of the averaged kinetic curves of clot retraction in whole blood (A) and platelet-rich plasma (PRP) (Б) in the presence of non-activated and PMA-activated neutrophils. Clot formation and retraction were induced by the addition of 1 IU/mL of thrombin, then optical tracking of clot size was performed. On the averaged kinetic curves transitions between the phases of retraction (vertical solid lines) were determined by finding local maxima and minima within the instantaneous first derivatives (dashed curves). The kinetic curves were approximated using a piecewise function, and the duration and rate constant of each phase were determined. The results are presented as the mean \pm standard deviation ($n = 5$ for whole blood and $n = 4$ for PRP obtained from independent donors)

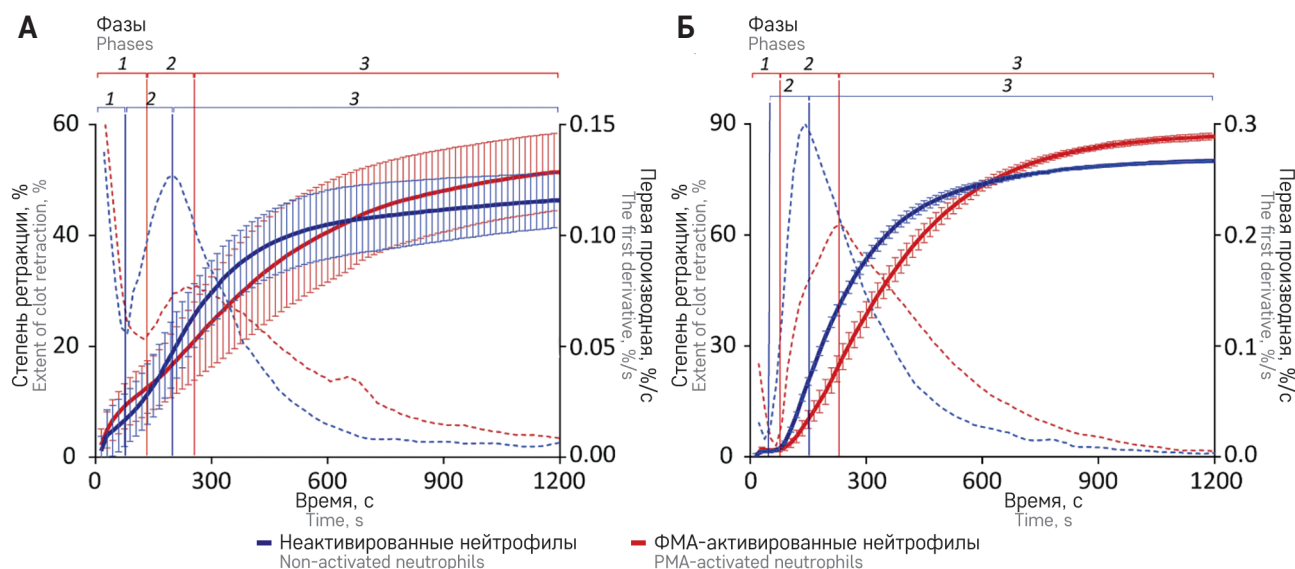


Таблица 1

Кинетический фазовый анализ (длительность и константа скорости фазы) ретракции сгустков, образованных в цельной крови и PRP

Table 1

A kinetic phase analysis (duration and rate constant of each phase) of clot retraction in whole blood and PRP

Фаза Phase	Длительность, с Duration, s		Значения <i>p</i> <i>p</i> -values	Константа скорости, 1/с Rate constant, 1/s		Значения <i>p</i> <i>p</i> -values
	Неактивированные нейтрофилы Non-activated neutrophils	Активированные нейтрофилы Activated neutrophils		Неактивированные нейтрофилы Non-activated neutrophils	Активированные нейтрофилы Activated neutrophils	
Цельная кровь Whole blood						
1	45 ± 39	98 ± 34	0,02	0,04 ± 0,06	0,02 ± 0,01	0,8
2	132 ± 47	129 ± 70	0,9	0,10 ± 0,02	0,07 ± 0,02	0,002
3	1023 ± 32	999 ± 88	0,4	0,005 ± 0,001	0,003 ± 0,001	0,0002
PRP						
1	23 ± 11	47 ± 8	0,02	Неизмеримо Immeasurable	0,39 ± 0,33	—
2	105 ± 8	126 ± 40	0,2	0,16 ± 0,03	0,15 ± 0,06	0,6
3	1073 ± 8	1028 ± 42	0,03	0,005 ± 0,001	0,004 ± 0,001	0,004

Примечание. Результаты представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение ($n = 5$ – для цельной крови, $n = 4$ – для PRP, полученных из крови независимых доноров). Для сгустков из цельной крови использовали критерий Уилкоксона (непараметрический) для фазы 1 и парный t -критерий Стьюдента (параметрический) для фаз 2 и 3. Для сгустков из PRP использовали критерий Уилкоксона (непараметрический) для длительностей и парный t -критерий Стьюдента (параметрический) для констант скорости.

Notes. The results are presented as the mean \pm standard deviation ($n = 5$ for whole blood, $n = 4$ for PRP obtained from independent donors). For whole blood clots, we used the Wilcoxon (non-parametric) test for phase 1 and the Student's paired (parametric) t -test for phases 2 and 3. For PRP clots, we used the Wilcoxon (non-parametric) test for phase durations and the Student's paired (parametric) t -test for rate constants.

добавляли к образцам цельной крови (таблица 2, рисунок 2) или PRP (таблица 3, рисунок 3), содержащим неактивированные или ФМА-активированные нейтрофилы. В отличие от контрольных образцов цельной крови, содержащих неактивированные нейтрофилы, в присутствии ФМА-активированных нейтрофилов ривароксабан достоверно понижал конечную степень сжатия сгустков, площадь под кинетической кривой и среднюю скорость ретракции (таблица 2, рисунок 2А, В, Г). Схожие эффекты наблюдались в PRP: в присутствии ривароксабана средняя скорость и конечная степень ретракции сгустка достоверно снижались при добавлении ФМА-активированных нейтрофилов, в то время как в присутствии неактивированных нейтрофилов ривароксабан не оказывал влияния (таблица 3, рисунок 3А, Г).

Таким образом, подавление генерации эндогенного тромбина путем ингибирования фактора Ха устраняет стимулирующий эффект НВЛ на ретракцию сгустка. Полученные результаты указывают на то, что в присутствии ФМА-активированных нейтрофилов, продуцирующих НВЛ, усиленное сжатие сгустка обусловлено повышенной продукцией эндогенного тромбина, который дополнительно активирует тромбоциты, усиливая их сократительный потенциал.

Стимулирующий эффект нейтрофильных внеклеточных ловушек на ретракцию сгустка опосредован размягчением сгустка

Исходя из различной кинетики механических стадий ретракции в фазах 2 и 3 (таблица 1, рисунок 1), альтернативный гипотетический механизм стимулирующего эффекта ФМА-активированных нейтрофилов на ретракцию сгустка – это влияние НВЛ на механические свойства сгустка или точнее – на его деформируемость. В целях проверки этого предположения мы исследовали динамическую эластичность сгустка с помощью тромбозластографии (ТЭГ), которая регистрирует изменения жесткости сгустка во времени в ответ на напряжение сдвига. В дополнение ко времени свертывания крови (R, с) ТЭГ характеризует механические свойства сгустка, в частности его максимальную твердость (firmness) (МА, мм), которую можно преобразовать в абсолютный параметр – эластичность сгустка (G, Па). Мы изучили влияние ФМА-активированных и неактивированных нейтрофилов на время свертывания и эластичность сгустка в цельной крови и PRP. В сгустках из цельной крови не было выявлено заметного влияния ФМА-активированных нейтрофилов на параметры ТЭГ (таблица 4, рисунок 4А, Б), в то время как в сгустках из PRP НВЛ несколько удлиняли время свертывания и, что наиболее важно, снижали конечную жесткость

сгустка (таблица 4, рисунок 4В, Г), это указывает на то, что НВЛ делают сгусток более мягким, т. е. податливым для деформации.

Обнаруженная связь между жесткостью сгустка и наличием НВЛ была подтверждена с помощью ДНКазы I, чтобы оценить, как расщепление НВЛ под действием этого фермента изменит параметры ТЭГ в цельной крови и PRP в присутствии ФМА-активированных нейтрофилов. Перед инициацией свертывания и регистрацией ТЭГ образцы крови или PRP смешивали с необработанными или ФМА-активированными нейтрофилами с последующим добавлением ДНКазы I и инкубацией в течение 30 мин при 37°C (таблица 5, рисунок 5). Обработка ДНКазой I увеличивала среднее значение параметра G в сгустках из цельной крови с ФМА-активированными нейтрофилами, что указывает на ключевую роль НВЛ в уменьшении жесткости сгустка. Напротив, в образцах крови, содержащих неактивированные нейтрофилы, эффект ДНКазы I отсутствовал (таблица 5, рисунок 5Б). В отличие от цельной крови в PRP добавление ДНКазы I не влияло на параметры ТЭГ (таблица 5, рисунок 5В, Г), что, вероятно, связано со значительно большей жесткостью PRP-сгустков, характеризующихся большим содержанием фибрина по сравнению со сгустками из цельной крови, что отчетливо видно по максимальным значениям параметра G на осях Y на рисунке 5Б, Г.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Воспалительный тромбоз является тяжелым осложнением заболеваний различной этиологии. Клиническое течение и исходы имунотромбоза во многом определяются составом и динамическими свойствами тромба. К таким свойствам тромба относятся его механическая устойчивость, проницаемость и чувствительность к лизису, которые, в свою очередь, в значительной степени зависят от полноты сжатия, или ретракции.

Ранее мы описали усиление ретракции сгустков крови под действием активированных нейтрофилов и показали, что стимулирующий эффект нейтрофилов на ретракцию связан с образованием НВЛ [15]. В данной работе, направленной на определение механизмов этого явления, мы установили, по крайней мере, 2 независимых пути, посредством которых НВЛ усиливают ретракцию сгустка крови, а именно увеличение локальной продукции эндогенного тромбина и влияние на механические свойства сгустков.

Известно, что комплексы гистонов и ДНК, образующих структурную основу НВЛ, обладают прокоагулянтными свойствами и стимулируют выработку тромбина посредством различных механизмов [17, 18]. Поскольку тромбин является мощным агони-

Рисунок 2

Влияние ривароксабана на параметры ретракции сгустка в цельной крови в присутствии неактивированных или ФМА-активированных нейтрофилов

Образование и ретракцию сгустка инициировали добавлением 1 МЕ/мл тромбина с последующей оптической регистрацией размера сгустка во времени. Конечная степень ретракции (А), лаг-период (Б), площадь под кривой (В), средняя скорость (Г) измерялись в сгустках, сформированных в образцах цельной крови, полученной от независимых доноров. Результаты представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение ($n = 5$). Для сравнения средних значений использовали парный t-критерий Стьюдента

Figure 2

The effect of rivaroxaban on the parameters of clot retraction in whole blood in the presence of non-activated or PMA-activated neutrophils

Clot formation and retraction were induced by the addition of 1 IU/mL of thrombin, then optical tracking of clot size was performed. The final extent of clot retraction (A), lag time (B), area under the curve (C), and average rate (D) were measured in clots formed in whole blood samples from independent donors. The results are presented as the mean \pm standard deviation ($n = 5$). The Student's paired t-test was used to compare the average values

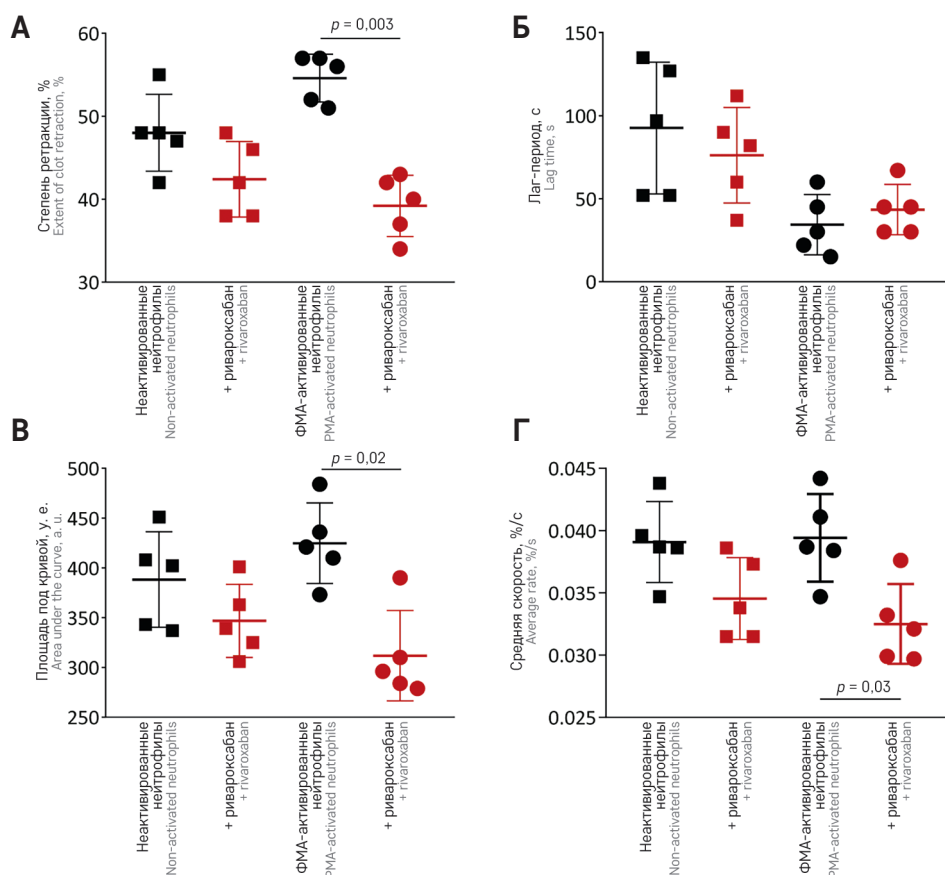


Таблица 2

Влияние ривароксабана на ретракцию сгустков в цельной крови с добавлением неактивированных или ФМА-активированных нейтрофилов

Table 2

The effect of rivaroxaban on clot retraction in whole blood in the presence of non-activated or PMA-activated neutrophils

Параметры ретракции сгустка Clot retraction parameters	Неактивированные нейтрофилы Non-activated neutrophils	С добавлением ривароксабана + Rivaroxaban	ФМА-активированные нейтрофилы PMA-activated neutrophils	С добавлением ривароксабана + Rivaroxaban
Конечная степень ретракции, % Final extent of clot retraction, %	48 \pm 5	42 \pm 5	55 \pm 3	39 \pm 4
Значение p p-value	0,08		0,003	
Лag-период, с Lag time, s	93 \pm 40	76 \pm 29	34 \pm 18	43 \pm 15
Значение p p-value	0,6		0,3	
Площадь под кинетической кривой, у. е. Area under the kinetic curve, a. u.	388 \pm 48	347 \pm 37	425 \pm 41	312 \pm 45
Значение p p-value	0,2		0,02	
Средняя скорость, %/с Average rate, %/s	0,039 \pm 0,003	0,034 \pm 0,003	0,039 \pm 0,003	0,032 \pm 0,003
Значение p p-value	0,07		0,03	

Примечание. Здесь и в таблицах 3, 5: результаты представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение ($n = 5$). Парный t-критерий Стьюдента.
Notes. Here and in Tables 3 and 5: the results are presented as the mean \pm SD ($n = 5$). The Student's paired t-test.

Рисунок 3

Влияние ривароксана на параметры ретракции сгустка в PRP в присутствии неактивированных или ФМА-активированных нейтрофилов

Образование и ретракцию сгустка инициировали добавлением 1 МЕ/мл тромбина с последующей оптической регистрацией размера сгустка во времени. Конечная степень ретракции (А), лаг-период (Б), площадь под кривой (В), средняя скорость (Г) измерялись в сгустках, сформированных в образцах PRP, полученной от независимых доноров. Результаты представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение ($n = 5$). Для сравнения средних значений использовали парный t-критерий Стьюдента

Figure 3

The effect of rivaroxaban on clot retraction parameters in PRP in the presence of non-activated or PMA-activated neutrophils. Clot formation and retraction were induced by the addition of 1 IU/mL of thrombin, then optical tracking of clot size was performed. The final extent of clot retraction (A), lag time (B), area under the curve (C), and average rate (D) were measured in clots formed in PRP samples from independent donors. The results are presented as the mean \pm standard deviation ($n = 5$). The Student's paired t-test was used to compare the average values

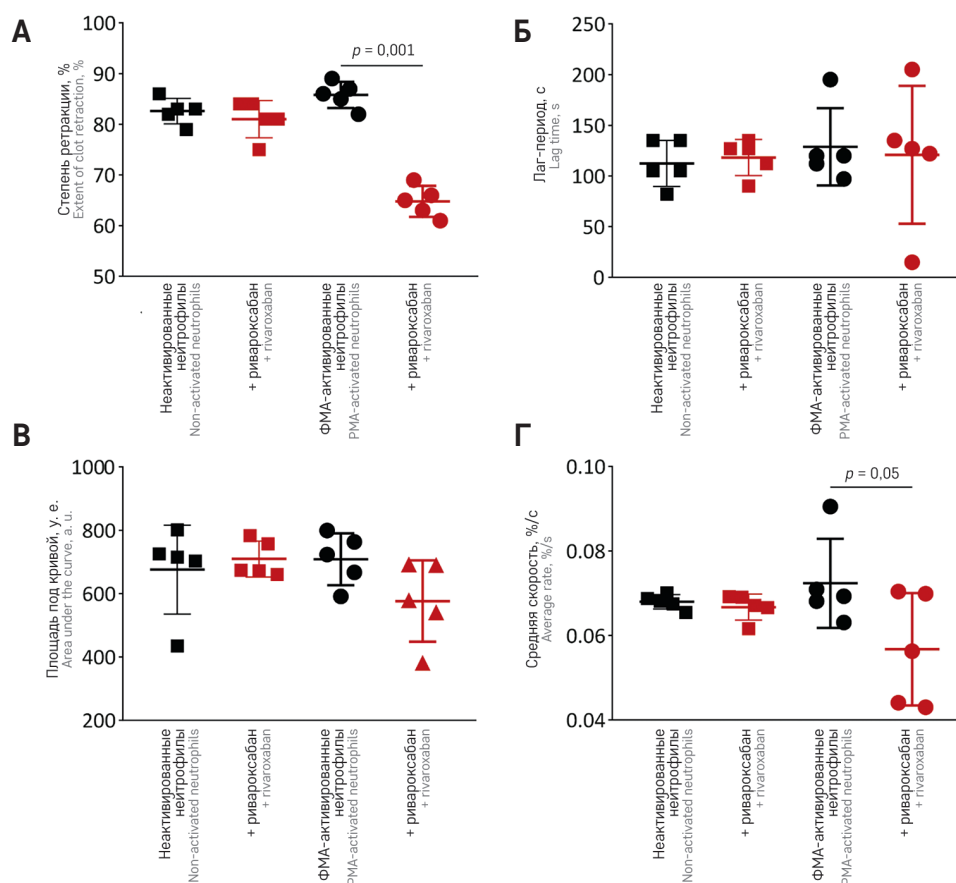


Таблица 3

Влияние ривароксана на ретракцию сгустков в PRP с добавлением неактивированных или ФМА-активированных нейтрофилов

Table 3

The effect of rivaroxaban on clot retraction in PRP in the presence of non-activated or PMA-activated neutrophils

Параметры ретракции сгустка Clot retraction parameters	Неактивированные нейтрофилы Non-activated neutrophils	С добавлением ривароксана + Rivaroxaban	ФМА-активированные нейтрофилы PMA-activated neutrophils	С добавлением ривароксана + Rivaroxaban
Конечная степень ретракции, % Final extent of clot retraction, %	83 \pm 3	81 \pm 4	86 \pm 3	65 \pm 3
Значение p p -value	0,4		0,001	
Лag-период, с Lag time, s	112 \pm 23	118 \pm 18	129 \pm 38	121 \pm 68
Значение p p -value	0,6		0,5	
Площадь под кинетической кривой, у. е. Area under the kinetic curve, a. u.	676 \pm 140	709 \pm 56	709 \pm 82	577 \pm 128
Значение p p -value	0,7		0,1	
Средняя скорость, %/с Average rate, %/s	0,068 \pm 0,002	0,067 \pm 0,003	0,072 \pm 0,010	0,057 \pm 0,013
Значение p p -value	0,4		0,053	

Рисунок 4
Параметры тромбоэластограммы R и G, измеренные в отсутствии (контроль) и присутствии неактивированных или ФМА-активированных нейтрофилов
Образование и ретракцию сгустка инициировали добавлением 1 МЕ/мл тромбина в цельной крови (А, Б) или PRP (В, Г), полученных от независимых доноров. Результаты представлены как среднее значение ± стандартное отклонение (n = 5). ANOVA

Figure 4
Thromboelastography parameters R (the reaction time) and G (clot elastic modulus) measured in the absence (control) and presence of non-activated or PMA-activated neutrophils
Clot formation and retraction were induced by the addition of 1 IU/mL of thrombin in whole blood (A, Б) or PRP (В, Г) obtained from independent donors. The results are presented as the mean ± standard deviation (n = 5). One-way ANOVA test

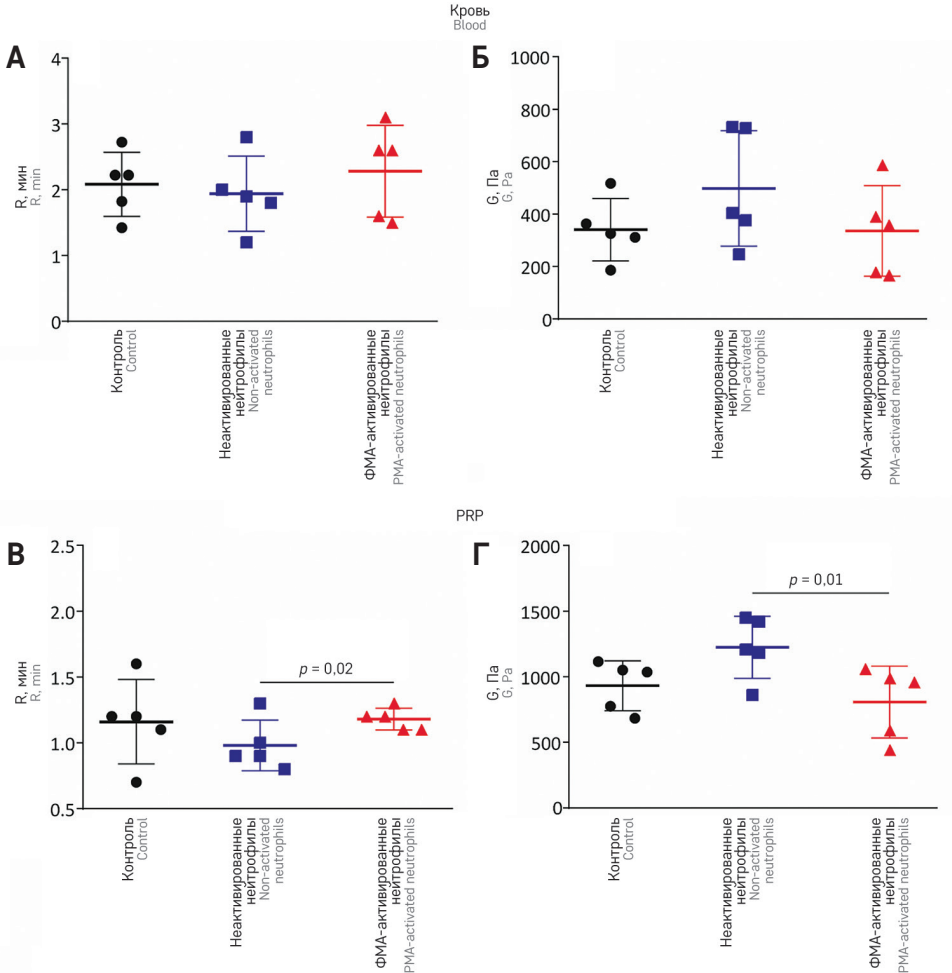


Таблица 4
Параметры тромбоэластограммы в отсутствии (контроль) и присутствии неактивированных или ФМА-активированных нейтрофилов

Table 4
Thromboelastography parameters in the absence (control) and presence of non-activated and PMA-activated neutrophils

Параметры тромбоэластограммы Thromboelastography parameters	Контроль (без добавления нейтрофилов) Control (no added neutrophils)	Неактивированные нейтрофилы Non-activated neutrophils	ФМА-активированные нейтрофилы PMA-activated neutrophils	Значение p p-value
Цельная кровь Whole blood				
R, мин R, min	2,1 ± 0,5	1,9 ± 0,6	2,3 ± 0,7	0,7
G, Па G, Pa	341 ± 119	498 ± 220	336 ± 173	0,3
PRP				
R, мин R, min	1,2 ± 0,3	1,0 ± 0,2	1,2 ± 0,1	0,3
G, Па G, Pa	931 ± 190	1225 ± 236	807 ± 274	0,04

Примечание. Результаты представлены как среднее значение ± стандартное отклонение (n = 5). ANOVA.
Notes. The results are presented as the mean ± standard deviation (n = 5). One-way ANOVA test.

Рисунок 5

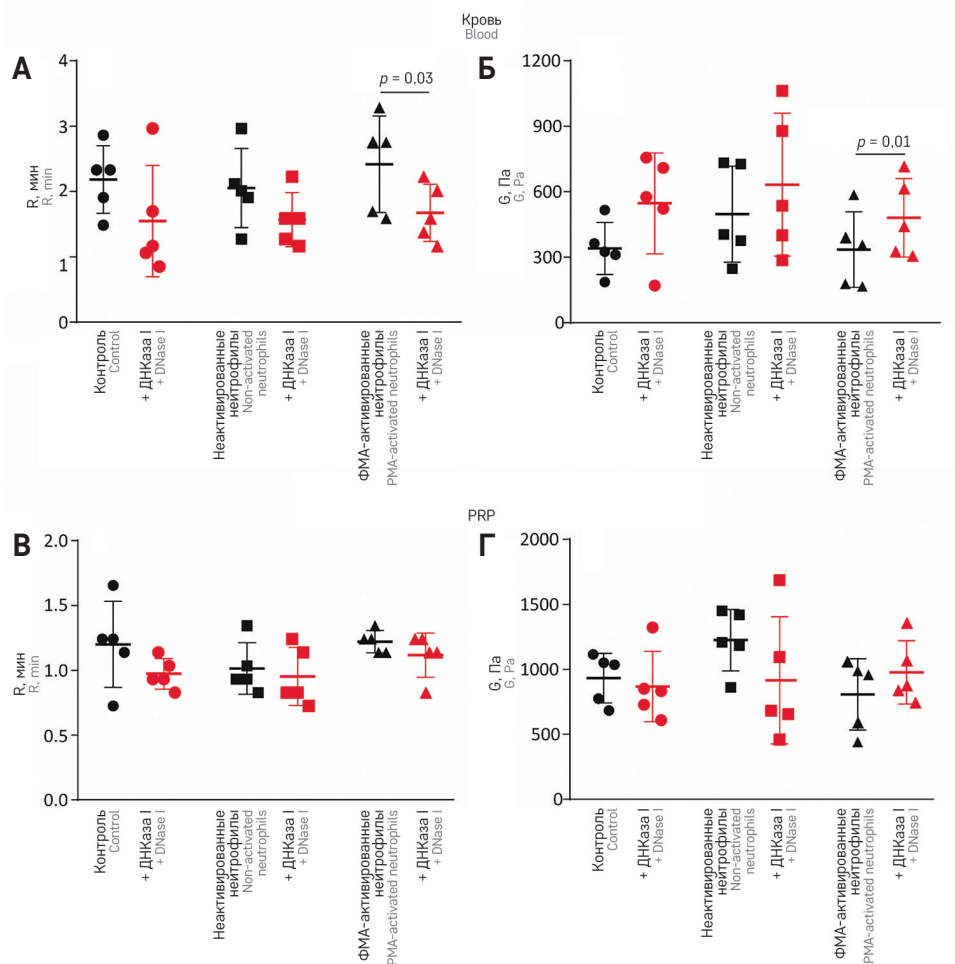
Влияние ДНКазы I на параметры тромбоэластограммы R и G в отсутствии (контроль) и присутствии неактивированных или ФМА-активированных нейтрофилов

Образование и ретракцию сгустка инициировали добавлением 1 МЕ/мл тромбина в цельной крови (А, Б) или PRP (В, Г), полученных от независимых доноров. Результаты представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение ($n = 5$). Для сравнения использовали парный t-критерий Стьюдента

Figure 5

The effect of DNase I on thromboelastography parameters R and G in the absence (control) and presence of non-activated or PMA-activated neutrophils

Clot formation and retraction were induced by the addition of 1 IU/mL of thrombin in whole blood (A, Б) or PRP (В, Г) obtained from independent donors. The results are presented as the mean \pm standard deviation ($n = 5$). The Student's paired t-test was used for comparison



стом тромбоцитов, усиливающим их сократительную активность [14, 19, 20], мы предположили, что ингибирование НВЛ-индуцированной локальной генерации тромбина внутри сгустка уменьшит или устранист стимулирующий эффект активированных нейтрофилов на ретракцию сгустка. Действительно, в присутствии ривароксабана (ингибитор фактора Ха) скорость и степень ретракции сгустка при ФМА-активированных нейтрофилах были снижены до уровня контроля с неактивированными нейтрофилами (рисунки 2А, В, Г, 3А, Г). Этот результат убедительно свидетельствует в пользу усиленной выработки эндогенного тромбина как механизма, способствующего ретракции воспалительных тромбов под влиянием НВЛ. Это наблюдение дополняют ранее полученные данные, согласно которым активированные моно-

циты способствуют ретракции сгустка посредством экспрессии тканевого фактора и локальной генерации тромбина – самого сильного физиологического агониста тромбоцитов, усиливающего их сократимость [21]. Представляется вероятным, что совместный прокоагулянтный эффект активированных нейтрофилов и моноцитов может быть существенным фактором, усиливающим ретракцию воспалительных тромбов.

В качестве альтернативного механизма усиления ретракции сгустка активированными нейтрофилами мы обнаружили, что НВЛ изменяют механические свойства сгустков, снижая их жесткость и делая более подверженными деформации, что было установлено с помощью реологических измерений на тромбоэластограмме (рисунки 4Г, 5Б). Соответ-

Таблица 5
Влияние ДНКазы I на параметры тромбоэластограммы в отсутствии (контроль) и присутствии неактивированных или ФМА-активированных нейтрофилов в цельной крови и PRP

Параметры тром- боэластограммы Thromboelastography parameters	Контроль (без добав- ления нейтрофилов) Control (no added neutrophils)	С добавлением ДНКазы I + DNase I	Неактивирован- ные нейтрофилы Non-activated neutrophils	С добавлением ДНКазы I + DNase I	ФМА-активиро- ванные нейтро- филы PMA-activated neutrophils	С добавле- нием ДНКазы I + DNase I
Цельная кровь Whole blood						
R, мин R, min	2,1 ± 0,5	1,5 ± 0,8	1,9 ± 0,6	1,5 ± 0,4	2,3 ± 0,7	1,6 ± 0,4
Значение <i>p</i> <i>p</i> -value	0,1		0,1		0,03	
G, Па G, Pa	341 ± 119	547 ± 231	498 ± 220	633 ± 327	336 ± 173	481 ± 180
Значение <i>p</i> <i>p</i> -value	0,3		0,2		0,01	
PRP						
R, мин R, min	1,2 ± 0,3	0,9 ± 0,1	1,0 ± 0,2	0,9 ± 0,2	1,2 ± 0,1	1,1 ± 0,2
Значение <i>p</i> <i>p</i> -value	0,1		0,7		0,2	
G, Па G, Pa	931 ± 190	868 ± 271	1225 ± 236	916 ± 489	807 ± 274	977 ± 243
Значение <i>p</i> <i>p</i> -value	0,5		0,2		0,4	

ственно, ферментативное расщепление НВЛ ДНКазой I восстанавливало исходную эластичность сгустка. Этот эффект был более выражен в сгустках из цельной крови по сравнению со сгустками из PRP, которые характеризуются значительно большей упругостью за счет высокого содержания фибрина (рисунки 5В, Г). В целом эти данные указывают на то, что НВЛ размягчают сгустки крови, снижая устойчивость фибринового каркаса к сократительным силам, генерируемым тромбоцитами, и тем самым способствуя компрессии и компактизации сгустка. Аналогичный вывод был получен другими авторами на основе влияния ДНК и гистонов на механические свойства фибриновых сгустков, образованных стафилокоагулазой [22]. Следует отметить, что наблюдаемое нами и другими авторами размягчение плазменных сгустков в присутствии НВЛ внешне противоречит результатам, полученным Longstaff и соавт. [23], которые показали, что фибриновые сгустки, сформированные в присутствии смеси гистонов и ДНК, были более устойчивы к силам сдвига. Однако при внимательном анализе данной работы оказалось, что при добавлении по отдельности ДНК и гистоны оказывали противоположные эффекты на жесткость фибрина: в присутствии одной ДНК фибрин был более чувствителен к механической деформации. Это противоречие указывает на сложные взаимоотношения между отдельными компонентами НВЛ и механическими свойствами фибрина, которые зависят от концентраций добавляемых веществ и их соотношений,

величины сдвигового напряжения и, возможно, других условий.

Усиленная ретракция сгустков крови под влиянием активированных нейтрофилов и НВЛ может иметь важные патофизиологические последствия, затрагивающие ключевые патогенные свойства тромбов, такие как обструктивность, чувствительность к фибринолизу и эмбологенность. По совокупности имеющихся данных сжатие сгустков крови, усиленное НВЛ, может снижать риск эмболизации и способствовать растворению тромба за счет эндогенного фибринолиза [8, 17], несмотря на то, что воспаление создает общий гиперкоагуляционный фон, способствующий тромбообразованию. Кроме того, интенсивность воспалительного процесса в тромбе имеет большое клиническое значение для эффективности лечения иммунотромбоза. В частности, наши результаты позволяют предположить, что усиленная ретракция воспалительных обтурирующих тромбов сопровождается снижением порозности и меньшей проницаемостью, что снижает чувствительность к лечебному экзогенному тромболизису и механической тромбэктомии [23–27].

Учитывая важную патогенетическую роль активированных нейтрофилов и НВЛ в развитии тромбов, оценка уровня растворимых биомаркеров НВЛ в крови [28] может улучшить диагностику, а также помочь в прогнозировании рисков при воспалительном тромбозе. Кроме того, адъювантная терапия, направленная на расщепление НВЛ или ингибирование их образования [29, 30], потенциально могла бы улуч-

шить исходы иммунотромбоза, повысив эффективность лечения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе исследованы механизмы влияния воспалительных клеток, в частности активированных нейтрофилов, продуцирующих НВЛ, на ретракцию сгустков крови. Установлены 2 различных механизма, посредством которых НВЛ, встроенные в фибриновую сеть, усиливают ретракцию сгустка крови: увеличение локальной продукции эндогенного тромбина и влияние на механические свойства фибриновой сети внутри воспалительных сгустков. Полученные результаты позволяют предположить, что современные представления о воспалительном тромбозе, осложняющем течение многих инфекционных и аутоиммунных заболеваний, могут нуждаться в пересмотре и разработке новых подходов к лечению с учетом предрасположенности воспалительных тромбов к усиленной ретракции.

ЭТИЧЕСКАЯ ЭКСПЕРТИЗА

Все процедуры с участием людей были одобрены и утверждены решением локального этического комитета (протокол №53 от 26.02.2025) Казанского федерального университета.

ETHICS REVIEW

All the procedures involving human participants were approved by the Ethics Committee (Protocol No. 53 dated 26.02.2025) of Kazan Federal University.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда и Академии наук Республики Татарстан по проекту №25-25-20017 (<https://rscf.ru/project/25-25-20017/>).

FUNDING

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/>).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ВКЛАД АВТОРОВ

R.P. Хисматуллин: анализ научного материала и полученных данных, написание текста рукописи;
Ш.М. Салияхутдинова, А.И. Хабирова: проведение основных экспериментов;
А.Н. Хузиахмедов: научная редакция статьи;
Р.И. Литвинов: разработка дизайна статьи и редактирование рукописи.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

R.R. Khismatullin: analysis of research material and the obtained data, manuscript writing;
S.M. Saliakhutdinova, A.I. Khabirova: conducting the main experiments;
A.N. Khuziakhmedov: scientific revision of the article;
R.I. Litvinov: article design and manuscript editing.

ORCID

R.R. Khismatullin: <https://orcid.org/0000-0001-8597-811X>
S.M. Saliakhutdinova: <https://orcid.org/0000-0002-7647-2966>
A.I. Khabirova: <https://orcid.org/0000-0002-7243-8832>
A.N. Khuziakhmedov: <https://orcid.org/0000-0002-7606-1323>
R.I. Litvinov: <https://orcid.org/0000-0003-0643-1496>

Литература / References

1. Слуханчук Е.В., Бицадзе В.О., Солопова А.Г., Хизроева Д.Х., Цибизова В.И., Гри Ж. и др. Иммунотромбоз у онкологических больных: вклад внеклеточных ловушек нейтрофилов, ADAMTS-13 и фактора фон Виллебранда. *Акушерство, гинекология и репродукция* 2022;16(6):648–63. DOI: 10.17749/2313-7347/ob.gyn.rep.2022.364 [Slukhanchuk E.V., Bitsadze V.O., Solopova A.G., Khizroeva J.Kh., Tsibizova V.I., Gris J. et al. Immunothrombosis in cancer patients: contribution of neutrophil extracellular traps, ADAMTS-13 and von Willebrand factor. *Obstetrics, Gynecology and Reproduction* 2022;16(6):648–63. (In Russ.)].
2. Engelmann B., Massberg S. Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2013;13(1):34–45. DOI: 10.1038/nri3345
3. Rudd K.E., Johnson S.C., Agesa K.M., Shackelford K.A., Tsoi D., Kievlan D.R. et al. Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990–2017: analysis for the Global Burden of Disease Study. *Lancet* 2020;395(10219):200–11. DOI: 10.1016/S0140-6736(19)32989-7
4. Хисматуллин Р.Р., Иваева Р.А., Абдуллаева Ш., Шакирова А.З., Хузин Ф.Ф., Киясов А.П., Литвинов Р.И. Патоморфологические проявления воспалительного микротромбоза при COVID-19. *Казанский медицинский журнал* 2022;103(4):575–86. DOI: 10.17816/KMJ2022-575 [Khismatullin R.R., Ivaeva R.A., Abdullayeva S., Shakirova A.Z., Khuzin F.F., Kiasov A.P., Litvinov R.I. Pathological manifestations of inflammatory microthrombosis in COVID-19. *Kazan Medical Journal* 2022;103(4):575–86. (In Russ.)].
5. Duarte-García A., Pham M.M., Crowson C.S., Amin S., Moder K.G., Pruthi R.K. et al. The epidemiology of antiphospholipid syndrome: a population-based study. *Arthritis Rheumatol* 2019;71(9):1545–52. DOI: 10.1002/art.40901
6. Jorge A., Wallace Z.S., Lu N., Zhang Y., Choi H.K. Renal transplantation and survival among patients with lupus nephritis: a cohort study. *Ann Intern Med* 2019;170(4):240–7. DOI: 10.7326/M18-1570
7. Holmqvist M.E., Neovius M., Eriksson J., Mantel Ä., Wållberg-Jonsson S., Jacobsson L.T., Askling J. Risk of venous thromboembolism in patients with rheumatoid arthritis and association with disease duration and hospitalization. *JAMA* 2012;308(13):1350–6. DOI: 10.1001/2012.jama.11741
8. Fuchs T.A., Brill A., Duerschmied D., Schatzberg D., Monestier M., Myers D.D. Jr et al. Extracellular DNA

- traps promote thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107(36):15880–5. DOI: 10.1073/pnas.1005743107
9. Martinod K., Wagner D.D. Thrombosis: tangled up in NETs. *Blood* 2014;123(18):2768–76. DOI: 10.1182/blood-2013-10-463646
 10. Литвинов Р.И., Пешкова А.Д. Контракция (ретракция) сгустков крови и тромбов: патогенетическое и клиническое значение. *Альманах клинической медицины* 2018;46(7):662–71. DOI: 10.18786/2072-0505-2018-46-7-662-671 [Litvinov R.I., Peshkova A.D. Contraction of blood clots and thrombi: pathogenic and clinical significance. *Almanac of Clinical Medicine* 2018;46(7):662–71. (In Russ.)].
 11. Cines D.B., Lebedeva T., Nagaswami C., Hayes V., Massefski W., Litvinov R.I. et al. Clot contraction: compression of erythrocytes into tightly packed polyhedra and redistribution of platelets and fibrin. *Blood* 2014;123(10):1596–603. DOI: 10.1182/blood-2013-08-523860
 12. Khismatullin R.R., Abdullayeva S., Peshkova A.D., Sounbuli K., Evtugina N.G., Litvinov R.I., Weisel J.W. Extent of intravital contraction of arterial and venous thrombi and pulmonary emboli. *Blood Adv* 2022;6(6):1708–18. DOI: 10.1182/bloodadvances.2021005801
 13. Litvinov R.I., Weisel J.W. Blood clot contraction: mechanisms, pathophysiology, and disease. *Res Pract Thromb Haemost* 2022;7(1):100023. DOI: 10.1016/j.rpth.2022.100023
 14. Tutwiler V., Litvinov R.I., Lozhkin A.P., Peshkova A.D., Lebedeva T., Ataulakhanov F.I. et al. Kinetics and mechanics of clot contraction are governed by the molecular and cellular composition of the blood. *Blood* 2016;127(1):149–59. DOI: 10.1182/blood-2015-05-647560
 15. 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;107. DOI: 10.17816/KMJ691853 [Saliakhutdinova S.M., Khismatullin R.R., Khabirova A.I., Khuziakhmedov A.N., Litvinov R.I. Influence of neutrophils on blood clot retraction. *Kazan Medical Journal* 2025;107. (In Russ.)].
 16. Ложкин А.П., Пешкова А.Д., Атауллаханов Ф.И., Литвинов Р.И. Разработка и применение нового метода изучения контракции (ретракции) сгустка крови. *Гены и клетки*. 2014;9(3):99–104. DOI: 10.23868/gc120329 [Lozhkin A.P., Peshkova A.D., Ataulakhanov F.I., Litvinov R.I. Development and applications of a new technique to study blood clot contraction (retraction). *Genes & Cells*. 2014;9(3):99–104. (In Russ.)].
 17. Gould T.J., Vu T.T., Swystun L.L., Dwivedi D.J., Mai S.H., Weitz J.I., Liaw P.C. Neutrophil extracellular traps promote thrombin generation through platelet-dependent and platelet-independent mechanisms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2014;34(9):1977–84. DOI: 10.1161/ATVBAHA.114.304114
 18. Von Brühl M.L., Stark K., Steinhart A., Chandraratne S., Konrad I., Lorenz M. et al. Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo. *J Exp Med* 2012;209(4):819–35. DOI: 10.1084/jem.20112322
 19. Carr M.E. Jr, Martin E.J., Carr S.L. Delayed, reduced or inhibited thrombin production reduces platelet contractile force and results in weaker clot formation. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2002;13(3):193–7. DOI: 10.1097/00001721-200204000-00004
 20. Carr M.E. Jr. Development of platelet contractile force as a research and clinical measure of platelet function. *Cell Biochem Biophys* 2003;38(1):55–78. doi: 10.1385/CBB:38:1:55
 21. Peshkova A.D., Le Minh G., Tutwiler V., Andrianova I.A., Weisel J.W., Litvinov R.I. Activated monocytes enhance platelet-driven contraction of blood clots via tissue factor expression. *Sci Rep* 2017;7(1):5149. DOI: 10.1038/s41598-017-05601-9
 22. Komorowicz E., Farkas V.J., Szabó L., Cherrington S., Thelwell C., Kolev K. DNA and histones impair the mechanical stability and lytic susceptibility of fibrin formed by staphylocoagulase. *Front Immunol* 2023;14:1233128. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1233128
 23. Longstaff C., Varjú I., Sótónyi P., Szabó L., Krumrey M., Hoell A. et al. Mechanical stability and fibrinolytic resistance of clots containing fibrin, DNA, and histones. *J Biol Chem* 2013;288(10):6946–56. DOI: 10.1074/jbc.M112.404301
 24. Litvinov R.I., Weisel J.W. Fibrin mechanical properties and their structural origins. *Matrix Biol* 2017;60–61:110–23. DOI: 10.1016/j.matbio.2016.08.003
 25. Tutwiler V., Peshkova A.D., Le Minh G., Zaitsev S., Litvinov R.I., Cines D.B., Weisel J.W. Blood clot contraction differentially modulates internal and external fibrinolysis. *J Thromb Haemost* 2019;17(2):361–70. DOI: 10.1111/jth.14370
 26. Varjú I., Longstaff C., Szabó L., Farkas Á.Z., Varga-Szabó V.J., Tankas-Salamon A. et al. DNA, histones and neutrophil extracellular traps exert anti-fibrinolytic effects in a plasma environment. *Thromb Haemost* 2015;113(6):1289–98. DOI: 10.1160/TH14-08-0669
 27. Wufsus A.R., Macera N.E., Neeves K.B. The hydraulic permeability of blood clots as a function of fibrin and platelet density. *Biophys J* 2013;104(8):1812–23. DOI: 10.1016/j.bpj.2013.02.055
 28. Borissoff J.I., Joosen I.A., Versteyleen M.O., Brill A., Fuchs T.A., Savchenko A.S. 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):2032–40. DOI: 10.1161/ATVBAHA.113.301627
 29. Sabnis R.W. Novel peptidylarginine deiminase type 4 (PAD4) inhibitors. *ACS Med Chem Lett* 2022;13(10):1537–8. DOI: 10.1021/acsmchemlett.2c00387
 30. Aiken S.G., Grimes T., Munro S., Zarganes-Tzitzikas T., La Thangue N.B., Brennan P.E. A patent review of peptidylarginine deiminase 4 (PAD4) inhibitors (2014–present). *Expert Opin Ther Pat* 2025;35(6):611–21. DOI: 10.1080/13543776.2025.2484366