

УДК 571.27

## НЕТоз: МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ, РОЛЬ В ФИЗИОЛОГИИ И ПАТОЛОГИИ

### Обзор

© 2020 Н.В. Воробьева<sup>1\*</sup>, Б.В. Черняк<sup>2</sup>

<sup>1</sup> *Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, 119991 Москва, Россия; электронная почта: nvvorobjeva@mail.ru*

<sup>2</sup> *НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Россия*

Поступила в редакцию 20.06.2020

После доработки 16.07.2020

Принята к публикации 16.07.2020

НЕТоз – это программа образования нейтрофильных внеклеточных ловушек или NET (neutrophil extracellular traps), состоящих из модифицированного хроматина и связанных с ним бактерицидных белков гранул и цитоплазмы. НЕТоз могут вызывать различные патогены, антитела и иммунные комплексы, цитокины, микрокристаллы и другие физиологические стимулы. Индукция НЕТоза зависит от активных форм кислорода (АФК), основным источником которых служит NADPH-оксидаза. Активация NADPH-оксидазы зависит от повышения концентрации  $Ca^{2+}$  в цитоплазме и в некоторых случаях от генерации АФК в митохондриях. В процессе НЕТоза происходит выход компонентов гранул в цитозоль, модификация гистонов, ведущая к деконденсации хроматина, разрушение ядерной оболочки, а также образование пор в плазматической мембране. В обзоре обсуждаются основные представления о механизмах НЕТоза, а также роль НЕТоза в патогенезе некоторых заболеваний, включая COVID-19.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** нейтрофил, нейтрофильные внеклеточные ловушки, НЕТоз, NADPH-оксидаза, активные формы кислорода, митохондриальная пора, COVID-19.

**DOI:** 10.31857/S0320972520100061

### ВВЕДЕНИЕ

Нейтрофилы являются самой многочисленной популяцией миелоидных лейкоцитов, составляющей в норме 50–70% всех лейкоцитов крови. Нейтрофилы дифференцируются в костном мозге из гематopoэтических стволовых клеток и после полного созревания выходят в кровяное русло. В кровотоке нейтрофилы циркулируют не более 72 ч, после чего они либо возвращаются в костный мозг, где их фагоцитируют резидентные макрофаги, или подвергаются апоптозу в периферических тканях, где также

фагоцитируются. При инфицировании организма хозяина нейтрофилы немедленно мигрируют из кровотока в очаг воспаления, обеспечивая «первую линию» защиты от патогенов.

Будучи «профессиональными» фагоцитами, нейтрофилы содержат в своих гранулах огромный антимикробный «арсенал», позволяющий им уничтожить патогены в процессе фагоцитоза. Бактерицидные ферменты также могут выбрасываться из клеток в процессе дегрануляции. Активация NADPH-оксидазы приводит к массовой генерации активных форм кислорода (АФК), которые участвуют в уничтожении патогенов как вне, так и внутри клеток. Наконец, существует еще один антимикробный механизм, который заключается в высвобождении нейтрофильных внеклеточных ловушек или NET, состоящих из модифицированного хроматина, «декорированного» бактерицидными белками гранул и цитоплазмы. Этот феномен был впервые описан в работе Takei et al. [1] и в дальнейшем детально охарактеризован Brinkmann et al. [2]. Поскольку первоначально было показано, что образование NET сопровождается гибелью клеток, этот процесс был назван НЕТозом [3].

Принятые сокращения: GSDMD – газдермин D; МРО – миелопероксидаза; mPTP – неселективная митохондриальная пора (mitochondrial permeability transition pore); NET – нейтрофильные внеклеточные ловушки (neutrophil extracellular traps); РКС – протеинкиназа С; АФК – активные формы кислорода; ЛПС – липополисахарид бактериальной стенки; НЭ – нейтрофильная эластаза; ОРДС – острый респираторный дистресс-синдром; ПГК – программированная гибель клетки; ФМА – форбол-12-миристан-13-ацетат; ХГБ – хроническая гранулематозная болезнь; ХОБЛ – хроническая обструктивная болезнь легких.

\* Адресат для корреспонденции.

Образование NET может активироваться различными патогенами, такими как бактерии, грибы, простейшие, вирусы, а также липополисахаридами бактериальной клеточной стенки (ЛПС). НЕТоз могут индуцировать антитела и иммунные комплексы, цитокины и хемокины (IL-8, TNF), микрокристаллы и другие физиологические стимулы [4–8]. В экспериментах *in vitro* для индукции НЕТоза часто используют форболовые эфиры (в частности, форбол-12-миристат-13-ацетат, ФМА), которые имитируют действие диацилглицерола, активируя протеинкиназу *c*, а также кальциевые (иономицин, А23187) и калиевые (нигерицин) ионофоры.

В настоящее время описаны две принципиально различающиеся формы НЕТоза: классический или суицидальный НЕТоз, который приводит к гибели клетки, и прижизненный или витальный, при котором клетка сохраняет не только жизнеспособность, но и многие эффекторные функции (см. ниже).

Классический НЕТоз представляет собой особую форму программируемой гибели клеток (ПГК), для которой характерны выход компонентов гранул в цитозоль, а также деконденсация хроматина, связанная с модификацией гистонов. В то же время многие черты, характерные для других форм ПГК (апоптоз, некроптоз, пироптоз, аутофагическая гибель, вторичный некроз), присущи и НЕТозу. Подобно апоптозу, при НЕТозе происходят координированные изменения в ядре и цитоплазме, хотя природа изменений различна, и НЕТоз, в отличие от апоптоза, не требует активации каспаз. При НЕТозе (как и при других формах ПГК) нарушаются изолирующие свойства плазматической мембраны, и механизмы пермеабиллизации сходны для НЕТоза, пироптоза и некроптоза. Сигнальные механизмы НЕТоза могут включать активацию фосфоинозитид-3-киназы (PI3K) [9], которая контролирует также индукцию аутофагической гибели, однако сборка аутофагосом для НЕТоза не требуется [10]. Особенно тесно могут переплетаться пути, ведущие к НЕТозу и некроптозу [11–13]. Долгое время считалось, что митохондрии не играют заметной роли в функционировании нейтрофилов, поскольку в этих клетках их содержание невелико, энергетика поддерживается гликолизом, а основным источником АФК служит NADPH-оксидаза. Далее, однако, выяснилось, что митохондрии участвуют в передаче сигналов, определяющих основные ответы нейтрофилов на патогены [14]. Было установлено, что митохондриальные АФК участвуют в активации NADPH-оксидазы и индукции НЕТоза, вызванного различными стимулами [15, 16].

Образование NET было показано также у других типов иммунных клеток – эозинофилов и тучных клеток [17], базофилов [18], моноцитов [19] и макрофагов [20]. Интересно, что деконденсированный хроматин используют для защиты от патогенов не только животные, но и одноклеточные эукариоты [21], а также растения [22]. Таким образом, можно предположить, что использование хроматина с целью защиты хозяина от патогенов возникло достаточно рано в эволюции эукариот.

В последние годы накапливаются данные о роли НЕТоза при многих патологиях, связанных с воспалительными процессами. Это привело к всплеску публикаций о НЕТозе. В базе данных PubMed можно найти почти 3000 публикаций на эту тему, и из них около трети приходятся на 2018–2020 гг. Такие интенсивные исследования позволили значительно продвинуться в понимании природы НЕТоза, но одновременно привели к накоплению данных, которые противоречат друг другу. В данном обзоре рассмотрены базовые представления о механизмах НЕТоза, определяющие его место в ряду других форм ПГК. Кроме того, показана роль НЕТоза в патогенезе некоторых заболеваний.

## МЕХАНИЗМЫ ОБРАЗОВАНИЯ NET

**Участие АФК, образуемых NADPH-оксидазой и митохондриями, в индукции НЕТоза.** В первых классических работах А. Zychlinsky [23] было показано, что НЕТоз, вызванный *Staphylococcus aureus* или ФМА, зависит от АФК, продуцируемых NADPH-оксидазой. Интересно, что в нейтрофилах больных хронической гранулематозной болезнью (ХГБ), не имеющих функциональной NADPH-оксидазы, экзогенные АФК способствовали образованию NET [23]. Основным механизмом активации NADPH-оксидазы связан с фосфорилированием её субъединиц при участии протеинкиназы *c* (PKC), что ведет к сборке активного фермента на мембране [24]. В то же время при НЕТозе, вызванном *Helicobacter pylori*, активация NADPH-оксидазы происходила при участии киназ *c-Raf*, MEK, Akt и ERK, и PKC была также необходима [25]. НЕТоз, индуцированный паразитом *Entamoeba histolytica*, также зависел от активации киназного каскада *c-Raf*-MEK-ERK, но участия PKC не наблюдалось [26]. Интересно, что сигнальный модуль *c-Raf*-MEK-ERK, а также PKC стимулируют экспрессию Mcl-1, основного антиапоптозного белка нейтрофилов [25]. По-видимому, индукция НЕТоза может быть сопряжена с подавлением апоптоза, что усиливает общий антимикробный эффект.

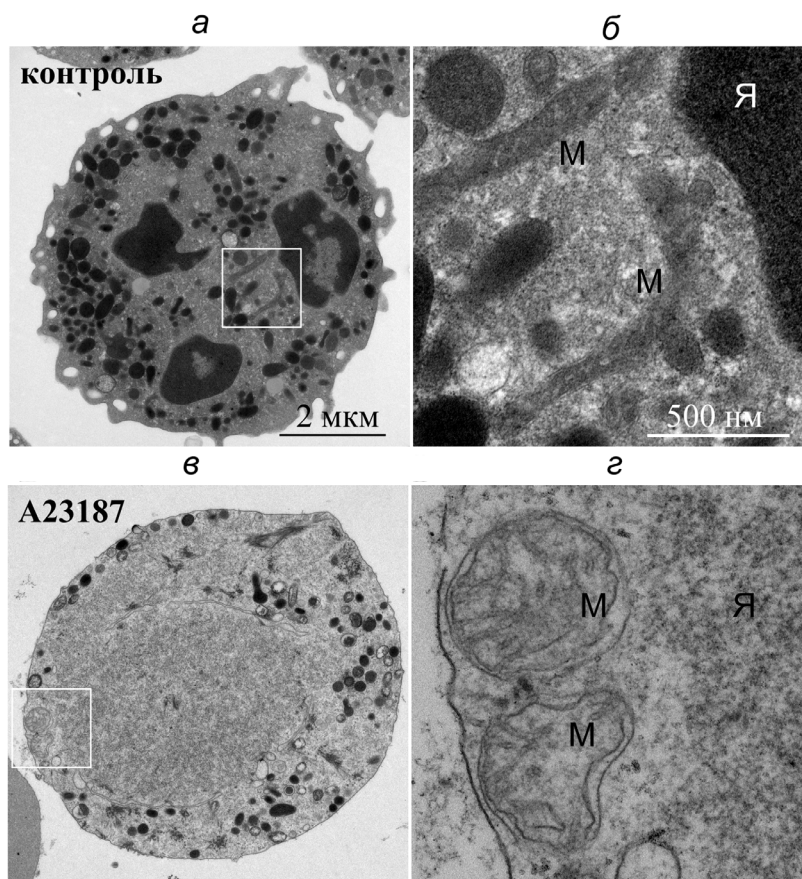
Основные механизмы активации NADPH-оксидазы при НЕТОзе, скорее всего, мало отличаются от тех, которые обеспечивают окислительный взрыв нейтрофилов в ответ на патогены и иные стимулы. Изучая активацию NADPH-оксидазы под действием пептидного хемоаттрактанта *N*-формил-метионил-лейцил-фенилаланина (fMLP), который вызывает окислительный взрыв и дегрануляцию, но не НЕТОз, мы обнаружили, что в этих процессах важную роль играют митохондрии. Митохондриально-направленный антиоксидант SkQ1 в субмикромольных концентрациях предотвращал активацию NADPH-оксидазы под действием fMLP, но не ФМА [15]. Митохондриальные АФК (мтАФК) стимулировали NADPH-оксидазу при участии РКС, но непосредственная мишень их действия осталась неизвестной. Это может быть и сама РКС, которая имеет два редокс-чувствительных серно-цинковых кластера в диацилглицерол-связывающем домене. Кроме того, некоторые члены семейства Src-киназ (в частности, киназа Lyn), стимулирующие РКС благодаря фосфорилированию остатков тирозина, активируются под действием АФК [27]. Еще один редокс-чувствительный механизм активации NADPH-оксидазы нейтрофилов основан на АФК-зависимой ассоциации белка дисульфидизомеразы с субъединицей p47phox, что приводит к её транслокации на мембрану с последующей сборкой NADPH-оксидазы [28].

Активация NADPH-оксидазы под действием мтАФК была впервые продемонстрирована Dikalova et al. [29] на эндотелиальных клетках. Они показали, что митохондриально-направленный антиоксидант MitoTEMPO и экспрессия митохондриальной супероксиддисмутазы SOD2 подавляют активацию NADPH-оксидазы, вызванную гормоном ангиотензином II, стимулирующим гипертонию. Дальнейшие исследования показали, что мтАФК в эндотелии стимулируют лишь одну из четырех изоформ NADPH-оксидазы – NOX2 [30], и именно эта изоформа характерна для нейтрофилов. В нейтрофилах была описана активация NADPH-оксидазы под действием миксотиазола, ингибитора комплекса III дыхательной цепи, который стимулировал продукцию мтАФК [31]. В нашем исследовании [15] повышение мтАФК и активности NADPH-оксидазы было вызвано сигналом от G-белок-связанного рецептора fMLP, который инициирует освобождение  $Ca^{2+}$  из внутриклеточных депо, а также  $Ca^{2+}$ -независимую активацию PI3K. Оба этих сигнальных пути, по-видимому, важны для рецептор-опосредованной активации NADPH-оксидазы в нейтрофилах [27].

$Ca^{2+}$ -зависимая генерация мтАФК может служить преобладающим источником АФК в случае индукции НЕТОза, вызванного  $Ca^{2+}$ -ионофорами (A23187 и иономицин) [32] и некоторыми другими стимулами [33, 34]. Это обстоятельство привело к формированию представлений о двух различных механизмах НЕТОза, один из которых не зависит от NADPH-оксидазы (см. обзор [5]). В действительности, в большинстве таких случаев мтАФК стимулируют NADPH-оксидазу, которая вносит свой вклад в инициацию НЕТОза. Так, например, в недавно проведенной нами работе [16] было показано, что НЕТОз, индуцированный A23187, подавляется как под действием митохондриально-направленного антиоксиданта SkQ1, так и специфических ингибиторов NADPH-оксидазы. Вместе с тем было также показано, что в нейтрофилах, выделенных из крови пациентов с X-сцепленной ХГБ, образование NET в ответ на A23187 зависит от усиленной генерации мтАФК без участия NADPH-оксидазы [16]. Предположено, что у дефицитных по NADPH-оксидазе нейтрофилов мтАФК образуются с повышенной интенсивностью благодаря избыточному накоплению  $Ca^{2+}$ , и их количества хватает для запуска НЕТОза [35]. Неконтролируемое поступление  $Ca^{2+}$  в цитоплазму нейтрофилов при ХГБ объясняется, по-видимому, отсутствием электрогенной функции NADPH-оксидазы и деполяризации мембраны при активации [36].

Наши исследования показали, что генерация мтАФК, вызванная как fMLP, так и A23187, зависит от открытия неселективной митохондриальной поры (mPTP) [16]. Этот факт долго оставался незамеченным, вероятно, из-за того, что наиболее известный ингибитор mPTP циклоспорин А (CsA) является также ингибитором цитоплазматической фосфатазы кальциневрина, которая участвует в передаче многочисленных  $Ca^{2+}$ -зависимых сигналов [37]. Мы же использовали ингибиторы mPTP санглиферин А и бонгкрековую кислоту, которые не влияют на кальциневрин. Интересно, что при активации fMLP не наблюдалось значительного снижения мембранного потенциала митохондрий и не происходило их набухания, характерного для продолжительного открытия mPTP. Скорее всего, в данном случае происходило кратковременное обратимое открытие поры, вызванное кратковременным повышением цитоплазматического  $Ca^{2+}$ , характерного для стимуляции fMLP. Этот режим открытия mPTP был описан как для изолированных митохондрий [37], так и для клеточных моделей [38]. Сигнальная функция открытия mPTP и связанная с этим продукция мтАФК была описана ранее в эндотелиальных





**Рис. 1.** Электронная микроскопия нейтрофилов, находящихся на ранних стадиях НЕТоза. *а, б* – Интактный нейтрофил человека; *в, г* – нейтрофил, стимулированный 2 мкМ А23187 в течение 30 мин. В клетках наблюдалась деконденсация хроматина, характерная для НЕТоза. Одновременно происходило набухание митохондрий, что свидетельствовало об открытии неселективной митохондриальной поры (mPTP). Масштаб: 2 мкм (*а, в*) и 500 нм (*б, г*) [16]. Изображения получены С.А. Голышевым (НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского, МГУ) и цитируются с любезного разрешения издательства Elsevier

клетках [30] и нейтрофилах, обработанных миксотиазолом [31].

НЕТоз, индуцированный А23187, также зависел от открытия mPTP [16]. В данном случае электронно-микроскопическое исследование выявило значительное набухание митохондрий, которое совпадало с деконденсацией хроматина и разрушением ядерной оболочки (рис. 1).

Можно полагать, что значительное повышение цитоплазматического  $Ca^{2+}$  под действием А23187 привело к продолжительному открытию поры.  $Ca^{2+}$ -зависимое открытие mPTP стимулировало образование мТАФК, а ингибиторы mPTP предотвращали их накопление. Непосредственной причиной избыточного образования мТАФК, возможно, послужил выход из митохондрий через пору основных компонентов их антиоксидантной защиты, NADPH [38] и восстановленного глутатиона [16]. Наряду с  $Ca^{2+}$  эффективным индуктором mPTP является окисли-

тельный стресс [37]. Возможно, АФК, образуемые NADPH-оксидазой, проникнув в клетку, стимулируют открытие mPTP, создавая петлю усиления, ведущую к НЕТозу (рис. 2).

Открытие митохондриальной поры издавна рассматривается как один из этапов реализации программы апоптоза [39]. Первоначально предполагалось, что вызванное порой набухание матрикса вызывает разрыв внешней мембраны митохондрий и выход проапоптотических белков (в частности, цитохрома *c*) из межмембранного пространства в цитоплазму. В дальнейшем эта гипотеза была модифицирована с учётом данных о выходе цитохрома *c* через белковые поры в мембране. Предполагалось, что открытие mPTP способствует изменению морфологии внутренней мембраны и освобождению цитохрома *c* из пространства внутри крист [40]. Детали этого механизма остаются не вполне понятными, но не вызывает сомнений, что специфические ингибиторы поры предотвращают апоп-

тоз в различных моделях. Несомненно также и возможность участия mPTP в индукции некротической гибели. В частности, это наблюдается при ишемии/реперфузии сердца и определяет защитное действие ингибиторов поры [41]. Приведенные выше данные позволяют поставить НЕТоз, индуцированный кальциевыми ионофорами, в этот ряд ПГК. Обнаруженное нами участие мтАФК в активации NADPH-оксидазы при таком НЕТозе, который часто называют NADPH-оксидаза-независимым, указывает на то, что его правильнее именовать митохондриально-зависимым НЕТозом.

#### Механизмы реализации программы НЕТоза.

Важным событием при НЕТозе является выход различных белков из гранул в цитозоль. Прежде всего, это касается азурофильных гранул, в состав которых входит белковый комплекс «азуросома». Она включает восемь типов белков, три из которых представляют собой высокомолекулярные сериновые протеазы – нейтрофильная эластаза (НЭ), катепсин G и азуроцидин, и, кроме того, миелопероксидазу (МРО), фермент, который вырабатывает гипохлорит-ани-

он, используя в качестве субстратов хлор и пероксид водорода. Показано, что АФК вызывают диссоциацию азуросомы, что приводит к выходу сериновых протеаз и МРО из гранул в цитозоль [42]. Сериновые протеазы (прежде всего, НЭ) расщепляют элементы цитоскелета, что способствует протеканию НЕТоза [43]. Кроме того, они мигрируют в ядро, где расщепляют ламину и гистоны, способствуя деконденсации хроматина и разрушению ядерной оболочки. Важную роль в диссоциации азуросомы и выходе протеаз из гранул играет МРО [42, 44]. Интересно, что ферментативная активность МРО для этого не нужна. Возможно, этот гем-содержащий белок служит внутриклеточным рецептором перекиси водорода. Тем не менее, активность МРО требуется для НЕТоза, поскольку гипохлорит-анион стимулирует активность нейтрофильной эластазы [42]. Следует отметить, что АФК-зависимый выход белков из гранул при НЕТозе во многом напоминает АФК-зависимую пермеабиллизацию лизосом и выход из них катепсинов, что характерно для многих вариантов некроза [45].

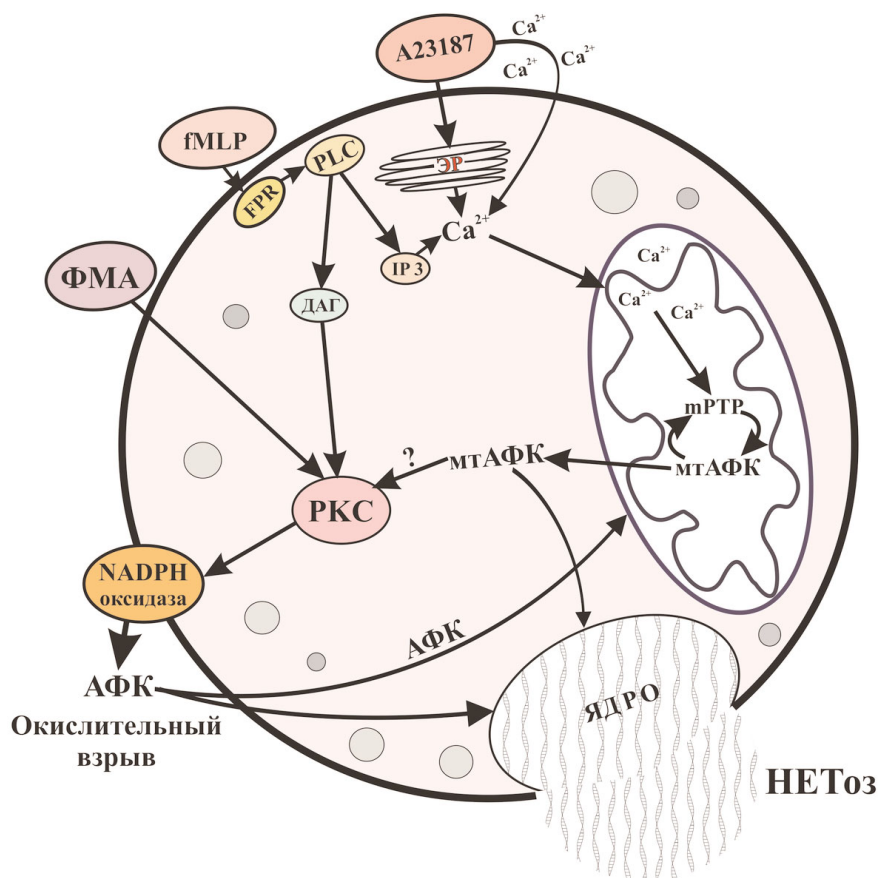


Рис. 2. Схема, иллюстрирующая различные механизмы НЕТоза

Из цитоплазмы в ядро также поступает пептидил-аргинин дезаминаза 4 (PAD4), которая катализирует цитруллинирование гистонов, что приводит к окончательной деконденсации хроматина. Ингибирование PAD4 предотвращает деконденсацию хроматина и НЕТоз, вызванные  $\text{Ca}^{2+}$ -ионофором или бактерией *Shigella flexneri*, а нейтрофилы, полученные из мышей с нокаутом по гену *PAD4*, не формируют NET в ответ на ФМА [46]. Пептидил-аргинин дезаминазы являются  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающими белками и их активность стимулируется  $\text{Ca}^{2+}$ . С другой стороны, PAD4 активируется и вызывает цитруллинирование гистонов в ответ на добавку пероксида водорода [46]. Кроме того, ЛПС-зависимое цитруллинирование гистонов и НЕТоз зависят от интактности микротрубочек [47]. По всей видимости, сочетание всех этих факторов необходимо для активации PAD4. Наряду с пептидил-аргинин дезаминазой, модификация гистонов при НЕТозе может включать и ацетилирование, но его роль в НЕТозе пока мало изучена [5]. Деконденсация хроматина, а также протеолитическое повреждение ядерной ламина приводят к разрушению ядерной оболочки и выходу хроматина в цитоплазму. Недавно было показано, что НЕТоз может происходить благодаря активации циклин-зависимых киназ (CDK), которые способствуют вступлению в клеточный цикл [48]. Возможно, такие части аппарата митоза, как фосфорилирование ламина и расхождение центросом, используются для разрушения ядерной оболочки при НЕТозе.

На завершающей стадии НЕТоза происходит образование пор в плазматической мембране и освобождение хроматина во внешнюю среду с образованием NET. Белки, вышедшие из гранул, прочно связываются с деконденсированным хроматином благодаря электростатическому взаимодействию. Поры, пропускающие эти гигантские комплексы, формируются белком газдермином D (GSDMD), который формирует также поры в мембране макрофагов при пироптозе. В отличие от пироптоза, где активация GSDMD происходит благодаря расщеплению под действием каспаз-1 и -4/5 (каспаза-11, у мышей), в нейтрофилах его расщепляет и активирует преимущественно нейтрофильная эластаза [49, 50]. Активация GSDMD, возможно, приводит к формированию пор не только в плазматической, но и в ядерной мембране [51]. Каспаза-зависимая активация GSDMD в нейтрофилах также возможна в результате неканонической активации инфламмосомы [51], однако роль этого механизма в НЕТозе требует дальнейшего изучения. Родственный GSDMD газдермин E активируется каспазой-3, что приво-

дит к пермеабиллизации митохондрий и усилению апоптоза, а также ко вторичному некрозу [52, 53]. При некроптозе под действием RIP киназ происходит активация другого порообразующего белка MLKL (не родственного газдермину), что также приводит к выбросу NET [11–13].

**Физиологическая модуляция НЕТоза.** В физиологических условиях отношение концентраций  $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ , pH и содержание  $\text{O}_2$  могут модулировать НЕТоз. В умеренно щелочных условиях и при сниженном соотношении  $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$  уровень НЕТоза, вызванного ФМА,  $\text{Ca}^{2+}$ -ионофором, микрокристаллами мочевой кислоты и ЛПС, был повышен [54]. Повышение pH в цитоплазме нейтрофилов вызывало увеличение концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  и усиленную продукцию АФК как NADPH-оксидазой, так и митохондриями [55]. Снижение pH среды вызывает угнетение НЕТоза, возможно, благодаря торможению гликолиза [56]. Кроме того, при низком pH резко снижается вероятность открытия mPTP [37], что может понизить продукцию mtАФК [16]. Предполагается, что pH-зависимость НЕТоза приводит к тому, что на периферии очага воспаления он максимально активирован и предохраняет ткань от проникновения патогенов, а в центре очага, для которого характерен низкий pH, НЕТоз ослаблен и не усиливает повреждение тканей [54]. Сведения о влиянии гипоксии на НЕТоз противоречивы. С одной стороны, нокаут Hif-1 $\alpha$  (основного транскрипционного фактора, регулирующего адаптацию к гипоксии) подавлял НЕТоз, а фармакологическая стабилизация Hif-1 $\alpha$  его стимулировала [57]. С другой стороны, НЕТоз, вызванный ФМА (но не *S. aureus*), при гипоксии понижался, и этот эффект не зависел от Hif-1 $\alpha$  [58]. Помимо состава среды, НЕТоз зависит от её осмолярности, так что гипертоническая среда подавляла продукцию АФК и НЕТоз. Уровень АФК в данном случае был критичен, так как добавление пероксида водорода восстанавливало НЕТоз [59].

Цитокины и медиаторы воспаления играют важную роль в активации НЕТоза, в то же время некоторые противовоспалительные факторы могут вызывать обратный эффект. Так, простагландин E2, играющий важную роль в разрешении воспаления, ингибирует НЕТоз благодаря увеличению внутриклеточного содержания циклического АМФ [60, 61]. Активированный С-белок (сериновая протеиназа, обладающая противосвертывающим и противовоспалительным действием) также может ингибировать НЕТоз благодаря связыванию со специфическим рецептором (EPSCR) или взаимодействию с протеаза-активируемым рецептором 3 (PAR3) и ин-



тегринами CD11b/CD18 (Mac-1). Интересно, что тот же активированный С-белок может расщеплять гистоны, входящие в состав NET [62]. Показано, что НЕТОз подавляется важным противовоспалительным цитокином IL-10 [63]. Пептиды, эффективно подавляющие образование NET, были обнаружены в пуповинной крови. Наиболее распространенный пептид получил название «неонатальный NET-ингибирующий фактор» (nNIF). Этот пептид избирательно ингибировал НЕТОз, не влияя на фагоцитоз и другие функции нейтрофилов. Его внутривенное введение защищало мышей от системного воспаления, вызванного ЛПС, и от микробного сепсиса [64].

Патогенные микроорганизмы обладают широким спектром приспособлений, препятствующих микробицидному действию NET [65]. Многие микроорганизмы вырабатывают литические ферменты (прежде всего, эндонуклеазы), разрушающие NET. Такие бактерии, как *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium tuberculosis*, а также грибы рода *Aspergillus*, вырабатывают защитные и маскирующие внеклеточные оболочки. В случае *P. aeruginosa* покрытие сиаловыми кислотами вызывает продукцию IL-10, который подавляет НЕТОз. Этот же механизм, по-видимому, использует вирус иммунодефицита человека (HIV-1). Вирионы HIV-1 стимулируют выработку IL-10 дендритными клетками, что защищает вирус от литического действия ферментов, входящих в NET [63]. Вирус гепатита В (HBV) ингибирует НЕТОз, подавляя продукцию АФК в нейтрофилах с помощью белка оболочки НВЕ и корового белка НВС [66].

## ПРИЖИЗНЕННОЕ ОБРАЗОВАНИЕ NET

Наряду с описанным выше суицидальным НЕТОзом существуют также механизмы выброса ДНК, при которых нейтрофилы сохраняют свою жизнеспособность и естественные эффекторные функции [6]. Для описания этих процессов был использован термин «витальный НЕТОз». Однако Комитет по номенклатуре клеточной гибели в 2018 г. [67] не рекомендовал использовать термин НЕТОз для процессов, не сопряженных с гибелью клетки. Впервые прижизненный выброс хроматина был описан в системе, где присутствовали нейтрофилы и тромбоциты, активированные ЛПС, которые связывались с TLR4 [68]. НЕТОз в данном случае происходил значительно быстрее, чем при индукции ФМА, а роль NADPH-оксидазы и АФК не была изучена. К сожалению, эта интересная модель, имеющая очевидное физиологическое значе-

ние, в дальнейшем не была исследована. Сходный витальный выброс хроматина наблюдали *in vivo* при заражении кожи грамположительными бактериями [69]. Для индукции этого процесса требовалась опсонизация бактерий, которые взаимодействовали с TLR2 и активировали систему комплемента. Интересно, что после выброса хроматина безъядерные нейтрофилы были способны к хемотаксису и фагоцитозу бактерий.

Массированный и очень быстрый выброс митохондриальной ДНК (мтДНК) без утраты жизнеспособности наблюдался в эозинофилах и нейтрофилах, праймированных провоспалительными цитокинами IL-5/IFN- $\gamma$  или GM-CSF, соответственно, и стимулированных ЛПС [70, 71]. В обоих типах гранулоцитов этот процесс зависел от активности NADPH-оксидазы. Аналогичный феномен наблюдался и в случае базофилов [18]. Сходный выброс мтДНК был обнаружен у В- и Т-лимфоцитов, а также у натуральных киллерных клеток (NK-клетки) в ответ на олигодезоксинуклеотиды [72]. В отличие от гранулоцитов, выброс митохондриальной ДНК из лимфоцитов не зависел от NADPH-оксидазы. Вопрос о функциональной роли внеклеточной мтДНК остается открытым. Низкое содержание митохондрий в нейтрофилах и особенно в эозинофилах делает маловероятным образование функциональных митохондриальных ловушек. В случае лимфоцитов внеклеточная мтДНК не содержала литических ферментов и, скорее всего, выполняла сигнальную функцию. В частности, мтДНК стимулировала экспрессию и секрецию интерферонов I типа мононуклеарами периферической крови [72]. Следует отметить, что внеклеточная мтДНК (часто окисленная) встречается в крови при широком спектре патологий, включая системную красную волчанку, аутоиммунное заболевание, в патогенезе которого важную роль играет НЕТОз [33].

## РОЛЬ НЕТОза В ЗАЩИТЕ ХОЗЯИНА И ПАТОЛОГИИ

В первых же работах по НЕТОзу высказывали соображения о физиологической защитной роли этого явления. В частности, структуры, подобные NET, были обнаружены в содержимом аппендикса [2]. В дальнейшем NET были обнаружены в очень большом числе органов и тканей [6], однако вопрос о его защитном действии по-прежнему остается открытым. НЕТОз наблюдается в очагах инфекций и, по-видимому, замедляет распространение патогенов. Так, показано, что НЕТОз при стафилококковой ин-

фекции кожи тормозит проникновение патогенов в кровотоки [69]. Мыши, не способные к НЕТозу из-за нокаута гена *PAD4*, значительно сильнее страдали от некротического фасциита, вызванного *Streptococcus pyogenes* группы А [46]. Однако избыточное образование NET, связанное как с усиленным НЕТозом, так и с нарушением механизмов их устранения, может приводить к воспалительным и аутоиммунным патологиям, а также к закупорке протоков и кровеносных сосудов.

**НЕТоз на поверхности эпителия.** Микроорганизмы постоянно атакуют эпителиальные барьеры, индуцируя образование NET на поверхности слизистой полости рта, глаз и кожи. Поэтому образование NET и их деградация должны строго регулироваться, чтобы не вызвать воспаления в этих тканях. Был описан ряд заболеваний, в которых NET играют как противомикробную, так и патогенетическую роль.

На поверхности роговицы глаза НЕТоз участвует в защите как от бактериальной, так и грибковой инфекции. У пациентов с выраженным НЕТозом грибковый кератит протекал значительно легче [73], однако НЕТоз осложнял течение кератита, вызванного клиническими изолятами *P. aeruginosa* в мышинной модели [74]. В случае стерильного воспаления роговицы при синдроме сухого глаза также наблюдалось накопление NET [75]. Одной из причин НЕТоза могла быть повышенная осмолярность слезной жидкости, омывающей роговицу [76]. Для синдрома сухого глаза, который часто возникает как проявление реакции «трансплантат против хозяина» при пересадках костного мозга [77], и для аутоиммунного синдрома Шегрена [78] также характерно накопление NET в слезной жидкости. Интересно, что митохондриально-направленный антиоксидант SkQ1 (в составе глазных капель «Визомитин») доказал свою высокую эффективность при терапии синдрома сухого глаза различной этиологии [79]. Можно полагать, что этот эффект SkQ1 отчасти связан с обнаруженным нами подавлением НЕТоза [16].

**Роль НЕТоза в тромбообразовании.** НЕТоз играет важную роль в патогенезе тромбозов различного происхождения [80, 81]. Так, например, в модели стеноза нижней полой вены у мышей с нокаутом гена *PAD4* вероятность тромбоза была значительно снижена [82]. Участие НЕТоза в тромбозе определяется взаимодействием NET с эндотелием и тромбоцитами, а также задержкой мелких тромбов. НЕТоз, по-видимому, определяет тромбоз, связанный с избыточными реакциями врожденного иммунитета («иммунотромбоз») [83]. Иммунотромбоз, предположительно, является защитной реакцией организма

на патогены, облегчающей их захват в фибриновом сгустке. Кроме того, тромбы мелких сосудов могут создавать отсеки, где патогены могут быть эффективно уничтожены. При этом последствия такой реакции могут быть трагическими. Недавнее масштабное клиническое исследование выявило корреляцию между уровнем НЕТоза и тяжестью ишемического инсульта и инфаркта миокарда [84]. НЕТоз может активироваться микрокристаллами холестерина и участвовать в патогенезе атеросклероза. Гистоны в составе NET вызывают TLR4-зависимую активацию макрофагов и выброс цитокинов, активирующих Т-хелперные клетки (Th17) [85, 86]. Воспалительный процесс в бляшках может служить одной из причин тромбоза. Еще одной причиной тромбоза могут быть онкологические заболевания, и НЕТоз, предположительно, участвует в тромбообразовании [87]. С другой стороны, терапевтическое вирусное инфицирование опухолей индуцирует нейтрофил-зависимую внутриопухолевую коагуляцию и гибель раковых клеток. Однако предстоит еще выяснить, действительно ли этот процесс обусловлен НЕТозом [88]. Тромбоз, характерный для различных вирусных инфекций, может быть связан с избыточным НЕТозом, и, по-видимому, участвует в патогенезе COVID-19 (см. ниже).

В протоках поджелудочной железы НЕТоз может быть вызван микрокристаллами карбоната кальция, что ведет к закупорке панкреатического протока и панкреатиту [89]. Подобные кристаллы вызывают НЕТоз в желчных протоках и желчном пузыре, что может вести к образованию желчных камней [90].

**Роль НЕТоза в развитии легочных заболеваний.** В дыхательных путях НЕТоз вносит свой вклад в защиту от инфекции, повышая вязкость слизи и способствуя уничтожению патогенов, однако многие из них (в частности, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*) вырабатывают эндонуклеазы, которые расщепляют NET и защищают себя от гибели [91]. Вместе с тем НЕТоз способствует развитию осложнений инфекционных заболеваний легких, таких как острый респираторный дистресс-синдром (ОРДС), хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ), а также бронхиальная астма и др. Проведенное недавно (но до начала эпидемии COVID-19) клиническое исследование внебольничной пневмонии показало корреляцию содержания NET и тяжести заболевания [92]. Острое повреждение легких (ОПЛ) и более тяжелый ОРДС, обусловленные разнообразной этиологией, сопровождаются избыточным НЕТозом [93]. НЕТоз при этих патологиях может участвовать в повреждении альвеолярного эпителия и



эндотелия. Для ХОБЛ, которая, как правило, связана с курением и загрязнением воздуха, и тяжелой «нейтрофильной» астмы также характерно накопление NET в мокроте и смывах из дыхательных путей [94]. Риновирусная инфекция на фоне астмы значительно повышала содержание NET [95]. При астме образование хроматин-содержащих ловушек может происходить также при гибели эозинофилов, подобной НЕТОзу [96].

Тяжелая острая респираторная инфекция COVID-19 (corona virus disease-19), вспыхнувшая в декабре 2019 г. в китайском городе Ухань и впоследствии переросшая в пандемию, поразила в настоящее время более 15 млн человек из 250 стран мира. Заболевание было вызвано новым коронавирусом, названным SARS-CoV-2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2), и сопровождалось вирусной пневмонией, часто прогрессирующей в ОРДС и полиорганную недостаточность. Повышенный уровень нейтрофилов в крови указывает на тяжесть этого заболевания и плохой прогноз [97]. При обследовании пациентов, инфицированных SARS-CoV-2, в крови был обнаружен повышенный уровень маркеров НЕТОза (свободной ДНК, комплексов МПО-ДНК и цитруллинированного гистона H3) и маркера гибели клеток лактатдегидрогеназы [98]. Концентрация свободной ДНК коррелировала с содержанием нейтрофилов, с уровнем маркера острой фазы воспаления С-реактивным белком и маркером тромбоза D-димером. Сыворотки пациентов с COVID-19 индуцировали НЕТОз у здоровых доноров в системе *in vitro*. Одним из проявлений COVID-19 является встречающийся у детей синдром Кавасаки (васкулит), для которого характерен избыточный НЕТОз [99]. НЕТОз при COVID-19 может быть вызван эпителиальными и эндотелиальными клетками, пораженными вирусом, активированными тромбоцитами и воспалительными цитокинами. В то же время избыточный НЕТОз участвует в развитии «цитокинового шторма» и тромбоза, которые являются основной причиной тяжелого течения COVID-19 [100].

**НЕТОз и аутоиммунные заболевания.** Многие компоненты NET, в частности, двуспиральная ДНК, белки гранул и гистоны, вызывают выработку антител и могут стимулировать развитие аутоиммунных заболеваний. Впервые участие НЕТОза в патогенезе аутоиммунных заболеваний было детально исследовано на примере системной красной волчанки [101]. При этом заболевании в крови появляется особая форма гранулоцитов, названная «гранулоциты низкой плотности». Эти клетки вырабатывают больше

воспалительных цитокинов (включая интерфероны I типа) и значительно легче входят в НЕТОз, чем нормальные нейтрофилы. Их NET содержат больше аутоантигенов и окисленной митохондриальной ДНК [33], что делает их более сильными иммуностимуляторами. Одной из особенностей гранулоцитов низкой плотности является усиленная продукция митохондриальных АФК. Недавно было показано, что митохондриально-направленный антиоксидант MitoQ (сходный по структуре с SkQ1) подавляет НЕТОз и патологические проявления в мышечной модели системной красной волчанки [102].

При ревматоидном артрите (РА) развитие патологии коррелировало с накоплением маркеров NET, комплексов ДНК с МПО и антител к цитруллинированным гистонам [103, 104]. Кроме того, на модели РА было установлено, что поглощение NET фибробластами стимулировало образование антител против цитруллинированных гистонов [105]. Подобные наблюдения свидетельствуют об участии НЕТОза в таких аутоиммунных заболеваниях, как васкулит, ассоциированный с «антителами против нейтрофилов» (AAV), антифосфолипидный синдром, рассеянный склероз и псориаз [106]. Интересно, что при некоторых заболеваниях НЕТОз может играть противовоспалительную роль. Так, при подагре НЕТОз, индуцированный кристаллами мочевой кислоты, сопровождается выбросом литических ферментов, которые расщепляют провоспалительные цитокины в очаге воспаления. Предполагается, что НЕТОз при подагре предотвращает развитие хронического заболевания [107].

## ТЕРАПИЯ НЕТОза

Выявленное участие НЕТОза в различных патологиях привело к интенсивному изучению и испытаниям различных терапевтических подходов. Одна их часть включает применение средств, препятствующих НЕТОзу. К ней относится антицитокиновая терапия, направленная на предотвращение накопления нейтрофилов в очагах поражения и их активацию, а также применение ингибиторов компонентов программы НЕТОза: HЭ, PAD4 и GSDMD. Другая часть связана с подходами, направленными на разрушение NET или ослабление их повреждающего действия. Антицитокиновая терапия, направленная против IL-1 $\beta$ , широко используется при различных воспалительных и аутоиммунных заболеваниях. Одной из её мишеней может являться избыточный НЕТОз. Рекомбинантный белок *Анакинра*, антагонист рецептора IL-1 $\beta$ , в

настоящее время проходит клинические испытания при COVID-19 ([https://clinicaltrials.gov: NCT04324021](https://clinicaltrials.gov/NCT04324021), [NCT04330638](https://clinicaltrials.gov/NCT04330638), [NCT02735707](https://clinicaltrials.gov/NCT02735707)). Из ингибиторов НЕТоза наиболее далеко продвинулись испытания ингибиторов НЭ. Первый из них, *сивелестат*, был разрешен к применению при ОРДС в Японии и Южной Корее, но мета-анализ клинических данных не подтвердил его эффективность [108]. Новое поколение ингибиторов НЭ в настоящее время находится лишь на первой стадии клинических испытаний. Ингибиторы GSDMD и PAD4 находятся на доклинической стадии разработки. Большой интерес представляет использование существующих лекарственных препаратов. Так, *дисульфирам*, который используется для лечения алкоголизма, ингибирует GSDMD и защищает мышью от гибели в модели сепсиса, вызванного ЛПС [109]. Надо отметить, что GSDMD является также критическим компонентом программы пироптоза, и авторы исследования связывают его эффект с предотвращением пироптоза макрофагов. Эксперименты *in vitro* показали, что НЕТоз предотвращается ингибиторами микротрубочек [47]. К этой группе препаратов относится *колхицин*, и в настоящее время ведутся клинические испытания колхицина при COVID-19 ([https://clinicaltrials.gov: NCT04326790](https://clinicaltrials.gov/NCT04326790), [NCT04328480](https://clinicaltrials.gov/NCT04328480), [NCT04322565](https://clinicaltrials.gov/NCT04322565), [NCT04322682](https://clinicaltrials.gov/NCT04322682)).

Среди препаратов, направленных на разрушение NET, наиболее детально исследованы ДНКазы I и антитела против гистонов. Рекомбинантная ДНКазы I была успешно использована практически во всех моделях патологий, сопряженных с НЕТозом. В частности, введение ДНКазы I значительно облегчает течение ОРДС [93] и ХОБЛ [94] в моделях на животных. У пациентов с муковисцидозом ингаляция ДНКазы улучшала функцию легких, а нейтрофильная эластаза способствовала растворению мокроты, делая её более доступной для ДНКазы [110]. Клинические испытания актин-резистентной ДНКазы (PRX-110) проходят вторую фазу и дают обнадеживающие результаты ([https://clinicaltrials.gov: NCT02605590](https://clinicaltrials.gov/NCT02605590), [NCT02722122](https://clinicaltrials.gov/NCT02722122)). Можно надеяться, что ДНКазы будут не только разжижать мокроту, но и сможет препятствовать развитию ОРДС, как это наблюдалось в экспериментах на животных.

Наши эксперименты с митохондриально-направленным антиоксидантом SkQ1 показали его потенциальную эффективность против НЕТоза [16]. В модели системного воспалительного синдрома на мышях SkQ1 предотвращал летальное действие воспалительного цитокина

TNF [111]. Сходный по структуре с SkQ1 антиоксидант MitoQ также подавлял НЕТоз в мышечной модели системной красной волчанки [102]. Эти результаты позволяют надеяться на то, что на основе митохондриально-направленных антиоксидантов могут быть созданы препараты для терапии болезней, связанных с избыточным НЕТозом и, в частности, с COVID-19.

Программа образования нейтрофильных внеклеточных ловушек (НЕТоз) изучается с высокой интенсивностью, однако многие вопросы относительно его механизмов и физиологической роли остаются открытыми. Прежде всего, это относится к сигнальным механизмам инициации НЕТоза. В частности, остаются неясными процессы, ведущие к модификации хроматина и его деконденсации. Не определены пока мишени для действия мТАФК и детали мТАФК-зависимой активации NADPH-оксидазы. Предполагается, что избыточный НЕТоз играет важную роль в патогенезе многих инфекционных, воспалительных и аутоиммунных заболеваний, но доказательств этому пока собрано недостаточно. Новый толчок к изучению патофизиологической роли НЕТоза может быть связан с его предполагаемой ролью в патогенезе COVID-19. Разработка новых лекарственных средств, предотвращающих НЕТоз, включая митохондриально-направленные антиоксиданты, представляется перспективным направлением фармакологических исследований.

**Благодарности.** Авторы выражают благодарность сотрудникам НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского МГУ О.Ю.Плетюшкиной, И.И.Галкину, С.А.Гольшеву, Р.А.Зиновкину и А.С.Приходько, принявших активное участие в экспериментальной работе, посвященной изучению НЕТоза, дегрануляции и окислительного взрыва нейтрофилов человека. Мы также от всего сердца благодарим Владимира Петровича Скулачева, который инициировал наши работы в области митохондриологии, и поздравляем нашего дорогого учителя с 85-летним юбилеем.

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 17-00-00088).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Соблюдение этических норм.** Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с использованием животных в качестве объектов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Takei, H., Araki, A., Watanabe, H., Ichinose, A., and Sendo, F. (1996) Rapid killing of human neutrophils by the potent activator phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) accompanied by changes different from typical apoptosis or necrosis, *J. Leukoc. Biol.*, **59**, 229-240, doi: 10.1002/jlb.59.2.229.
- Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D. S., Weinrauch, Y., and Zychlinsky, A. (2004) Neutrophil extracellular traps kill bacteria, *Science*, **303**, 1532-1535, doi: 10.1126/science.1092385.
- Steinberg, B. E., and Grinstein, S. (2007) Unconventional roles of the NADPH oxidase: signaling, ion homeostasis, and cell death, *Sci. STKE*, **379**, pe11, doi: 10.1126/stke.3792007pe11.
- Vorobjeva, N. V., and Pinegin, B. V. (2014) Neutrophil extracellular traps: mechanisms of formation and role in health and disease, *Biochemistry (Moscow)*, **79**, 1286-1296, doi: 10.1134/S0006297914120025.
- Ravindran, M., Khan, M. A., and Palaniyar, N. (2019) Neutrophil extracellular trap formation: physiology, pathology, and pharmacology, *Biomolecules*, **9**, 365, doi: 10.3390/biom9080365.
- Yousefi, S., Simon, D., Stojkov, D., Karsonova, A., Karaulov, A., and Simon, H. U. (2020) *In vivo* evidence for extracellular DNA trap formation, *Cell Death Dis.*, **11**, 300, doi: 10.1038/s41419-020-2497-x.
- Rada, B. (2017) Neutrophil extracellular traps and microcrystals, *J. Immunol. Res.*, **2017**, 2896380, doi: 10.1155/2017/2896380.
- Pinegin, B., Vorobjeva, N., and Pinegin, V. (2015) Neutrophil extracellular traps and their role in the development of chronic inflammation and autoimmunity, *Autoimmun. Rev.*, **14**, 633-640, doi: 10.1016/j.autrev.2015.03.002.
- Remijsen, Q., Vanden Berghe, T., Wirawan, E., Asselbergh, B., Parthoens, E., De Rycke, R., Noppen, S., Delforge, M., Willems, J., and Vandenabeele, P. (2011) Neutrophil extracellular trap cell death requires both autophagy and superoxide generation, *Cell Res.*, **21**, 290-304, doi: 10.1038/cr.2010.150.
- Germic, N., Stojkov, D., Oberson, K., Yousefi, S., Simon, H. U. (2017) Neither eosinophils nor neutrophils require ATG5-dependent autophagy for extracellular DNA trap formation, *Immunology*, **152**, 517-525, doi: 10.1111/imm.12790.
- Desai, J., Kumar, S. V., Mulay, S. R., Konrad, L., Romoli, S., et al. (2016) PMA and crystal-induced neutrophil extracellular trap formation involves RIPK1-RIPK3-MLKL signaling, *Eur. J. Immunol.*, **46**, 223-229, doi: 10.1002/eji.201545605.
- Schreiber, A., Rousselle, A., Becker, J. U., von Mässenhausen, A., Linkermann, A., and Kettritz, R. (2017) Necroptosis controls NET generation and mediates complement activation, endothelial damage, and autoimmune vasculitis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, E9618-E9625, doi: 10.1073/pnas.1708247114.
- D'Cruz, A. A., Speir, M., Bliss-Moreau, M., Dietrich, S., Wang, S., et al. (2018) The pseudokinase MLKL activates PAD4-dependent NET formation in necroptotic neutrophils, *Sci. Signal.*, **11**, ea01716, doi: 10.1126/scisignal.a01716.
- Pinegin, B., Vorobjeva, N., Pashenkov, M., and Chernyak, B. (2018) The role of mitochondrial ROS in antibacterial immunity, *J. Cell. Physiol.*, **233**, 3745-3754, doi: 10.1002/jcp.26117.
- Vorobjeva, N., Prikhodko, A., Galkin, I., Pletjushkina, O., Zinovkin, R., Sud'ina, G., Chernyak, B., and Pinegin, B. (2017) Mitochondrial reactive oxygen species are involved in chemoattractant-induced oxidative burst and degranulation of human neutrophils *in vitro*, *Eur. J. Cell. Biol.*, **96**, 254-265, doi: 10.1016/j.ejcb.2017.03.003.
- Vorobjeva, N., Galkin, I., Pletjushkina, O., Golyshev, S., Zinovkin, R., Prikhodko, A., Pinegin, V., Kondratenko, I., Pinegin, B., and Chernyak, B. (2020) Mitochondrial permeability transition pore is involved in oxidative burst and NETosis of human neutrophils, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis. Dis.*, **1866**, 165664, doi: 10.1016/j.bbadis.2020.165664.
- Von Köckritz-Blickwede, M., Goldmann, O., Thulin, P., Heinemann, K., Norrby-Teglund, A., Rohde, M., and Medina, E. (2008) Phagocytosis-independent antimicrobial activity of mast cells by means of extracellular trap formation, *Blood*, **111**, 3070-3080, doi: 10.1182/blood-2007-07-104018.
- Morshed, M., Hlushchuk, R., Simon, D., Walls, A. F., Obata-Ninomiya, K., Karasuyama, H., Djonov, V., Eggel, A., Kaufmann, T., Simon, H. U., and Yousefi, S. (2014) NADPH oxidase-independent formation of extracellular DNA traps by basophils, *J. Immunol.*, **192**, 5314-5323, doi: 10.4049/jimmunol.1303418.
- Granger, V., Faille, D., Marani, V., Noël, B., Gallais, Y., Szely, N., Flament, H., Pallardy, M., Chollet-Martin, S., and de Chaisemartin, L. (2017) Human blood monocytes are able to form extracellular traps, *J. Leukoc. Biol.*, **102**, 775-781, doi: 10.1189/jlb.3MA0916-411R.
- Chow, O. A., von Köckritz-Blickwede, M., Bright, A. T., Hensler, M. E., Zinkernagel, A. S., Cogen, A. L., Gallo, R. L., Monestier, M., Wang, Y., Glass, C. K., and Nizet, V. (2010) Statins enhance formation of phagocyte extracellular traps. Statins enhance formation of phagocyte extracellular traps, *Cell. Host Microbe*, **8**, 445-454, doi: 10.1016/j.chom.2010.10.005.
- Zhang, X., Zhuchenko, O., Kuspa, A., and Soldati, T. (2016) Social amoebae trap and kill bacteria by casting DNA nets, *Nat. Commun.*, **7**, 10938, doi: 10.1038/ncomms10938.
- Hawes, M., Allen, C., Turgeon, B. G., Curlango-Rivera, G., Minh Tran, T., Huskey, D. A., and Xiong, Z. (2016) Root border cells and their role in plant defense, *Annu. Rev. Phytopathol.*, **54**, 143-161, doi: 10.1146/annurev-phyto-080615-100140.
- Fuchs, T. A., Abed, U., Goosmann, C., Hurwitz, R., Schulze, I., Wahn, V., Weinrauch, Y., Brinkmann, V., and Zychlinsky, A. (2007) Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps, *J. Cell. Biol.*, **176**, 231-241, doi: 10.1083/jcb.200606027.
- Lu, D. J., Furuya, W., and Grinstein, S. (1993) Involvement of multiple kinases in neutrophil activation, *Blood Cells*, **19**, 343-351.
- Hakim, A., Fuchs, T. A., Martinez, N. E., Hess, S., Prinz, H., Zychlinsky, A., and Waldmann, H. (2011) Activation of the Raf-MEK-ERK pathway is required for neutrophil extracellular trap formation, *Nat. Chem. Biol.*, **7**, 75-77, doi: 10.1038/nchembio.496.
- Fonseca, Z., Díaz-Godínez, C., Mora, N., Alemán, O. R., Uribe-Querol, E., Carrero, J. C., and Rosales, C. (2018). Entamoeba histolytica induce signaling via Raf/MEK/ERK for neutrophil extracellular trap (NET) formation, *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, **8**, 226, doi: 10.3389/fcimb.2018.00226.
- Steinberg, S. F. (2015) Mechanisms for redox-regulation of protein kinase C, *Front. Pharmacol.*, **6**, 128, doi: 10.3389/fphar.2015.00128.
- Trevelin, S. C., and Lopes, L. R. (2015) Protein disulfide isomerase and Nox: new partners in redox signaling, *Curr. Pharm. Des.*, **21**, 5951-5963, doi: 10.2174/1381612821666151029112523.



29. Dikalova, A. E., Bikineyeva, A. T., Budzyn, K., Nazarewicz, R. R., McCann, L., Lewis, W., Harrison, D. G., and Dikalov, S. I. (2010) Therapeutic targeting of mitochondrial superoxide in hypertension, *Circ. Res.*, **107**, 106-116, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.109.214601.
30. Nazarewicz, R. R., Dikalova, A. E., Bikineyeva, A., and Dikalov, S. I. (2013) Nox2 as a potential target of mitochondrial superoxide and its role in endothelial oxidative stress, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **305**, H1131-1140, doi: 10.1152/ajpheart.00063.2013.
31. Kröll-Schön, S., Steven, S., Kossmann, S., Scholz, A., Daub, S., et al. (2014) Molecular mechanisms of the crosstalk between mitochondria and NADPH oxidase through reactive oxygen species-studies in white blood cells and in animal models, *Antioxid. Redox Signal.*, **20**, 247-266, doi: 10.1089/ars.2012.4953.
32. Douda, D. N., Khan, M. A., Grasemann, H., and Palaniyar, N. (2015) SK3 channel and mitochondrial ROS mediate NADPH oxidase-independent NETosis induced by calcium influx, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112**, 2817-2822, doi: 10.1073/pnas.1414055112.
33. Lood, C., Blanco, L. P., Purmalek, M. M., Carmona-Rivera, C., De Ravin, S. S., et al. (2016) Neutrophil extracellular traps enriched in oxidized mitochondrial DNA are interferogenic and contribute to lupus-like disease, *Nat. Med.*, **22**, 146-153, doi: 10.1038/nm.4027.
34. Kenny, E. F., Herzig, A., Krüger, R., Muth, A., Mondal, S., Thompson, P. R., Brinkmann, V., Bernuth, H. V., and Zychlinsky, A. (2017) Diverse stimuli engage different neutrophil extracellular trap pathways, *Elife*, **6**, pii: e24437, doi: 10.7554/eLife.24437.
35. Vorobjeva, N. V., and Chernyak, B. V. (2020) NADPH oxidase modulates Ca<sup>2+</sup>-dependent formation of neutrophil extracellular traps, *Vestn. Mosk. Univ. Ser. 16. Biol.*, **75** (in press).
36. Tintinger, G. R., Theron, A. J., Steel, H. C., and Anderson, R. (2001) Accelerated calcium influx and hyperactivation of neutrophils in chronic granulomatous disease, *Clin. Exp. Immunol.*, **123**, 254-263, doi: 10.1046/j.1365-2249.2001.01447.x.
37. Bernardi, P., Rasola, A., Forte, M., and Lippe, G. (2015) The mitochondrial permeability transition pore: channel formation by F-ATP synthase, integration in signal transduction, and role in pathophysiology, *Physiol. Rev.*, **95**, 1111-1155, doi: 10.1152/physrev.00001.2015.
38. Dumas, J. F., Argaud, L., Cottet-Rousselle, C., Vial, G., Gonzalez, C., Detaillé, D., Lèverve, X., and Fontaine, E. (2009) Effect of transient and permanent permeability transition pore opening on NAD(P)H localization in intact cells, *J. Biol. Chem.*, **284**, 15117-15125, doi: 10.1074/jbc.M900926200.
39. Kroemer, G., Dallaporta, B., and Resche-Rigon, M. (1998) The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis, *Annu. Rev. Physiol.*, **60**, 619-642, doi: 10.1146/annurev.physiol.60.1.619.
40. Scorrano, L., Ashiya, M., Buttle, K., Weiler, S., Oakes, S. A., Mannella, C. A., and Korsmeyer, S. J. (2002) A distinct pathway remodels mitochondrial cristae and mobilizes cytochrome c during apoptosis, *Dev. Cell*, **2**, 55-67, doi: 10.1016/S1534-5807(01)00116-2.
41. Griffiths, E. J., and Halestrap, A. P. (1995) Mitochondrial non-specific pores remain closed during cardiac ischaemia, but open upon reperfusion, *Biochem. J.*, **307**, 93-98, doi: 10.1042/bj3070093.
42. Metzler, K. D., Goosmann, C., Lubojemska, A., Zychlinsky, A., and Papayannopoulos, V. (2014) A myeloperoxidase-containing complex regulates neutrophil elastase release and actin dynamics during NETosis, *Cell Rep.*, **8**, 883-896, doi: 10.1016/j.celrep.2014.06.044.
43. Papayannopoulos, V., Metzler, K. D., Hakkim, A., and Zychlinsky, A. (2010) Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps, *J. Cell. Biol.*, **191**, 677-691, doi: 10.1083/jcb.201006052.
44. Metzler, K. D., Fuchs, T. A., Nauseef, W. M., Reumaux, D., Roesler, J., Schulze, I., Wahn, V., Papayannopoulos, V., and Zychlinsky, A. (2011) Myeloperoxidase is required for neutrophil extracellular trap formation: implications for innate immunity, *Blood*, **117**, 953-959, doi: 10.1182/blood-2010-06-290171.
45. Repnik, U., Hafner Česen, M., and Turk, B. (2014) Lysosomal membrane permeabilization in cell death: concepts and challenges, *Mitochondrion*, **19 Pt. A**, 49-57, doi: 10.1016/j.mito.2014.06.006.
46. Li, P., Li, M., Lindberg, M. R., Kennett, M. J., Xiong, N., and Wang, Y. (2010) PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps, *J. Exp. Med.*, **207**, 1853-1862, doi: 10.1084/jem.20100239.
47. Neeli, I., Dwivedi, N., Khan, S., and Radic, M. (2009) Regulation of extracellular chromatin release from neutrophils, *J. Innate Immun.*, **1**, 194-201, doi: 10.1159/000206974.
48. Amulic, B., Knackstedt, S. L., Abu Abed, U., Deigendesch, N., Harbort, C. J., Caffrey, B. E., Brinkmann, V., Heppner, F. L., Hinds, P. W., and Zychlinsky, A. (2017) Cell-cycle proteins control production of neutrophil extracellular traps, *Dev. Cell*, **43**, 449-462.e5, doi: 10.1016/j.devcel.2017.10.013.
49. Kambara, H., Liu, F., Zhang, X., Liu, P., Bajrami, B., Teng, Y., Zhao, L., Zhou, S., Yu, H., Zhou, W., Silberstein, L. E., Cheng, T., Han, M., Xu, Y., and Luo, H. R. (2018) Gasdermin D exerts anti-inflammatory effects by promoting neutrophil death, *Cell Rep.*, **22**, 2924-2936, doi: 10.1016/j.celrep.2018.02.067.
50. Sollberger, G., Choidas, A., Burn, G. L., Habenberger, P., Di Lucrezia, R., Kordes, S., Menninger, S., Eickhoff, J., Nussbaumer, P., Klebl, B., Krüger, R., Herzig, A., and Zychlinsky, A. (2018) Gasdermin D plays a vital role in the generation of neutrophil extracellular traps, *Sci. Immunol.*, **3**, eaar6689, doi: 10.1126/sciimmunol.aar6689.
51. Chen, K. W., Monteleone, M., Boucher, D., Sollberger, G., Ramnath, D., Condon, N. D., von Pein, J. B., Broz, P., Sweet, M. J., and Schroder, K. (2018) Noncanonical inflammasome signaling elicits gasdermin D-dependent neutrophil extracellular traps, *Sci. Immunol.*, **3**, eaar6676, doi: 10.1126/sciimmunol.aar6676.
52. Rogers, C., Fernandes-Alnemri, T., Mayes, L., Alnemri, D., Cingolani, G., and Alnemri, E. S. (2017) Cleavage of DFNA5 by caspase-3 during apoptosis mediates progression to secondary necrotic/pyroptotic cell death, *Nat. Commun.*, **8**, 14128, doi: 10.1038/ncomms14128.
53. Rogers, C., Erkes, D. A., Nardone, A., Aplin, A. E., Fernandes-Alnemri, T., and Alnemri, E. S. (2019) Gasdermin pores permeabilize mitochondria to augment caspase-3 activation during apoptosis and inflammasome activation, *Nat. Commun.*, **10**, 1689, doi: 10.1038/s41467-019-09397-2.
54. Maueröder, C., Mahajan, A., Paulus, S., Gößwein, S., Hahn, J., Kienhöfer, D., Biermann, M. H., Tripal, P., Friedrich, R. P., Munoz, L. E., Neurath, M. F., Becker, C., Schett, G. A., Herrmann, M., and Leppkes, M. (2016) Ménage-à-Trois: the ratio of bicarbonate to CO<sub>2</sub> and the pH regulate the capacity of neutrophils to form NETs, *Front. Immunol.*, **7**, 583, doi: 10.3389/fimmu.2016.00583.
55. Naah de Souza, C., Breda, L. C. D., Khan, M. A., de Almeida, S. R., Câmara, N. O. S., Swezey, N., and

- Palaniyar, N. (2017) Alkaline pH promotes NADPH oxidase-independent neutrophil extracellular trap formation: a matter of mitochondrial reactive oxygen species generation and citrullination and cleavage of histone, *Front. Immunol.*, **8**, 1849, doi: 10.3389/fimmu.2017.01849.
56. Behnen, M., Möller, S., Brozek, A., Klinger, M., and Laskay, T. (2017) Extracellular acidification inhibits the ROS-dependent formation of neutrophil extracellular traps, *Front. Immunol.*, **8**, 184, doi: 10.3389/fimmu.2017.00184.
57. Lodge, K. M., Cowburn, A. S., Li, W., and Condliffe, A. M. (2020) The impact of hypoxia on neutrophil degranulation and consequences for the host, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 1183, doi: 10.3390/ijms21041183.
58. Branitzki-Heinemann, K., Möllerherm, H., Völlger, L., Husein, D. M., de Buhr, N., Blodkamp, S., Reuner, F., Brogden, G., Naim, H. Y., and von Köckritz-Blickwede, M. (2016) Formation of neutrophil extracellular traps under low oxygen level, *Front. Immunol.*, **7**, 518, doi: 10.3389/fimmu.2016.00518.
59. Nadesalingam, A., Chen, J. H. K., Farahvash, A., Khan, M. A. (2018) Hypertonic saline suppresses NADPH oxidase-dependent neutrophil extracellular trap formation and promotes apoptosis, *Front. Immunol.*, **9**, 359, doi: 10.3389/fimmu.2018.00359.
60. Domingo-Gonzalez, R., Martínez-Colón, G. J., Smith, A. J., Smith, C. K., Ballinger, M. N., Xia, M., Murray, S., Kaplan, M. J., Yanik, G. A., and Moore, B. B. (2016) Inhibition of neutrophil extracellular trap formation after stem cell transplant by prostaglandin E2, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **193**, 186-197, doi: 10.1164/rccm.201501-0161OC.
61. Shishikura, K., Horiuchi, T., Sakata, N., Trinh, D. A., Shirakawa, R., Kimura, T., Asada, Y., and Horiuchi, H. (2016) Prostaglandin E2 inhibits neutrophil extracellular trap formation through production of cyclic AMP, *Br. J. Pharmacol.*, **173**, 319-331, doi: 10.1111/bph.13373.
62. Healy, L. D., Puy, C., Fernández, J. A., Mitrugno, A., Keshari, R. S., Taku, N. A., Chu, T. T., Xu, X., Gruber, A., Lupu, F., Griffin, J. H., and McCarty, O. J. T. (2017) Activated protein C inhibits neutrophil extracellular trap formation *in vitro* and activation *in vivo*, *J. Biol. Chem.*, **292**, 8616-8629, doi: 10.1074/jbc.M116.768309.
63. Saitoh, T., Komano, J., Saitoh, Y., Misawa, T., Takahama, M., Kozaki, T., Uehata, T., Iwasaki, H., Omori, H., Yamaoka, S., Yamamoto, N., and Akira, S. (2012) Neutrophil extracellular traps mediate a host defense response to human immunodeficiency virus-1, *Cell Host Microbe*, **12**, 109-116, doi: 10.1016/j.chom.2012.05.015.
64. Yost, C. C., Schwertz, H., Cody, M. J., Wallace, J. A., Campbell, R. A., et al. (2016) Neonatal NET-inhibitory factor and related peptides inhibit neutrophil extracellular trap formation, *J. Clin. Invest.*, **126**, 3783-3798, doi: 10.1172/JCI83873.
65. Hahn, S., Giaglis, S., Chowdhury, C. S., Hösli, I., and Hasler, P. (2013) Modulation of neutrophil NETosis: interplay between infectious agents and underlying host physiology, *Semin. Immunopathol.*, **35**, 439-453, doi: 10.1007/s00281-013-0380-x.
66. Hu, S., Liu, X., Gao, Y., Zhou, R., Wei, M., Dong, J., Yan, H., and Zhao, Y. (2019) Hepatitis B virus inhibits neutrophil extracellular trap release by modulating reactive oxygen species production and autophagy, *J. Immunol.*, **202**, 805-815, doi: 10.4049/jimmunol.1800871.
67. Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D., et al. (2018) Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on cell death 2018, *Cell. Death Differ.*, **25**, 486-541, doi: 10.1038/s41418-017-0012-4.
68. Clark, S. R., Ma, A. C., Tavener, S. A., McDonald, B., Goodarzi, Z., et al. (2007) Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood, *Nat. Med.*, **13**, 463-469, doi: 10.1038/nm1565.
69. Yipp, B. G., Petri, B., Salina, D., Jenne, C. N., Scott, B. N., et al. (2012) Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking *in vivo*, *Nat. Med.*, **18**, 1386-1393, doi: 10.1038/nm.2847.
70. Yousefi, S., Gold, J. A., Andina, N., Lee, J. J., Kelly, A. M., Kozlowski, E., Schmid, I., Straumann, A., Reichenbach, J., Gleich, G. J., and Simon, H. U. (2008) Catapult-like release of mitochondrial DNA by eosinophils contributes to antibacterial defense, *Nat. Med.*, **14**, 949-953, doi: 10.1038/nm.1855.
71. Yousefi, S., Mihalache, C., Kozlowski, E., Schmid, I., and Simon, H. U. (2009) Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps, *Cell Death Dis.*, **16**, 1438-1444, doi: 10.1038/cdd.2009.96.
72. Ingelsson, B., Söderberg, D., Strid, T., Söderberg, A., Bergh, A. C., Loitto, V., Lotfi, K., Segelmark, M., Spyrou, G., and Rosén, A. (2018) Lymphocytes eject interferogenic mitochondrial DNA webs in response to CpG and non-CpG oligodeoxynucleotides of class C, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **115**, E478-E487, doi: 10.1073/pnas.1711950115.
73. Jin, X., Zhao, Y., Zhang, F., Wan, T., Fan, F., Xie, X., and Lin, Z. (2016) Neutrophil extracellular traps involvement in corneal fungal infection, *Mol. Vis.*, **22**, 944-952.
74. Shan, Q., Dwyer, M., Rahman, S., and Gadjeva, M. (2014) Distinct susceptibilities of corneal *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates to neutrophil extracellular trap-mediated immunity, *Infect. Immun.*, **82**, 4135-4143, doi: 10.1128/IAI.02169-14.
75. Sonawane, S., Khanolkar, V., Namavari, A., Chaudhary, S., Gandhi, S., et al. (2012) Ocular surface extracellular DNA and nuclease activity imbalance: a new paradigm for inflammation in dry eye disease, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **53**, 8253-8263, doi: 10.1167/iovs.12-10430.
76. Tibrewal, S., Ivanir, Y., Sarkar, J., Nayeb-Hashemi, N., Bouchard, C. S., Kim, E., and Jain, S. (2014) Hyperosmolar stress induces neutrophil extracellular trap formation: implications for dry eye disease, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **55**, 7961-7969, doi: 10.1167/iovs.14-15332.
77. An, S., Raju, I., Surenkhuu, B., Kwon, J. E., Gulati, S., Karaman, M., Pradeep, A., Sinha, S., Mun, C., and Jain, S. (2019) Neutrophil extracellular traps (NETs) contribute to pathological changes of ocular graft-vs.-host disease (oGVHD) dry eye: Implications for novel biomarkers and therapeutic strategies, *Ocul. Surf.*, **17**, 589-614, doi: 10.1016/j.jtos.2019.03.010.
78. De Bont, C. M., Stokman, M. E. M., Faas, P., Thurlings, R. M., Boelens, W. C., Wright, H. L., and Pruijn, G. J. (2020) Autoantibodies to neutrophil extracellular traps represent a potential serological biomarker in rheumatoid arthritis, *J. Autoimmun.*, 102484, doi: 10.1016/j.jaut.2020.102484.
79. Brzheskiy, V. V., Efimova, E. L., Vorontsova, T. N., Alekseev, V. N., Gusarevich, O. G., et al. (2015) Results of a multicenter, randomized, double-masked, placebo-controlled clinical study of the efficacy and safety of visomitin eye drops in patients with dry eye syndrome, *Adv. Ther.*, **32**, 1263-1279, doi: 10.1007/s12325-015-0273-6.
80. Martinod, K., and Wagner, D. D. (2014) Thrombosis: tangled up in NETs, *Blood*, **123**, 2768-2776, doi: 10.1182/blood-2013-10-463646.
81. Moschonas, I. C., and Tselepis, A. D. (2019) The pathway of neutrophil extracellular traps towards atherosclerosis and thrombosis, *Atherosclerosis*, **288**, 9-16, doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2019.06.919.

82. Martinod, K., Demers, M., Fuchs, T. A., Wong, S. L., Brill, A., Gallant, M., Hu, J., Wang, Y., and Wagner, D. D. (2013) Neutrophil histone modification by peptidylarginine deiminase 4 is critical for deep vein thrombosis in mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 8674-8679, doi: 10.1073/pnas.1301059110.
83. Zucoloto, A. Z., and Jenne, C. N. (2019) Platelet-neutrophil interplay: insights into neutrophil extracellular trap (NET)-driven coagulation in infection, *Front. Cardiovasc. Med.*, **6**, 85, doi: 10.3389/fcvm.2019.00085.
84. Novotny, J., Oberdieck, P., Titova, A., Pelisek, J., Chandraratne, S., et al. (2020) Thrombus NET content is associated with clinical outcome in stroke and myocardial infarction, *Neurology*, **94**, e2346-e2360, doi: 10.1212/WNL.0000000000009532.
85. Warnatsch, A., Ioannou, M., Wang, Q., and Papayannopoulos, V. (2015) Inflammation. Neutrophil extracellular traps license macrophages for cytokine production in atherosclerosis, *Science*, **349**, 316-320, doi: 10.1126/science.aaa8064.
86. Tsourouktsoglou, T. D., Warnatsch, A., Ioannou, M., Hoving, D., Wang, Q., and Papayannopoulos, V. (2020) Histones, DNA, and citrullination promote neutrophil extracellular trap inflammation by regulating the localization and activation of TLR4, *Cell Rep.*, **31**, 107602, doi: 10.1016/j.celrep.2020.107602.
87. Snoderly, H. T., Boone, B. A., and Bennewitz, M. F. (2019) Neutrophil extracellular traps in breast cancer and beyond: current perspectives on NET stimuli, thrombosis and metastasis, and clinical utility for diagnosis and treatment, *Breast Cancer Res.*, **21**, 145, doi: 10.1186/s13058-019-1237-6.
88. Breitbart, C. J., De Silva, N. S., Falls, T. J., Aladl, U., Evgin, L., et al. (2011) Targeting tumor vasculature with an oncolytic virus, *Mol. Ther.*, **19**, 886-894, doi: 10.1038/mt.2011.26.
89. Leppkes, M., Maueroeder, C., Hirth, S., Nowecki, S., Gunther, C., et al. (2016) Externalized decondensed neutrophil chromatin occludes pancreatic ducts and drives pancreatitis, *Nat. Commun.*, **7**, 10973, doi: 10.1038/ncomms10973.
90. Muñoz, L. E., Boeltz, S., Bilyy, R., Schauer, C., Mahajan, A., et al. (2019) Neutrophil extracellular traps initiate gallstone formation, *Immunity*, **51**, 443-450.e4, doi: 10.1016/j.immuni.2019.07.002.
91. Twaddell, S. H., Baines, K. J., Grainge, C., and Gibson, P. G. (2019) The emerging role of neutrophil extracellular traps in respiratory disease, *Chest*, **156**, 774-782, doi: 10.1016/j.chest.2019.06.012.
92. Ebrahimi, F., Giaglis, S., Hahn, S., Blum, C. A., Baumgartner, C., Kutz, A., van Breda, S. V., Mueller, B., Schuetz, P., Christ-Crain, M., and Hasler, P. (2018) Markers of neutrophil extracellular traps predict adverse outcome in community-acquired pneumonia: secondary analysis of a randomised controlled trial, *Eur. Respir. J.*, **51**, 1701389, doi: 10.1183/13993003.01389-2017.
93. Vassallo, A., Wood, A. J., Subburayalu, J., Summers, C., and Chilvers, E. R. (2019) The counter-intuitive role of the neutrophil in the acute respiratory distress syndrome, *Br. Med. Bull.*, **131**, 43-55, doi: 10.1093/bmb/ldz024.
94. Uddin, M., Watz, H., Malmgren, A., and Pedersen, F. (2019) NETopathic inflammation in chronic obstructive pulmonary disease and severe asthma, *Front. Immunol.*, **10**, 47, doi: 10.3389/fimmu.2019.00047.
95. Toussaint, M., Jackson, D. J., Swieboda, D., Guedan, A., Tsourouktsoglou, T. D., et al. (2017). Host DNA released by NETosis promotes rhinovirus-induced type-2 allergic asthma exacerbation, *Nat. Med.*, **23**, 681-691, doi: 10.1038/nm.4332.
96. Choi, Y., Pham, D., Lee, D.-H., Lee, S.-H., Kim, S.-H., and Park, H.-S. (2018) Biological function of eosinophil extracellular traps in patients with severe eosinophilic asthma, *Exp. Mol. Med.*, **50**, 104, doi: 10.1038/s12276-018-0136-8.
97. Mehta, P., McAuley, D. F., Brown, M., Sanchez, E., Tattersall, R. S., and Manson, J. J., HLH Across Speciality Collaboration, UK (2020) COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression, *Lancet*, **395**, 1033-1034, doi: 10.1016/S0140-6736(20)30628-0.
98. Zuo, Y., Yalavarthi, S., Shi, H., Gockman, K., Zuo, M., Madison, J. A., Blair, C. N., Weber, A., Barnes, B. J., Egeblad, M., Woods, R. J., Kanthi, Y., and Knight, J. S. (2020) Neutrophil extracellular traps in COVID-19, *JCI insight*, 138999. Advance online publication, doi: 10.1172/jci.insight.138999.
99. Yoshida, Y., Takeshita, S., Kawamura, Y., Kanai, T., Tsujita, Y., and Nonoyama, S. (2020) Enhanced formation of neutrophil extracellular traps in Kawasaki disease, *Pediatr. Res.*, **87**, 998-1004, doi: 10.1038/s41390-019-0710-3.
100. Barnes, B. J., Adrover, J. M., Baxter-Stoltzfus, A., Borczuk, A., Cools-Lartigue, J., et al. (2020) Targeting potential drivers of COVID-19: neutrophil extracellular traps, *J. Exp. Med.*, **217**, e20200652, doi: 10.1084/jem.20200652.
101. Gupta, S., and Kaplan, M. J. (2016) The role of neutrophils and NETosis in autoimmune and renal diseases, *Nat. Rev. Nephrol.*, **12**, 402-413, doi: 10.1038/nrneph.2016.71.
102. Fortner, K. A., Blanco, L. P., Buskiewicz, I., Huang, N., Gibson, P. C., et al. (2020) Targeting mitochondrial oxidative stress with MitoQ reduces NET formation and kidney disease in lupus-prone MRL-lpr mice, *Lupus Sci. Med.*, **7**, e000387, doi: 10.1136/lupus-2020-000387.
103. Khandpur, R., Carmona-Rivera, C., Vivekanandan-Giri, A., Gizinski, A., Yalavarthi, S., et al. (2013) NETs are a source of citrullinated autoantigens and stimulate inflammatory responses in rheumatoid arthritis, *Sci. Transl. Med.*, **5**, 178ra40, doi: 10.1126/scitranslmed.3005580.
104. Wang, W., Peng, W., and Ning, X. (2018) Increased levels of neutrophil extracellular trap remnants in the serum of patients with rheumatoid arthritis, *Int. J. Rheum. Dis.*, **21**, 415-421, doi: 10.1111/1756-185X.13226.
105. Carmona-Rivera, C., Carlucci, P. M., Moore, E., Lingampalli, N., Uchtenhagen, H., et al. (2017) Synovial fibroblast-neutrophil interactions promote pathogenic adaptive immunity in rheumatoid arthritis, *Sci. Immunol.*, **2**, eaag3358, doi: 10.1126/sciimmunol.aag3358.
106. Fousert, E., Toes, R., and Desai, J. (2020) Neutrophil extracellular traps (NETs) take the central stage in driving autoimmune responses, *Cells*, **9**, 915, doi: 10.3390/cells9040915.
107. Schauer, C., Janko, C., Munoz, L. E., Zhao, Y., Kienhöfer, D., et al. (2014) Aggregated neutrophil extracellular traps limit inflammation by degrading cytokines and chemokines, *Nat. Med.*, **20**, 511-517, doi: 10.1038/nm.3547.
108. Tagami, T., Tosa, R., Omura, M., Fukushima, H., Kaneko, T., et al. (2014) Effect of a selective neutrophil elastase inhibitor on mortality and ventilator-free days in patients with increased extravascular lung water: a post hoc analysis of the PiCCO pulmonary edema study, *J. Intensive Care*, **2**, 67, doi: 10.1186/s40560-014-0067-y.
109. Hu, J. J., Liu, X., Xia, S., Zhang, Z., Zhang, Y., et al. (2020) FDA-approved disulfiram inhibits pyroptosis by blocking gasdermin D pore formation, *Nat. Immunol.*, **21**, 736-745, doi: 10.1038/s41590-020-0669-6.



110. Papayannopoulos, V., Staab, D., and Zychlinsky, A. (2011) Neutrophil elastase enhances sputum solubilization in cystic fibrosis patients receiving DNase therapy, *PLoS One*, **6**, e28526, doi: 10.1371/journal.pone.0028526.
111. Zakharova, V. V., Pletjushkina, O. Y., Galkin, I. I., Zinovkin, R. A., Chernyak, B. V., Krysko, D. V., Bachert, C., Krysko, O., Skulachev, V. P., and Popova, E. N. (2017) Low concentration of uncouplers of oxidative phosphorylation decreases the TNF-induced endothelial permeability and lethality in mice, *Biochim. Biophys. Acta. Mol. Basis Dis.*, **1863**, 968-977, doi: 10.1016/j.bbadis.2017.01.024.

## NETosis: MOLECULAR MECHANISMS, ROLE IN PHYSIOLOGY AND PATHOLOGY

### Review

N. V. Vorobjeva<sup>1\*</sup> and B. V. Chernyak<sup>2</sup>

<sup>1</sup> *Lomonosov Moscow State University, Biology Faculty, 119991 Moscow, Russia; E-mail: nvvorobjeva@mail.ru*

<sup>2</sup> *Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia*

Received June 20, 2020

Revised July 16, 2020

Accepted July 16, 2020

NETosis is a program for formation of neutrophil extracellular traps (NETs), which consist of modified chromatin decorated with bactericidal proteins from granules and cytoplasm. Various pathogens, antibodies and immune complexes, cytokines, microcrystals, and other physiological stimuli can cause NETosis. Induction of NETosis depends on reactive oxygen species (ROS), the main source of which is NADPH oxidase. Activation of NADPH oxidase depends on increase in the concentration of Ca<sup>2+</sup> in the cytoplasm and in some cases on the generation of ROS in mitochondria. NETosis includes release of the granule components into the cytosol, modification of histones leading to chromatin decondensation, destruction of the nuclear envelope, as well as formation of pores in the plasma membrane. In this review, basic mechanisms of NETosis, as well as its role in the pathogenesis of some diseases including COVID-19 are discussed.

**Keywords:** neutrophil, neutrophil extracellular traps, NETosis, NADPH oxidase, reactive oxygen species, mitochondrial pore, COVID-19