

**НЕЙТРОФИЛЬНЫЕ ЭКСТРАКЛЕТОЧНЫЕ ЛОВУШКИ КАК
МАРКЕРЫ ИНФЕКЦИОННОГО И АСЕПТИЧЕСОГО ВОСПАЛЕНИЯ**

Казимирский А. Н. ¹,

Салмаси Ж. М. ¹,

Порядин Г. В. ¹,

Панина М. И. ¹,

Ким А. Э. ¹,

Рогожина Л. С. ¹

¹ ФГАОУ ВО Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова Минздрава России, 117997, г. Москва, ул. Островитянова, д. 1, РФ.

**NEUTROPHIL EXTRACELLULAR TRAPS AS MARKERS OF
INFECTIOUS AND ASEPTIC INFLAMMATION**

Kazimirskii A. N. ^a,

Salmasi J. M. ^a,

Poryadin G. V. ^a,

Panina M. I. ^a,

Kim A. E. ^a,

Rogozhina L. S. ^a

^a Pirogov Russian National Research Medical University, Ostrovityanova St.1,
Moscow 117997, Russian Federation.

Резюме

Одной из важных проблем медицины является поиск новых достоверных и объективных маркеров воспаления, которые позволили бы определить природу флогогенного фактора и тип воспалительного процесса для выбора правильной тактики лечения, оценки эффективности противовоспалительной терапии, обоснования необходимости хирургического вмешательства, определения прогноза заболевания. Цель исследования - определение специфических маркеров инфекционного и асептического воспаления на основе анализа морфологических вариантов нейтрофильных экстраклеточных ловушек (НЭЛ). В исследование включены 26 больных с различными нозологическими формами воспалительного процесса в брюшной полости (12 - с острым аппендицитом, 8 - с острым холециститом, 6 - с диагнозом панкреатит/панкреонекроз) после хирургического вмешательства. В исследование включены также 20 больных с постковидом и группа из 10 волонтеров, без клинических проявлений заболевания, но при этом имевших контакты с заболевшими гриппом. Нейтрофилы выделяли, используя градиентное центрифугирование. Для подсчета НЭЛ использовали флюоресцентную микроскопию с красителем SYBR Green (Evrogen; Россия), специфично взаимодействующего с двухцепочечной ДНК. НЭЛ в морфологической форме нейтрофильных сетей обнаружены нами в крови у хирургических больных с диагнозом острый аппендицит, имеющих благоприятное течение послеоперационного периода. В группе волонтеров, контактных по гриппу, но без симптоматики инфекционного заболевания, нами также были обнаружены нейтрофильные сети. У всех больных с абдоминальным воспалением, осложненным абсцессом брюшной полости, помимо нейтрофильных сетей регистрировали аномальные формы НЭЛ, в частности, НЭЛ в форме одиночных нитей. В группе больных с постковидным синдромом, выбранной в настоящем исследовании как группа сравнения, выявлено абсолютное отсутствие нейтрофильных сетей. У всех больных с постковидом обнаруживаются НЭЛ только в форме одиночных

нитей. В экспериментах *in vitro* по клеточному культивированию нейтрофилов здоровых доноров с фибробластами мы обнаружили формирование НЭЛ в виде одиночных нитей, выходящих из ядра нейтрофилов. Результаты последующих экспериментов показали, что индукторами формирования НЭЛ в форме одиночных нитей являются пептиды коллагена. Заключение. Обнаружение в крови больных нейтрофильных сетей - признак инфекционного воспалительного процесса. НЭЛ в морфологической форме одиночных нитей являются маркерами асептического воспаления, а также признаком поражения эндотелия.

Ключевые слова: маркеры воспаления, инфекционное воспаление, асептическое воспаление, нейтрофильные экстраклеточные ловушки, НЭЛ, нейтрофильные сети, одиночные нити.

Abstract

One of the important problems of medicine is the search for new reliable markers of inflammation that would allow us to determine the type of inflammatory process. The aim of the study was to identify specific markers of infectious and aseptic inflammation based on the analysis of morphological variants of neutrophil extracellular traps (NETs). The study included 26 patients with various nosological forms of inflammation in the abdominal cavity (12 with acute appendicitis, 8 with acute cholecystitis, 6 with a diagnosis of pancreatitis/pancreonecrosis) after surgery. The study also included 20 patients with postcovid and a group of 10 volunteers no clinical manifestations of the disease, but at the same time had contacts with flu patients. Neutrophils were isolated using gradient centrifugation. Fluorescence microscopies with the dye SYBR Green (Evrogen, Russia) make use of for NETs visualization and counting. NETs in the morphological form of neutrophils web structure was found in the blood of surgical patients with acute appendicitis who had a favorable course of the postoperative period. In a group of volunteers who were exposed to influenza but did not have symptoms of an infectious disease, we also found neutrophils web structure. In all patients with abdominal inflammation complicated by abdominal abscess, in addition to neutrophil web structure, abnormal forms of NETs were recorded, in particular, NETs in the form of single filaments. In the postcovid patients an absolute absence of neutrophils web structure was revealed. In all postcovid patients, NETs are found only in the form of single filaments. The results of subsequent experiments showed that collagen peptides are inducers of the formation of NETs in the form of single filaments. Conclusion. The detection of neutrophils web structure is a sign of an infectious inflammatory process. NETs in the morphological form of single filaments are markers of aseptic inflammation, as well as a sign of endothelial damage.

Keywords: markers of inflammation, infectious inflammation, aseptic inflammation, neutrophil extracellular traps, NETs, neutrophil web-like structures, single filaments.

1 Введение

В настоящее время одной из важных проблем медицины является поиск новых объективных и достоверных, но при этом легко выявляемых, маркеров воспаления, которые бы позволили определить природу флогогенного фактора и тип воспалительного процесса для выбора правильной тактики лечения, оценки эффективности противовоспалительной терапии, обоснования необходимости хирургического вмешательства, определения прогноза заболевания.

Надежность обнаружения маркера воспаления может определяться его вовлеченностью в ключевые процессы запуска защитных реакций врожденного иммунитета. Таким наиболее ранним и принципиальным процессом является реакция нейтрофилов на поступающие в организм патогены или на повреждение собственных тканей.

Нейтрофилы формируют нейтрофильные экстраклеточные ловушки (НЭЛ, NETs) при поступлении в организм патогенов различной природы, в первую очередь инфекционных (бактерий, вирусов), а также в ответ на поврежденные структуры собственного организма.

Несмотря на большое количество исследований, посвященных НЭЛ, морфологические варианты этих внеклеточных структур нейтрофилов ещё не охарактеризованы. В наших исследованиях описаны несколько вариантов НЭЛ, которые могут быть связаны с типом воспалительного процесса.

Цель Определение специфических маркеров инфекционного и асептического воспаления на основе анализа морфологических вариантов нейтрофильных экстраклеточных ловушек.

2 Пациенты и методы

Пациенты. В исследование включены 26 больных, находящихся на лечении в 51 ГКБ г. Москвы с различными нозологическими формами воспалительного процесса в брюшной полости (12 больных с острым аппендицитом, 8 больных с острым холециститом, 6 больных с диагнозом панкреатит/панкреонекроз) после проведенного хирургического

31 вмешательства. В исследование были включены также 20 больных с пост
32 ковидом и группа из 10 волонтеров, считавших себя здоровыми, но при этом
33 имевших контакты с заболевшими гриппом.

34 **Методы. Определение содержания нейтрофильных**
35 **экстраклеточных ловушек**

36 *Получение клеточных фракций нейтрофилов*

37 Для взятия проб крови использовали вакутайнер с ЭДТА для
38 предотвращения свертывания. Выделение нейтрофилов из венозной крови,
39 обработанной ЭДТА, проводили традиционным методом с помощью
40 градиентного центрифугирования. Для этого кровь разводили в 4 раза натрий-
41 фосфатным буферным раствором 50 mM, pH 7,4, и наслаивали на двойной
42 градиент плотности фиколла-верографина. Плотность верхнего слоя
43 градиента составляет 1,077 г/см³, а нижнего - 1,190 г/см³. После
44 центрифугирования (1600 об./мин, 30 мин) на границе между градиентами
45 возникает скопление нейтрофилов с чистотой 98–100%. Нейтрофилы дважды
46 отмывали от примесей фиколла натрий-фосфатным буферным раствором (50
47 mM, pH 7,4). Осаждение клеток крови проводили при центрифугировании
48 (1200 об./мин, 15 мин). Выделенные нейтрофилы в среде RPMI-1640
49 использовали в экспериментах по кратковременному культивированию.
50 Жизнеспособность выделенных нейтрофилов составляла не менее 95% (тест с
51 0,1% раствором трипанового синего).

52 *Иммунофлуоресцентное определение нейтрофильных*
53 *экстраклеточных ловушек*

54 Для обнаружения и подсчета нейтрофильных экстраклеточных ловушек
55 использовали флюоресцентную микроскопию [2]. Выявление нейтрофильных
56 экстраклеточных ловушек осуществляли с использованием флюоресцентного
57 красителя SYBR Green (Evrogen; Россия), специфично взаимодействующего с
58 двухцепочечной ДНК. Микроскопирование, подсчет и фоторегистрацию
59 клеток и экстраклеточных структур проводили при увеличении ×1000.

Результаты выражали в процентах, в виде отношения количества экстраклеточных ловушек к общему числу клеток в поле зрения.

Статистическая обработка

Полученные результаты обрабатывали в программе *Statistica 12.0* (*StatSoft, Inc*). Данные представлены в виде среднего значения $(M) \pm$ стандартная ошибка среднего (m). Сравнение количественных признаков проводили по ранговому *U* критерию Манна-Уитни и данным дисперсионного анализа Крускала-Уоллиса. Различия считали статистически значимыми при значениях $p < 0,05$.

3 Результаты

1. Маркеры инфекционного воспаления

Качественный анализ НЭЛ у больных с воспалительными заболеваниями дает возможность выявить характерные морфологические признаки НЭЛ при воспалении инфекционного генеза.

В настоящее время морфологические формы нейтрофильных экстраклеточных ловушек и их функциональная активность при воспалительных заболеваниях практически не исследованы. В наших исследованиях мы определили 4 главные морфологические формы нейтрофильных ловушек - нейтрофильные сети, одиночные нити, волокна и вуали, из которых функционально активной, то есть способной захватывать и связывать патогены, обладает только одна экстраклеточная структура - сетевидная.

Нейтрофильные экстраклеточные ловушки в морфологической форме нейтрофильных сетей нами были обнаружены в крови у хирургических больных с диагнозом острый аппендицит, имеющих благоприятный характер течения заболевания и послеоперационного периода. При этом обследованные больные никаких других аномальных форм (нитей, волокон и вуалей) нейтрофильных экстраклеточных ловушек не имели.

В группе волонтеров, не имеющих никаких клинических проявлений заболевания гриппом, но находящихся в постоянном контакте с заболевшими,

нами также были обнаружены нейтрофильные сети при полном отсутствии аномальных форм НЭЛ. Найденные морфологические формы НЭЛ у больных из отделения абдоминальной хирургии и у не заболевших гриппом волонтеров суммированы в табл. 1.

Необходимо отметить, что нейтрофильные экстраклеточные ловушки в морфологической форме нейтрофильных сетей, найденные у этих двух групп обследованных хирургических больных и инфицированных волонтеров, обладали чрезвычайно высокой функциональной активностью нейтрофильных сетей.

Сопоставление этих результатов показывает, что нейтрофильные экстраклеточные ловушки в морфологической форме нейтрофильных сетей могут быть маркерами инфекционного воспаления.

Данные других исследователей подтверждают наши наблюдения о том, что нейтрофильные сети характерны для острого инфекционного процесса в организме [6,7].

2. Осложненные формы абдоминального воспаления - разнообразие морфологических типов НЭЛ.

Исследование нейтрофильных экстраклеточных ловушек у больных с различными нозологическими формами воспалительного процесса показывает, что помимо нейтрофильных сетей, у части хирургических больных обнаруживаются НЭЛ в морфологической форме одиночных нитей. Так, у всех больных с аппендицитом, осложненным абсцессом брюшной полости, помимо нейтрофильных сетей были найдены нейтрофильные экстраклеточные структуры в форме одиночных нитей. Такие нейтрофильные экстраклеточные структуры в форме одиночных нитей обнаруживались также и у части больных с холециститом и панкреатитом (табл. 2).

Необходимо отметить, что у всех больных с абдоминальным воспалением, осложненным абсцессом брюшной полости, помимо нейтрофильных сетей регистрировали также и аномальные формы НЭЛ, в частности НЭЛ в морфологической форме одиночных нитей.

Группа больных с постковидным синдромом, выбранная в пределах настоящего исследования как группа сравнения, демонстрирует абсолютное отсутствие нейтрофильных сетей. У всех исследованных больных с постковидом обнаруживаются НЭЛ только в форме одиночных нитей [3].

Патогенез постковида связан с вирус-индуцированным повреждением сосудистого эндотелия, приводящим к развитию воспалительного процесса [3,5,8]. Контактные взаимодействия нейтрофилов с фибробластами могут поддерживать процесс активации нейтрофильных лейкоцитов крови и индуцировать формирование НЭЛ в форме одиночных нитей.

3. Маркеры асептического воспаления

(Нитевидные нейтрофильные экстраклеточные ловушки - маркеры асептического воспаления)

В экспериментах по клеточному культивированию нейтрофилов здоровых доноров с фибробластами мы обнаружили формирование НЭЛ в виде одиночных нитей, выходящих из ядра нейтрофилов. Результаты последующих экспериментов показали, что индукторами формирования НЭЛ в морфологической форме одиночных нитей являются пептиды коллагена (рис. 1).

Таким образом, наше предположение о том, что коллаген, локализованный на поверхности фибробластов, может индуцировать формирование НЭЛ в виде одиночных нитей, нашло свое экспериментальное подтверждение. Физиологическое значение этого эффекта пока нуждается в четкой интерпретации, но перспективы практического его применения уже достаточно ясны. Данные литературы показывают, что НЭЛ могут быть вовлечены не только в начальные этапы воспаления, но и в последующий фиброз [9]. У больных с опухолевыми заболеваниями было выявлено, что коллаген индуцирует формирование нейтрофильных экстраклеточных ловушек [10] и способствует инфильтрации активированных лимфоцитов в опухолевую ткань, однако морфологические формы НЭЛ при этом не были определены.

4 Заключение

Определение причины и вида воспаления имеет важное значение в медицине, так как этот принцип классификации необходим для постановки диагноза и определения тактики лечения.

Предложена система классификации видов воспаления, основанная на определении параметров адаптивного иммунитета. Эта классификация использует сочетания различных цитокинов [11]. Результаты проведенного нами исследования демонстрируют эффективность избранного подхода к поиску специфических маркеров воспаления. Обнаружение в крови больных нейтрофильных сетей - признак инфекционного воспалительного процесса. Этот вывод в некоторой степени подтверждается данными других исследований, в которых обнаружили подобные структуры (web-like structures) [4]. Вместе с тем, нейтрофильные сети формируются и под влиянием апоптозирующихся клеток, инфицированных вирусами или внутриклеточными микроорганизмами [1].

Нейтрофильные экстраклеточные ловушки в морфологической форме одиночных нитей, согласно результатам наших исследований, являются маркерами асептического воспаления, а также признаком поражения эндотелия.

ТАБЛИЦЫ

Таблица 1. Количество и морфологические формы нейтрофильных экстраклеточных ловушек (НЭЛ) у больных с острым аппендицитом с благоприятным течением и инфицированных вирусом гриппа волонтеров, но без клинической симптоматики.

Table 1. Morphological forms of neutrophil extracellular traps (NETs) in patients with acute appendicitis with a favorable course and infected with influenza virus volunteers, but without obvious symptoms.

Группы пациентов Groups of patients	Количество НЭЛ, % The number of NETs, %	Морфологические формы НЭЛ Morphological forms of NETs			
		Сети Web-like structures	Одиночные нити Single filaments	Волокна Fibers	Вуали Clouds
Острый аппендицит, неосложненный Acute appendicitis, uncomplicated (n=6)	10,19±0,73	++++	-	-	-
Инфицированные вирусом гриппа, но не заболевшие волонтеры Infected with the flu virus, but not sick volunteers (n=10)	8,58±0,51	++++	-	-	-

Примечание: +++++ - значительное количество нейтрофильных экстраклеточных структур;

+ - минимальное (менее 10% от общего количества) нейтрофильных
экстраклеточных структур.

Note: ++++ - a significant number of neutrophil extracellular structures; + -
minimum (less than 10% of the total) neutrophil extracellular structures.

Таблица 2. Количество и морфологические формы НЭЛ у больных с различными нозологическими формами воспалительного процесса в брюшной полости и у больных с постковидным синдромом.

Table 2. Morphological forms of NETs in patients with various nosological forms of the inflammatory process in the abdominal cavity and in patients with postcovid syndrome.

Группы больных Groups of patients	Количество НЭЛ, % The number of NETs, %	Морфологические формы НЭЛ Morphological forms of NETs			
		Сети Web-like structures	Одиночные нити Single filaments	Волокна Fibers	Буали Clouds
Острый аппендицит, осложненный абсцессом брюшной полости Acute appendicitis complicated by abdominal abscess (n=6)	13,26±0,95	+++	+	+	+
Острый холецистит Acute cholecystitis (n=8)	15,66±2,81	++	+	+	-
Острый панкреатит/панкреонекроз Acute pancreatitis/pancreonecrosis (n=6)	12,64±2,73	+	+	+	+
Постковид Post covid (n=20)	6,55±0,94	-	+	-	-

Примечание: ++++ - значительное количество нейтрофильных экстраклеточных структур;

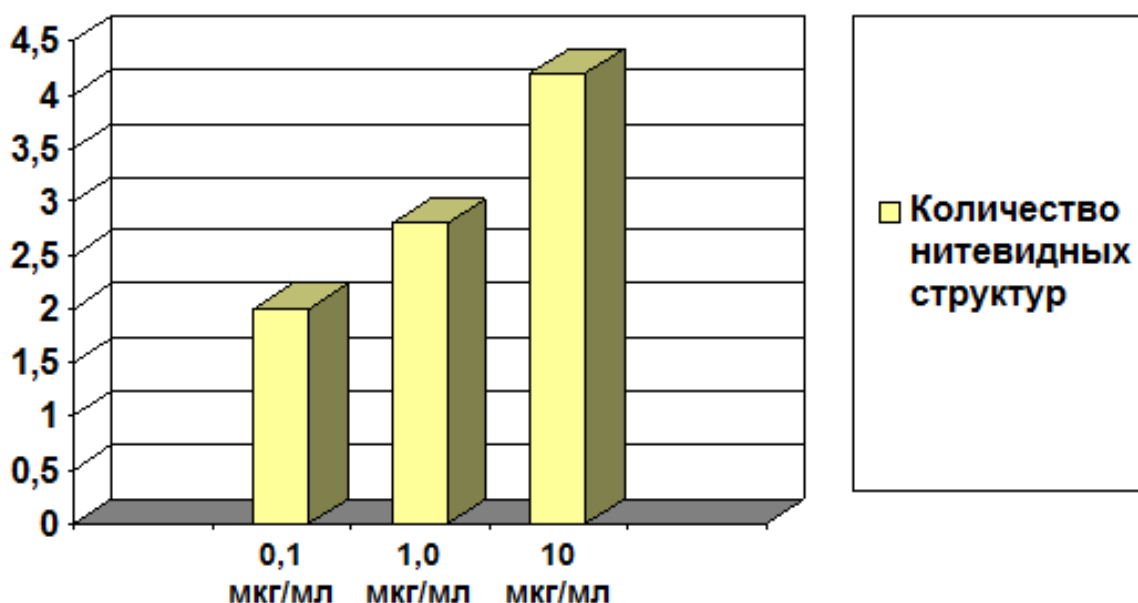
+ - минимальное (менее 10% от общего количества) нейтрофильных экстраклеточных структур.

Note: ++++ - a significant number of neutrophil extracellular structures; + - minimum (less than 10% of the total) neutrophil extracellular structures.

РИСУНКИ

Рисунок 1. Формирование нейтрофильных экстраклеточных ловушек в нитевидной форме нейтрофилами здоровых доноров под влиянием пептидов коллагена.

Figure 1. Neutrophil extracellular traps formation in filamentous form by neutrophils of healthy donors under collagen peptides influence.



По вертикальной оси - нейтрофильные экстраклеточные ловушки (в %)

По горизонтальной оси - концентрация пептидов коллагена (мкг/мл).

On the vertical axis - neutrophil extracellular traps (in %)

On the horizontal axis - the collagen peptides concentration (mcg/ml).

ТИТУЛЬНЫЙ ЛИСТ_МЕТАДААННЫЕ

Блок 1. Информация об авторе ответственном за переписку

Казимирский Александр Николаевич, д.б.н., доцент, ведущий научный сотрудник отдела молекулярных технологий, профессор кафедры патофизиологии и клинической патофизиологии Института биологии и патологии человека, Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова;
телефон: 8(916)459-4360;
e-mail: alnica10@mail.ru

Kazimirskii Alexander N., Dr. Sci. (Biol.), Leading Researcher, Department of Molecular Technologies, Professor Department of Pathophysiology and Clinical Pathophysiology Human Biology and Pathology Institute, Pirogov Russian National Research Medical University;
telephone: 8(916)459-4360;
e-mail: alnica10@mail.ru

Блок 2. Информация об авторах

Салмаси Жеан Мустафаевич, д.м.н., профессор, заведующий кафедрой патофизиологии и клинической патофизиологии Института биологии и патологии человека, Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова;

Salmasi Jean M., Dr. Sci. (Med.), Professor, Head of the Department of Pathophysiology and Clinical Pathophysiology Human Biology and Pathology Institute, Pirogov Russian National Research Medical University.

Порядин Геннадий Васильевич, член-корр. РАН, д.м.н., профессор, кафедра патофизиологии и клинической патофизиологии Института биологии и патологии человека, Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова;

Poryadin Gennady V., Corresponding Member of RAS, Dr. Sci. (Med.), Professor, Department of Pathophysiology and Clinical Pathophysiology Human Biology and Pathology Institute, Pirogov Russian National Research Medical University.

Панина Марина Ивановна, д.м.н., профессор, кафедра патофизиологии и клинической патофизиологии Института биологии и патологии человека, Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова;

Panina Marina I., Dr. Sci. (Med.), Professor, Department of Pathophysiology and Clinical Pathophysiology Human Biology and Pathology Institute, Pirogov Russian National Research Medical University.

Ким Анна Эрнестовна, ассистент кафедры патофизиологии и клинической патофизиологии Института биологии и патологии человека, Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова;

Kim Anna E., Assistant, Department of Pathophysiology and Clinical Pathophysiology Human Biology and Pathology Institute, Pirogov Russian National Research Medical University.

Рогожина Людмила Сергеевна, ассистент кафедры госпитальной хирургии №1, Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова;

Rogozhina Lyudmila S., Assistant, Department of Hospital Surgery No. 1, Pirogov Russian National Research Medical University.

Блок 3. Метаданные статьи

НЕЙТРОФИЛЬНЫЕ ЭКСТРАКЛЕТОЧНЫЕ ЛОВУШКИ КАК МАРКЕРЫ
ИНФЕКЦИОННОГО И АСЕПТИЧЕСОГО ВОСПАЛЕНИЯ

NEUTROPHIL EXTRACELLULAR TRAPS AS MARKERS OF INFECTIOUS
AND ASEPTIC INFLAMMATION

Сокращенное название статьи для верхнего колонтитула:

СПЕЦИФИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ВОСПАЛЕНИЯ
SPECIFIC MARKERS OF INFLAMMATION

Ключевые слова: маркеры воспаления, инфекционное воспаление, асептическое воспаление, нейтрофильные экстраклеточные ловушки, НЭЛ, нейтрофильные сети, одиночные нити.

Keywords: markers of inflammation, infectious inflammation, aseptic inflammation, neutrophil extracellular traps, NETs, neutrophil web-like structures, single filaments.

Раздел Оригинальные статьи.

Количество страниц текста – 7,

Количество таблиц – 2,

Количество рисунков – 1.

18.03.2023

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Порядковый номер ссылки	Авторы, название публикации и источника, где она опубликована, выходные данные	ФИО, название публикации и источника на английском	Полный интернет-адрес (URL) цитируемой статьи или ее doi.
1	Казимирский А.Н., Салмаси Ж.М., Порядин Г.В. Антивирусная система врожденного иммунитета: патогенез и лечение COVID-19. Вестник РГМУ. 2020; (5): 5–13.	Kazimirskii AN, Salmasi JM, Poryadin GV. Antiviral system of innate immunity: COVID-19 pathogenesis and treatment. Bulletin of RSMU. 2020; (5): 5–13.	DOI: 10.24075/brsmu.2020.054
2	Казимирский А.Н., Салмаси Ж.М., Порядин Г.В., Панина М.И. Новые возможности диагностики и исследования патогенеза различных видов воспаления. <i>Патологическая физиология и экспериментальная терапия</i> . 2022;66(2): 34–42.	Kazimirskii A.N., Salmasi J.M., Poryadin G.V., Panina M.I. New opportunities for diagnosis and investigation of the pathogenesis of various types of inflammation. <i>Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental`naya terapiya</i> . (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal). 2022; 66(2): 34-42	https://doi.org/10.25557/0031-2991.2022.02.34-42 .
3	Салмаси Ж.М., Порядин Г.В., Панина М.И., Ларина В.Н., Рыжих А.А.,	Salmasi JM, Poryadin GV, Panina MI, Larina VN,	DOI: 10.24075/vrgmu.2022.057

	Стоделова Е.А., Казимирский А.Н. Нейтрофильные и моноцитарные экстраклеточные ловушки в диагностике постковидного синдрома. Вестник РГМУ. 2022; (6): 84–88.	Ryzhikh AA, Stodelova EA, Kazimirskii AN. Neutrophil and monocyte extracellular traps in the diagnosis of post-COVID syndrome. Bulletin of RSMU. 2022; (6): 84–88	
4	Pieterse E, Rother N, Yanginlar C, Hilbrands LB, van der Vlag J. Neutrophils Discriminate between Lipopolysaccharides of Different Bacterial Sources and Selectively Release Neutrophil Extracellular Traps. <i>Front Immunol.</i> 2016; 7: 484.	Pieterse E, Rother N, Yanginlar C, Hilbrands LB, van der Vlag J. Neutrophils Discriminate between Lipopolysaccharides of Different Bacterial Sources and Selectively Release Neutrophil Extracellular Traps. <i>Front Immunol.</i> 2016; 7: 484.	DOI:10.3389/fimmu.2016.00484
5	Poli V, Zanoni I. Neutrophil intrinsic and extrinsic regulation of NETosis in health and disease. <i>Trends Microbiol.</i> 2023;31(3):280-293.	Poli V, Zanoni I. Neutrophil intrinsic and extrinsic regulation of NETosis in health and disease. <i>Trends Microbiol.</i> 2023;31(3):280-293.	DOI:10.1016/j.tim.2022.10.002
6	Huang J, Hong W, Wan M, Zheng L. Molecular mechanisms and therapeutic	Huang J, Hong W, Wan M, Zheng L. Molecular	DOI:10.1002/mco2.162

	target of NETosis in diseases. <i>MedComm</i> (2020). 2022;3(3):e162.	mechanisms and therapeutic target of NETosis in diseases. <i>MedComm</i> (2020). 2022;3(3):e162.	
7	Hidalgo A, Libby P, Soehnlein O, Aramburu IV, Papayannopoulos V, Silvestre-Roig C. Neutrophil extracellular traps: from physiology to pathology. <i>Cardiovasc Res</i> . 2022;118(13):2737-2753.	Hidalgo A, Libby P, Soehnlein O, Aramburu IV, Papayannopoulos V, Silvestre-Roig C. Neutrophil extracellular traps: from physiology to pathology. <i>Cardiovasc Res</i> . 2022;118(13):2737-2753.	DOI:10.1093/cvr/cvab329
8	Martins-Gonçalves R., Hottz E.D., Bozza P.T. Acute to post-acute COVID-19 thromboinflammation persistence: Mechanisms and potential consequences. <i>Curr Res Immunol</i> . 2023;4:100058.	Martins-Gonçalves R., Hottz E.D., Bozza P.T. Acute to post-acute COVID-19 thromboinflammation persistence: Mechanisms and potential consequences. <i>Curr Res Immunol</i> . 2023;4:100058.	DOI: 10.1016/j.crimmu.2023.100058
9	Chrysanthopoulou A., Mitroulis I., Apostolidou E., Arelaki S., Mikroulis D., Konstantinidis T., Sivridis E., Koffa, M., Giatromanolaki, A., Boumpas, D. T., Ritis, K., Kambas, K. Neutrophil extracellular traps promote	Chrysanthopoulou A., Mitroulis I., Apostolidou E., Arelaki S., Mikroulis D., Konstantinidis T., Sivridis E., Koffa, M., Giatromanolaki, A., Boumpas, D. T., Ritis, K.,	https://doi.org/10.1002/path.4359

	differentiation and function of fibroblasts. <i>The Journal of pathology</i> , 2014;233(3): 294–307.	Kambas, K. Neutrophil extracellular traps promote differentiation and function of fibroblasts. <i>The Journal of pathology</i> , 2014;233(3): 294–307.	
10	Li H, Li J, Bai Z, Yan S, Li J. Collagen-induced DDR1 upregulates CXCL5 to promote neutrophil extracellular traps formation and Treg infiltration in breast cancer. <i>Int Immunopharmacol.</i> 2023;120:110235.	Li H, Li J, Bai Z, Yan S, Li J. Collagen-induced DDR1 upregulates CXCL5 to promote neutrophil extracellular traps formation and Treg infiltration in breast cancer. <i>Int Immunopharmacol.</i> 2023;120:110235.	DOI:10.1016/j.intimp.2023.110235
11	Roe K. An inflammation classification system using cytokine parameters. <i>Scand J Immunol.</i> 2021;93(2):e12970.	Roe K. An inflammation classification system using cytokine parameters. <i>Scand J Immunol.</i> 2021;93(2):e12970.	DOI:10.1111/sji.12970