

## Нейтрофильные внеклеточные ловушки — перспективный маркер неблагоприятного прогноза у оперированных пациентов с инфекционным эндокардитом

Котова Е. О.<sup>1,2</sup>, Моисеева А. Ю.<sup>1</sup>, Кобалава Ж. Д.<sup>1,2</sup>, Писарюк А. С.<sup>1,2</sup>, Кассина Д. В.<sup>3</sup>, Гурьев А. С.<sup>3</sup>, Гусарова Т. А.<sup>2</sup>

**Цель.** Определение прогностического значения формирования нейтрофильных внеклеточных ловушек (НВЛ) в мазках крови у оперированных пациентов с инфекционным эндокардитом (ИЭ).

**Материал и методы.** Проспективно включено 46 пациентов с достоверным диагнозом ИЭ и 50 пациентов с клапанными пороками сердца без ИЭ, госпитализированных в кардиохирургический стационар в 2021-2022гг (г. Москва), сопоставимых по полу и возрасту. Всем пациентам проводилось определение НВЛ при поступлении и в динамике через 7 дней после операции исследованием окрашенных мазков крови по типу мазков с помощью системы автоматической микроскопии МЕКОС-Ц2 (Россия). Включенные в исследование пациенты проспективно наблюдались в течение госпитального периода лечения (Me [IQR] 30,0 [21,0-41,0] дней) для регистрации первичной комбинированной конечной точки (госпитальная летальность от всех причин, эмболические, внутрисердечные, инфекционные осложнения) и отдельных ее компонентов.

**Результаты.** Пациенты с ИЭ были преимущественно представлены лицами мужского пола (n=37, 80,4%) с медианой возраста 55,5 [44,0-70,0] лет. Первичная комбинированная конечная точка была зарегистрирована у 76,1% (n=35) обследованных с ИЭ. Уровень НВЛ в динамике через 7 дней был значительно выше у пациентов с ИЭ, имевших события из первичной комбинированной конечной точки, чем в группе оперированных пациентов с пороками сердца без ИЭ (Me [IQR] 4,4 [0,6-26,6] vs 2,9 [1,1-4,3], соответственно, p<0,05). Пациенты с ИЭ, умершие в стационаре, отличались достоверно более высоким уровнем НВЛ по сравнению с выжившими пациентами с ИЭ и группой контроля как при поступлении (9,2 [1,8-18,9] vs 4,2 [0,3-28,5] и 3,4 [1,7-6,9], соответственно, p<0,05), так и в динамике (18,2 [5,2-26,6] vs 4,0 [1,0-26,6] и 2,9 [1,1-4,3], соответственно, p<0,001). Пороговое значение НВЛ в динамике  $\geq 11,2\%$  с высокой точностью прогнозировало летальный исход в стационаре (чувствительность 80,0%, специфичность 90,0%, положительная прогностическая ценность 66,7%, отрицательная прогностическая ценность 100,0%, площадь под кривой 0,915, p=0,003) и развитие послеоперационного сепсиса (чувствительность 75,0%, специфичность 88,0%, положительная прогностическая ценность 60,0%, отрицательная прогностическая ценность 100,0%, площадь под кривой 0,884, p=0,01). Полученные отрезные значения достоверно предсказывали вероятность летального исхода — отношение шансов (ОШ) 23,9 (95% доверительный интервал (ДИ): 1,7-344,8, p=0,02) и сепсиса — ОШ 22,0 (95% ДИ: 1,9-256,8, p=0,01) в стационаре у оперированных пациентов с ИЭ.

**Заключение.** Уровень нейтрофильных внеклеточных ловушек в мазках крови у оперированных пациентов с ИЭ является новым перспективным маркером прогнозирования осложненного течения заболевания. Значения НВЛ  $\geq 11,2\%$  у оперированных пациентов с ИЭ в 24 раза увеличивают вероятность госпитальной летальности и в 22 раза — развитие послеоперационного сепсиса.

**Ключевые слова:** нейтрофильные внеклеточные ловушки, инфекционный эндокардит, прогноз, нейтрофилы, нетоз, врожденный иммунитет, сепсис.

**Отношения и деятельность.** Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 22-75-10012) с использованием человеческого биоматериала, собранного и сохраняемого в рамках научной

программы. Оборудование для сбора, хранения и транспортировки биоматериала человека, оборудование для обследования пациентов приобретено за счет средств Программы стратегического академического лидерства РУДН, Приоритет 2030.

<sup>1</sup>ФГАОУ ВО Российский университет дружбы народов им. Патриса Лумумбы, Москва; <sup>2</sup>ГБУЗ Городская клиническая больница им. В. В. Виноградова Департамента здравоохранения г. Москвы, Москва; <sup>3</sup>ГБУЗ МО Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М. Ф. Владимирского, Москва, Россия.

Котова Е. О.\* — к.м.н., доцент кафедры внутренних болезней с курсом кардиологии и функциональной диагностики им. В. С. Моисеева, Медицинский институт, ORCID: 0000-0002-9643-5089, Моисеева А. Ю. — к.м.н., ассистент кафедры внутренних болезней с курсом кардиологии и функциональной диагностики им. В. С. Моисеева, Медицинский институт, ORCID: 0000-0003-0718-5258, Кобалава Ж. Д. — д.м.н., профессор, член-корр. РАН, зав. кафедрой внутренних болезней с курсом кардиологии и функциональной диагностики им. В. С. Моисеева, Медицинский институт, ORCID: 0000-0002-5873-1768, Писарюк А. С. — к.м.н., врач-кардиолог отделения реанимации и интенсивной терапии; доцент кафедры внутренних болезней с курсом кардиологии и функциональной диагностики им. В. С. Моисеева, Медицинский институт, ORCID: 0000-0003-4103-4322, Кассина Д. В. — н.с. лаборатории биомедицинских методов исследования, ORCID: 0000-0002-6759-9121, Гурьев А. С. — к.ф.-м.н., с.н.с. лаборатории биомедицинских методов исследования, ORCID: 0000-0001-8823-7819, Гусарова Т. А. — зав. патологоанатомическим отделением, ORCID: 0000-0003-1827-2197.

\*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author): [mauschen@inbox.ru](mailto:mauschen@inbox.ru)

ДИ — доверительный интервал, ИЭ — инфекционный эндокардит, НВЛ — нейтрофильные внеклеточные ловушки, ОПЦ — отрицательная прогностическая ценность, ОШ — отношение шансов, ППКТ — первичная комбинированная конечная точка, ППЦ — положительная прогностическая ценность, AUC — площадь под кривой.

Рукопись получена 20.09.2023

Рецензия получена 08.11.2023

Принята к публикации 20.12.2023



**Для цитирования:** Котова Е. О., Моисеева А. Ю., Кобалава Ж. Д., Писарюк А. С., Кассина Д. В., Гурьев А. С., Гусарова Т. А. Нейтрофильные внеклеточные ловушки — перспективный маркер неблагоприятного прогноза у оперированных пациентов с инфекционным эндокардитом. *Российский кардиологический журнал*. 2024;29(7):5624. doi: 10.15829/1560-4071-2024-5624. EDN PBXUQU

## Neutrophil extracellular traps as a promising marker of poor prognosis in operated patients with infective endocarditis

Kotova E. O.<sup>1,2</sup>, Moiseeva A. Yu.<sup>1</sup>, Kobalava Zh. D.<sup>1,2</sup>, Pisaryuk A. S.<sup>1,2</sup>, Kassina D. V.<sup>3</sup>, Guryev A. S.<sup>3</sup>, Gusarova T. A.<sup>2</sup>

**Aim.** To assess the prognostic value of the formation of neutrophil extracellular traps (NETs) in blood smears of operated patients with infective endocarditis (IE).

**Material and methods.** We prospectively included 46 patients with verified IE and 50 patients with valvular heart disease without IE, hospitalized in a cardiac surgery hospital in 2021-2022 (Moscow), comparable by sex and age. In all patients, NETs were determined upon admission and 7 days after surgery using the MECOS-Ts2 automated microscope (Russia). Patients included in the study were prospectively followed during the in-hospital period (ME [IQR] 30,0 [21,0-41,0] days) for the primary composite endpoint (in-hospital all-cause mortality, embolic, intracardiac, infectious complications) and its individual components.

**Results.** Patients with IE were predominantly male (n=37, 80,4%) with a median age of 55,5 [44,0-70,0] years. The primary combined endpoint was recorded in 76,1% (n=35) of those examined with IE. The NET level after 7 days was significantly higher in patients with IE who had primary combined endpoint events than in the group of operated patients with heart defects without IE (Me [IQR] 4,4 [0,6-26,6] vs 2,9 [1,1-4,3], respectively, p<0,05). Patients with IE who died in the hospital had a significantly higher NET level compared with surviving patients with IE and the control group as at admission (9,2 [1,8-18,9] vs 4,2 [0,3-28,5] and 3,4 [1,7-6,9], respectively, p<0,05), and in dynamics (18,2 [5,2-26,6] vs 4,0 [1,0-26,6] and 2,9 [1,1-4,3], respectively, p<0,001). The threshold value of dynamic NET  $\geq 11,2\%$  predicted in-hospital death with high accuracy (sensitivity 80,0%, specificity 90,0%, positive predictive value 66,7%, negative predictive value 100,0%, area under the curve 0,915, p=0,003) and the development of postoperative sepsis (sensitivity 75,0%, specificity 88,0%, positive predictive value 60,0%, negative predictive value 100,0%, area under the curve 0,884, p=0,01). The obtained cut-off values significantly predicted the death (OR 23,9 (95% CI 1,7-344,8, p=0,02)) and sepsis (OR 22,0 (95% CI 1,9-256,8, p=0,01)) in the hospital in operated patients with IE.

**Conclusion.** The NET level in blood smears of operated patients with IE is a new promising marker for predicting the disease complicated course. NETs  $\geq 11,2\%$  in operated patients with IE increase the probability of hospital mortality by 24 times and postoperative sepsis by 22 times.

**Keywords:** neutrophil extracellular traps, infective endocarditis, prognosis, neutrophils, NETosis, innate immunity, sepsis.

**Relationships and Activities.** The work was supported by a grant from the Russian Science Foundation (project № 22-75-10012) using human biomaterial collected and preserved as part of a scientific program. Equipment for collecting, storing and transporting human biomaterial, equipment for examining patients was purchased with funds from the Strategic Academic Leadership Program of the Peoples' Friendship University of Russia, Prioritet 2030.

<sup>1</sup>Peoples' Friendship University of Russia, Moscow; <sup>2</sup>Vinogradov City Clinical Hospital, Moscow; <sup>3</sup>Vladimirsky Moscow Regional Research Clinical Institute, Moscow, Russia.

Kotova E. O.\* ORCID: 0000-0002-9643-5089, Moiseeva A. Yu. ORCID: 0000-0003-0718-5258, Kobalava Zh. D. ORCID: 0000-0002-5873-1768, Pisaryuk A. S. ORCID: 0000-0003-4103-4322, Kassina D. V. ORCID: 0000-0002-6759-9121, Guryev A. S. ORCID: 0000-0001-8823-7819, Gusarova T. A. ORCID: 0000-0003-1827-2197.

\*Corresponding author:  
mauschen@inbox.ru

**Received:** 20.09.2023 **Revision Received:** 08.11.2023 **Accepted:** 20.12.2023

**For citation:** Kotova E. O., Moiseeva A. Yu., Kobalava Zh. D., Pisaryuk A. S., Kassina D. V., Guryev A. S., Gusarova T. A. Neutrophil extracellular traps as a promising marker of poor prognosis in operated patients with infective endocarditis. *Russian Journal of Cardiology*. 2024;29(7):5624. doi: 10.15829/1560-4071-2024-5624. EDN PBXUQU

### Ключевые моменты

- Нейтрофильные внеклеточные ловушки в мазках крови представляют новый прогностический маркер осложненного течения инфекционного эндокардита.
- Показано, что значения нейтрофильных внеклеточных ловушек в мазках крови пациентов с инфекционным эндокардитом выше 11,2% в 24 раза увеличивают вероятность госпитальной летальности и в 22 раза — развитие послеоперационного сепсиса.
- Представленные данные позволяют обсуждать значимый вклад нейтрофильных внеклеточных ловушек в патогенез инфекционного эндокардита и развитие осложнений.

Достигнутые успехи современных диагностических и лечебных подходов ведения пациентов с инфекционным эндокардитом (ИЭ) не приводят

### Key messages

- Neutrophil extracellular traps in blood smears represent a novel prognostic marker for complicated infective endocarditis.
- Level of neutrophil extracellular traps in blood smears of patients with infective endocarditis above 11,2% increase the probability of in-hospital mortality by 24 times and postoperative sepsis by 22 times.
- The presented data makes it possible to discuss the significant contribution of neutrophil extracellular traps to the pathogenesis of infective endocarditis and complications.

к достаточному снижению заболеваемости и летальности, наоборот, наблюдаются опасные тенденции к их росту, а прогноз болезни остается неблагоприятным. Остро необходимым представляется поиск ранних предикторов осложненного течения ИЭ на

любом этапе болезни, в т.ч. после хирургического лечения. Существующие маркеры оценки риска неблагоприятных событий при ИЭ применяются редко и не обладают оптимальной прогностической ценностью [1]. Основываясь на современной концепции патогенеза ИЭ — иммунотромбозе, обсуждается роль нейтрофильных внеклеточных ловушек (НВЛ) как возможного раннего и патогенетически обоснованного маркера прогрессирования инфекции, в особенности, эмболических событий и госпитальной летальности [2, 3]. Впервые нетоз как компонент врожденного иммунитета, отличный от фагоцитоза и дегрануляции, и основанный на формировании НВЛ в ответ на инфекцию, описал Brinkmann V, et al. в 2004г [3]. Стимуляция нейтрофилов патогенами и в большей степени медиаторами воспаления вызывает высвобождение из них хроматиновых волокон с антимикробными компонентами, такими как эластаза, катепсин G и миелопероксидаза с формированием НВЛ. Роль НВЛ заключается в захвате и уничтожении патогенных микроорганизмов [3]. Однако избыточная продукция НВЛ, по всей видимости, приводит к повреждению клеток, прогрессированию воспаления и тромбообразованию [4, 5]. В патогенезе ИЭ предполагается развитие неконтролируемого процесса нетоза. Однако роль НВЛ у пациентов с ИЭ не изучена, в частности, после кардиохирургических вмешательств. Таким образом, целью данного исследования являлось определение прогностической значимости формирования НВЛ у оперированных пациентов с ИЭ.

### Материал и методы

Проспективное когортное исследование выполнено у пациентов старше 18 лет, подписавших информированное согласие на сбор обезличенных медицинских данных. Включено 46 оперированных пациентов с достоверным диагнозом ИЭ по критериям Дюка 2015 [1, 6], госпитализированных в кардиохирургический стационар (г. Москва) в 2021-2022гг, и 50 пациентов, оперированных по поводу клапанных пороков сердца, исключая ИЭ, в качестве группы контроля. Не включали пациентов с неактивным ИЭ, небактериальным тромбоэндокардитом, активными онкологическими заболеваниями и получающих иммуносупрессивную терапию. Группы были сопоставимы по полу и возрасту. Исследование выполнено в соответствии со стандартами надлежащей клинической практики (Good Clinical Practice), принципами Хельсинкской декларации и одобрено локальным этическим комитетом Медицинского института Российского университета дружбы народов имени Патриса Лумумбы (протокол № 27 от 18.03.2021).

Всем пациентам выполняли традиционные лабораторно-инструментальные обследования, в т.ч.

оценку маркеров воспаления и эхокардиографическое исследование сердца. Исследование уровня НВЛ проводили в мазках крови от каждого пациента основной группы и группы контроля при поступлении и на 7 сут. после кардиохирургической операции. Временной интервал в 7 дней был выбран эмпирически, как усредненный показатель для оценки динамики лабораторных показателей на фоне проводимого лечения. Из пробирки с ЭДТА брали 2 мл крови для изготовления стерильных мазков на предметных стеклах по типу "монослой" с дальнейшей фиксацией в красителе-фиксаторе эозине метиленовом синем по Май-Грюнвальду ("ООО Минимед", Россия) (3,5 мин) и окраской в красителе Азур-Эозин по Романовскому-Гимзе ("ООО Минимед", Россия) (20-25 мин)<sup>1</sup>. Микроскопию окрашенных мазков проводили с помощью системы автоматической микроскопии МЕКОС-Ц2 (ООО "Медицинские компьютерные системы (МЕКОС)", Россия)<sup>1</sup>. Далее выполнялся подсчет количества нативных неразрушенных фагоцитов (нейтрофилов, эозинофилов, базофилов, моноцитов) и уровня НВЛ по формуле:  $\text{НВЛ, \%} = \frac{N_{\text{НВЛ}}}{(N_{\text{нативные нейтрофилы}} + N_{\text{эозинофилы}} + N_{\text{базофилы}})} \times 100\%$ .

Исходы исследовались за период лечения в кардиохирургическом стационаре. Оценивалась первичная комбинированная конечная точка (ПККТ) и отдельные ее компоненты: госпитальная летальность от всех причин, эмболические события, внутрисердечные (абсцесс, фистула/перфорация клапана, отрыв хорд, увеличение регургитации/вегетаций, дисфункция протеза) и инфекционные (сепсис) осложнения.

Статистический анализ проведен в программе IBM SPSS Statistics, Version 27. Количественные переменные описывали как медиана (Me) и интерквартильный размах (IQR). Качественные переменные описывали абсолютными (n) и относительными (%) значениями. Также оценивалась отрицательная (ОПЦ) и положительная прогностическая ценность (ППЦ). Пороговые значения для количественных предикторов устанавливались на основе ROC-анализа при оптимальном соотношении чувствительности и специфичности с определением площади под кривой (AUC). Связь между определенным исходом и фактором риска оценивали с помощью отношения шансов (ОШ) с определением 95% доверительного интервала (ДИ). Вероятность выживания оценивали методом построения кривых выживаемости Каплана-Мейера, сравнение производили с помощью логрангового критерия. Во всех видах анализа статистически значимым считалось значение  $p < 0,05$ .

<sup>1</sup> Волков А, Мосальская Д, Гурьев А, авторы; ООО "Медтехнопарк", патенто-обладатель. Способ определения относительного количества этотически трансформированных фагоцитов. Пат. 2712179 Рос. Федерация. Опубл. 24.01.2020.

Таблица 1

## Клинико-демографическая характеристика оперированных пациентов с ИЭ и пороками сердца без ИЭ

Параметр	Оперированные ИЭ+ (n=46)	Оперированные ИЭ- (n=50)
Мужчин, n (%)	37 (80,4)	40 (80,0)
Локализация поражений клапана/вегетаций:		
— Один клапан		
• Трикуспидальный клапан, n (%)	15 (32,6)*	1 (2,0)*
• Аортальный клапан, n (%)	11 (23,9)*	41 (82,0)*
• Митральный клапан, n (%)	9 (19,6)	4 (8,0)
— Два клапана		
• Аортальный и митральный клапан, n (%)	5 (10,9)	4 (8,0)
• Митральный и трикуспидальный клапан, n (%)	3 (6,5)	0 (0)
• Аортальный и трикуспидальный клапан, n (%)	2 (4,3)	0 (0)
— Три клапана		
• Аортальный, митральный и трикуспидальный клапан, n (%)	1 (2,2)	0 (0)
Сердечно-сосудистые заболевания, n (%)		
• Артериальная гипертензия, n (%)	25 (54,3)*	50 (100)*
• Сердечная недостаточность в анамнезе, n (%)	23 (50,0)	37 (74,0)
• Ишемическая болезнь сердца, n (%)	8 (17,4)*	50 (100)*
• Фибрилляция предсердий, n (%)	6 (13,0)	20 (40,0)
• Вирусный гепатит С, n (%)	4 (8,7)	9 (18,0)
Хроническая болезнь почек, n (%)	18 (39,1)*	2 (4,0)*
Сахарный диабет 2 типа, n (%)	7 (15,2)*	14 (28,0)*
Инсульт/транзиторная ишемическая атака в анамнезе, n (%)	7 (15,2)	7 (14,0)
Хроническая обструктивная болезнь легких/бронхиальная астма, n (%)	4 (8,7)	1 (2,0)
Хроническая обструктивная болезнь легких/бронхиальная астма, n (%)	4 (8,7)	8 (16,0)
Внутривенное употребление психоактивных препаратов, n (%)	17 (37,0)*	0 (0)*
Индекс Чарльсон, баллы, Ме [IQR]	4,0 [2,0-6,0]	4,0 [2,0-5,0]

Примечание: \* —  $p < 0,05$  — значимость различий между группами.

Сокращения: ИЭ — инфекционный эндокардит, Ме — медиана, IQR — интерквартильный размах.

## Результаты

Оперированные пациенты с ИЭ были преимущественно представлены лицами мужского пола среднего возраста с частым поражением трикуспидального и аортального клапанов (табл. 1). У половины пациентов имелись сердечно-сосудистые заболевания, часто встречался вирусный гепатит С, хроническая болезнь почек и сахарный диабет. Первичный ИЭ отмечался у 37,0% (n=17) пациентов. В структуре вторичного ИЭ преобладали дегенеративные пороки сердца, так же как и у оперированных пациентов с пороками сердца без ИЭ.

Внутрисердечные осложнения при поступлении имелись у 84,8% (n=39) пациентов с ИЭ, представленные отрывом хорд (23,9%, n=11), абсцессами клапанов (23,9%, n=11), перфорацией створок (21,7%, n=10), параклапанными фистулами (8,7%, n=6) и дисфункцией протеза (6,5%, n=3). Сочетанные повреждения клапанного аппарата имелись у 2 пациентов. Эмболические события до операции наблюдались у 23,9% (n=11) пациентов, после операции эмболических событий не было ни у одного наблюдавшегося.

Дооперационная антибактериальная терапия проводилась всем пациентам с ИЭ (медиана составила 27,5 [17,3-38,8] дней), из них в большинстве случа-

ев были назначены схемы, включающие гликопептиды в 82,6% (n=38) случаев, несколько реже — цефалоспорины 50,0% (n=23), аминогликозиды 28,3% (n=13) и карбапенемы 21,7% (n=10). После операции антибактериальная терапия продолжалась в среднем 2-6 нед.

Осложненное течение раннего послеоперационного периода имелось у 76,1% (n=35) пациентов с ИЭ, наиболее часто отмечалось острое повреждение почек у 54,3% (n=25) и постперикардиотомный синдром у 28,3% (n=13) пациентов. Госпитальная летальность среди оперированных пациентов с ИЭ составила 10,9% (n=5).

Этиологическая принадлежность ИЭ установлена у 84,9% пациентов, преимущественно представленная стафилококками (41,3%), с преобладанием *Staphylococcus aureus* (34,8%), энтерококками (10,9%) и стрептококками (10,9%). Сочетание возбудителей *Enterococcus faecalis* + *S. aureus* выявлено у 10,9% пациентов. Другие возбудители определены у 4,4% обследованных, представленные *Pseudomonas aeruginosa* (2,2%) и *Granulicatella adiacence* (2,2%). У 3 (6,5%) пациентов выявлен ИЭ, вызванный *Bartonella quintana*. Исследование уровня НВЛ в зависимости от этиопатогенетического агента не выявило значимых различий.

Таблица 2

**Динамика уровня НВЛ в группе оперированных пациентов с ИЭ и оперированных пациентов с пороками сердца без ИЭ**

Группа	НВЛ 0 дней, %, Ме [IQR]	НВЛ 7 дней, %, Ме [IQR]
Оперированные пациенты с ИЭ	4,2 [2,0-6,2]	4,3 [2,3-6,2]*
Оперированные с пороками сердца без ИЭ	3,4 [1,7-6,9]	2,9 [1,1-4,3]*

**Примечание:** \* —  $p < 0,05$  — значимость различий НВЛ в динамике через 7 дней после операции по сравнению с оперированными пациентами с пороками сердца без ИЭ.

**Сокращения:** ИЭ — инфекционный эндокардит, Ме — медиана, НВЛ — нейтрофильные внеклеточные ловушки, IQR — интерквартильный размах.

Таблица 3

**Уровень НВЛ в зависимости от наличия событий из ПККТ у оперированных пациентов с ИЭ по сравнению с группой контроля**

Показатель	ИЭ с событиями ПККТ	ИЭ без событий ПККТ	Оперированные с пороками сердца без ИЭ
НВЛ 0 дней, Ме [IQR], %	4,8 [0,4-28,5]	3,7 [1,5-5,5]	3,4 [1,7-6,9]
НВЛ 7 дней, Ме [IQR], %	4,4 [0,6-26,6]*	4,0 [2,4-4,9]	2,9 [1,1-4,3]*

**Примечание:** \* —  $p < 0,05$  — значимость различий между группой ИЭ с событиями ПККТ.

**Сокращения:** ИЭ — инфекционный эндокардит, Ме — медиана, НВЛ — нейтрофильные внеклеточные ловушки, ПККТ — первичная комбинированная конечная точка, IQR — интерквартильный размах.

Таблица 4

**Уровень НВЛ у оперированных пациентов в зависимости от госпитальной летальности по сравнению с группой контроля**

Показатель	ИЭ с госпитальной летальностью	ИЭ без госпитальной летальности	Оперированные с пороками сердца без ИЭ
НВЛ 0 дней, Ме [IQR], %	9,2 [1,8-18,9]*, †	4,2 [0,3-28,5]*	3,4 [1,7-6,9]†
НВЛ 7 дней, Ме [IQR], %	18,2 [5,2-26,6]§,	4,0 [1,0-26,6]§	2,9 [1,1-4,3]

**Примечание:** \* —  $p < 0,05$ , † —  $p < 0,05$ , § —  $p < 0,001$ , || —  $p < 0,001$  — значимость различий между группами.

**Сокращения:** ИЭ — инфекционный эндокардит, Ме — медиана, НВЛ — нейтрофильные внеклеточные ловушки, IQR — интерквартильный размах.

Внутригрупповых отличий по уровню НВЛ при поступлении и в динамике не было выявлено как в основной группе пациентов с ИЭ, так и в группе контроля (оперированные пациенты с пороками сердца без ИЭ). При этом уровни НВЛ при поступлении достоверно не отличались между пациентами с ИЭ и без ИЭ, что, вероятно, объясняется длительным дооперационным периодом антибактериальной терапии в основной группе, повлиявшей на активность воспаления (рис. 1, табл. 2). Однако обращала внимание достоверная разница между уровнем НВЛ на 7 день после операции в группе с ИЭ и группе контроля, что, вероятно, связано с наличием бактериального воспаления и одновременно свидетельствует об отсутствии вклада хирургического лечения в повышение НВЛ, сопровождающегося лишь асептическим воспалением.

События из ПККТ наблюдались у 76,1% ( $n=35$ ) оперированных пациентов с ИЭ и ассоциировались с повышением уровня НВЛ через 7 дней после операции, по сравнению с оперированными пациентами с пороками сердца без ИЭ (табл. 3). В группе контроля за период наблюдения события из ПККТ не было.

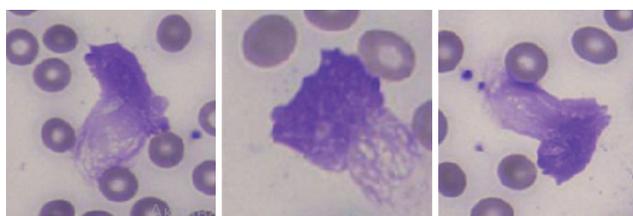


Рис. 1. НВЛ у пациентов с ИЭ (окраска по Романовскому-Гимзе ( $\times 500$ )).

При анализе отдельных компонентов ПККТ отмечались более высокие уровни НВЛ у пациентов с ИЭ в отношении госпитальной летальности как при поступлении, так и в динамике, по сравнению с выжившими пациентами с ИЭ и оперированными пациентами с пороками сердца без ИЭ (табл. 4).

Методом ROC-анализа вычислено пороговое значение НВЛ в динамике для прогнозирования госпитальной летальности, составившее 11,2%, характеризующееся чувствительностью 80,0%, специфичностью 90,0%, ППЦ 66,7%, ОПЦ 100,0%, AUC 0,915,  $p=0,003$  (рис. 2).

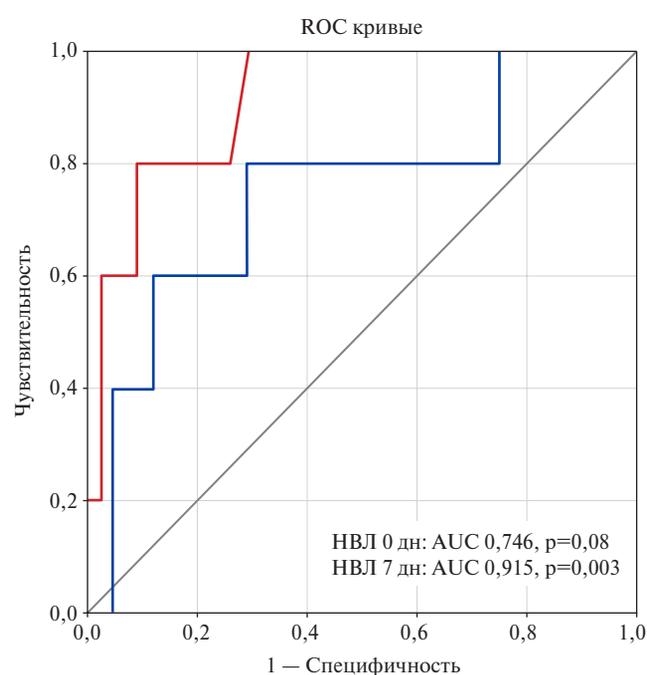
При проведении многофакторного регрессионного анализа выявлено, что уровень НВЛ выше найден-

Таблица 5

## Однофакторный и многофакторный анализ вероятности развития госпитальной летальности при ИЭ

Показатель	Однофакторный анализ			Многофакторный анализ		
	ОШ	95% ДИ	p	ОШ	95% ДИ	p
НВЛ 7 дней $\geq 11,2\%$	37,0	3,3-416,9	0,0001	23,9	1,7-344,8	0,02
Послеоперационный сепсис	44,0	4,8-401,6	0,0001	15,8	1,0-273,0	0,05
Возраст $\geq 60$ лет	1,4	0,2-8,8	0,71	—	—	—
Сердечно-сосудистые заболевания в анамнезе	1,5	0,3-9,3	0,64	—	—	—
Эмболические события	0,6	0,1-6,1	0,69	—	—	—
<i>Staphylococcus sp.</i>	0,4	0,1-2,5	0,33	—	—	—
Левосторонний ИЭ	2,9	0,3-27,2	0,32	—	—	—
Вегетации $\geq 13$ мм	0,1	0,1-1,1	0,09	—	—	—

**Сокращения:** ДИ — доверительный интервал, ИЭ — инфекционный эндокардит, НВЛ — нейтрофильные внеклеточные ловушки, ОШ — отношение шансов.

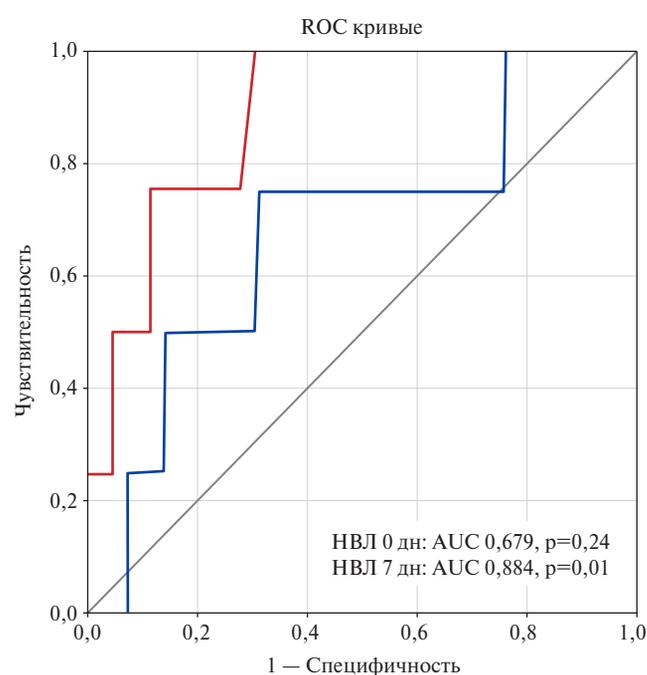


Источник кривой:

- НВЛ 0 дн
- НВЛ 7 дн
- Опорная линия

**Рис. 2.** Анализ ROC-кривой: связь значения НВЛ при поступлении и в динамике с госпитальной летальностью у оперированных пациентов с ИЭ.

**Сокращение:** НВЛ — нейтрофильные внеклеточные ловушки.



Источник кривой:

- НВЛ 0 дн
- НВЛ 7 дн
- Опорная линия

**Рис. 3.** Анализ ROC-кривой: связь значения НВЛ при поступлении и в динамике с развитием сепсиса у оперированных пациентов с ИЭ.

**Сокращение:** НВЛ — нейтрофильные внеклеточные ловушки.

ного отрезного значения повышал вероятность госпитальной летальности у оперированных пациентов с ИЭ (ОШ 23,9; 95% ДИ: 1,7-344,8, p=0,02) (табл. 5).

Наличие внутрисердечных осложнений при поступлении также ассоциировалось с достоверно более высокими исходными уровнями НВЛ по сравнению с пациентами без аналогичных изменений (табл. 6).

Сепсис в послеоперационном периоде у пациентов с ИЭ диагностирован у 8,7% (n=4) пациентов

и также ассоциировался с повышением уровня НВЛ в динамике (табл. 7).

Методом ROC-анализа вычислено пороговое значение НВЛ в динамике для прогнозирования послеоперационного сепсиса, также составившее 11,2%, характеризующееся чувствительностью 75,0%, специфичностью 88,0%, ППЦ 60,0%, ОПЦ 100,0%, AUC 0,884, p=0,01 (рис. 3). Найденное отрезное значение НВЛ в динамике в 22 раза увеличивало вероятность

Таблица 6

**Уровень НВЛ в зависимости от наличия внутрисердечных осложнений у оперированных пациентов с ИЭ по сравнению с оперированными пациентами с пороками сердца без ИЭ**

Показатель	ИЭ с внутрисердечными осложнениями	ИЭ без внутрисердечных осложнений	Оперированные с пороками сердца без ИЭ
НВЛ 0 дней, Ме [IQR], %	4,8 [0,4-28,5]*	1,3 [0,3-6,2]*	3,4 [1,7-6,9]
НВЛ 7 дней, Ме [IQR], %	4,3 [2,1-6,0]	4,0 [2,6-6,8]	2,9 [1,1-4,3]

Примечание: \* —  $p < 0,05$  — значимость различий между группами.

Сокращения: ИЭ — инфекционный эндокардит, Ме — медиана, НВЛ — нейтрофильные внеклеточные ловушки, IQR — интерквартильный размах.

Таблица 7

**Уровень НВЛ в зависимости от развития сепсиса у оперированных пациентов с ИЭ по сравнению с оперированными пациентами с пороками сердца без ИЭ**

Показатель	ИЭ с послеоперационным сепсисом	ИЭ без послеоперационного сепсиса	Оперированные с пороками сердца без ИЭ
НВЛ 0 дней, Ме [IQR], %	7,1 [2,6-15,9]	4,2 [1,9-6,2]	3,4 [1,7-6,9]
НВЛ 7 дней, Ме [IQR], %	15,4 [5,2-24,6]*,**	2,9 [0,8-22,3]*	2,9 [1,1-4,3]**

Примечание: \*, \*\* —  $p < 0,05$  — значимость различий между группами.

Сокращения: ИЭ — инфекционный эндокардит, Ме — медиана, НВЛ — нейтрофильные внеклеточные ловушки, IQR — интерквартильный размах.

Таблица 8

**Уровень НВЛ в зависимости от наличия эмболических событий у оперированных пациентов с ИЭ по сравнению с оперированными пациентами с пороками сердца без ИЭ**

Показатель	ИЭ с эмболическими событиями	ИЭ без эмболических событий	Оперированные с пороками сердца без ИЭ
НВЛ 0 дней, Ме [IQR], %	4,8 [1,3-6,2]	4,2 [2,4-8,5]	3,4 [1,7-6,9]
НВЛ 7 дней, Ме [IQR], %	2,6 [1,8-5,3]	4,9 [2,6-9,1]	2,9 [1,1-4,3]

Сокращения: ИЭ — инфекционный эндокардит, Ме — медиана, НВЛ — нейтрофильные внеклеточные ловушки, IQR — интерквартильный размах.

развития сепсиса у оперированных пациентов с ИЭ (ОШ 22,0 (95% ДИ: 1,9-256,8,  $p=0,01$ )).

Интерес представляет клиническое наблюдение пациентки с длительным анамнезом внутривенной наркомании и ИЭ трикуспидального клапана, вызванным *S. aureus*, у которой развился ранний протезный ИЭ, сопровождавшийся 19-кратным увеличением НВЛ в динамике (1,3%→24,6%).

Таким образом, исходно высокие уровни НВЛ могут свидетельствовать о тяжелом инфекционном поражении клапанного аппарата сердца, однако увеличение этого показателя в динамике также ассоциировано с развитием осложнений в послеоперационном периоде у пациентов с ИЭ (сепсис, ранний протезный ИЭ), что свидетельствует о важности определения уровня НВЛ в динамике.

Мы также проанализировали связь уровня НВЛ с развитием эмболических событий, однако в нашей когорте пациентов данной закономерности обнаружено не было, что, вероятно, было обусловлено давностью эмболических событий в предшествующие госпитализации и отсутствием их в послеоперационном периоде (табл. 8).

При многофакторном регрессионном анализе предикторами эмболических осложнений являлись традиционные показатели: правосторонний ИЭ (ОШ 34,09 (95% ДИ: 3,99-291,16),  $p < 0,0001$ ), внутривенная наркомания (ОШ 10,46 (95% ДИ: 2,50-43,81),  $p < 0,001$ ), вирусный гепатит С (ОШ 7,50 (95% ДИ: 2,00-28,05),  $p < 0,002$ ) и увеличение размера вегетаций (ОШ 3,89 (95% ДИ: 1,18-12,84),  $p < 0,02$ ).

При анализе выживаемости также отмечались худшие показатели у оперированных пациентов с ИЭ и НВЛ  $\geq 11,2\%$  в динамике через 7 дней после операции (рис. 4). Отметим, что расхождение кривых Каплана-Мейера отмечалось уже в раннем послеоперационном периоде.

Таким образом, повышение НВЛ в динамике  $\geq 11,2\%$  у оперированных пациентов с ИЭ ассоциировалось с осложненным течением раннего послеоперационного периода и худшей выживаемостью.

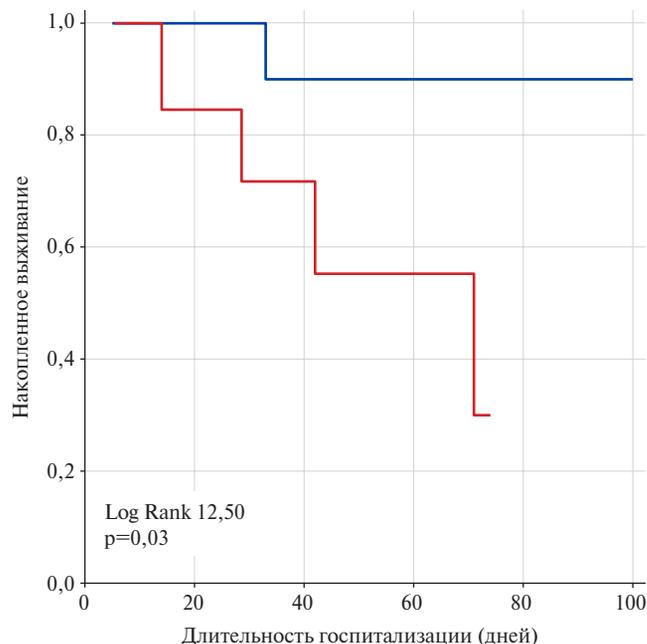
**Обсуждение**

Иммунотромбоз является новым патофизиологическим механизмом при инфекционных заболеваниях и представляет собой физиологический про-

цесс активации эндотелиального, тромбоцитарного и плазменного звеньев гемостаза, приводящий к высвобождению НВЛ, служащих для захвата и уничтожения бактерий, попавших в кровоток [2, 7]. В отечественной и зарубежной литературе имеются сведения о том, что образование НВЛ играет важную роль при разных аутоиммунных заболеваниях [8, 9], а также при бактериальных, вирусных, грибковых инфекциях, в т.ч. при сепсисе [4, 10, 11].

Изучение НВЛ при ИЭ ограничивается только экспериментальными исследованиями. Анализ литературы свидетельствует как о позитивном, так и о негативном влиянии формирования НВЛ на патофизиологические процессы, происходящие в тканях и органах. Jung CJ, et al. (2015) продемонстрировали амбивалентную роль НВЛ на крысиной модели ИЭ (n=9, НВЛ в вегетациях), вызванного *Streptococcus mutans*: с одной стороны, на ранних стадиях заболевания НВЛ обладали защитным механизмом, сдерживающим инфекцию, с другой стороны — на поздних стадиях болезни происходило развитие неконтролируемого нетоза, приводящего к усилению коагуляции, способствующему росту вегетации, прогрессированию воспаления, повреждению клапанов и подклапанных структур [10]. Схожие результаты получены Hsu CC, et al. (2019) также на крысиной модели ИЭ (НВЛ в вегетациях), вызванного *S. aureus*, подтвердившие существенную роль НВЛ в росте вегетаций [12]. В этом же исследовании было выявлено, что введение ДНКазы I значительно уменьшало размер вегетаций. Таким образом, можно предположить, что активность инфекционного процесса негативно влияет на образование НВЛ, определяя развитие неконтролируемого нетоза.

Исследования НВЛ на пациентах с ИЭ отсутствуют, однако имеются данные, полученные от пациентов с инфекциями кровотока. Так, Li RHL, et al. (2018) у пациентов с сепсисом продемонстрировали негативную роль НВЛ в прогнозировании госпитальной летальности, ассоциированной с развитием диссеминированного внутрисосудистого свертывания и полиорганной дисфункции [4]. В наше исследование были включены пациенты с осложненным ИЭ, потребовавшим кардиохирургического лечения. Среди обследованных с ИЭ мы наблюдали более высокий уровень НВЛ, особенно в динамике, отличающийся от показателей у оперированных пациентов с пороками сердца без ИЭ, что, вероятно, свидетельствует о развитии неконтролируемого нетоза при ИЭ, приведшем к деструктивным процессам в сердце. Также у оперированных пациентов с ИЭ нами выявлена связь высокого уровня НВЛ с неблагоприятным прогнозом (госпитальной летальностью и инфекционными осложнениями). Отдельно отметим, что повышение уровня НВЛ не имело связи с самим фактом хирургического вмешательства, т.к. мы не наблюдали



Источник кривой:

— НВЛ 7 дн < 11,2%

— НВЛ 7 дн > 11,2%

**Рис. 4.** Кривые выживаемости Каплана-Мейера у оперированных пациентов с ИЭ в госпитальном периоде в зависимости от уровня НВЛ через 7 дней после операции.

**Сокращение:** НВЛ — нейтрофильные внеклеточные ловушки.

прироста уровня НВЛ после кардиохирургических операций у пациентов группы контроля. Данный феномен позволяет предположить связь повышения НВЛ в группе пациентов с ИЭ именно в контексте наличия тяжелой бактериальной инфекции.

Исследования по определению пороговых уровней НВЛ для прогнозирования неблагоприятных событий единичны. В частности, у 73 пациентов с сепсисом различной этиологии было отмечено, что при уровне НВЛ  $\geq 23,0\%$  летальность наблюдалась в 100% случаев [13]. В другом исследовании, включившем 34 пациента с коронавирусной инфекцией, вызванной вирусом SARS-CoV-2, отмечено, что повышение НВЛ  $\geq 16\%$  служит критерием негативного прогноза заболевания и риска летального исхода [14]. В ходе нашего исследования определен отрезной уровень для прогнозирования госпитальной летальности у оперированных пациентов с ИЭ, составивший 11,2%, при котором вероятность смерти в стационаре увеличивалась в 24 раза. Более низкие пороговые уровни НВЛ, полученные нами, вероятно, объясняются особенностью изучаемой популяции — одновременное сочетание осложненного течения ИЭ с предшествующей длительной антибактериальной терапией (медиана дооперационного антибактериального лечения — 27,5 дней), уменьшающей актив-

ность воспаления, но не позволяющей добиться полного контроля над инфекцией.

Более того, нам удалось определить отрезной уровень для прогнозирования септических осложнений в послеоперационном периоде у пациентов с ИЭ, также составивший 11,2%, при котором в 22 раза увеличивалась вероятность развития сепсиса у оперированных пациентов. Аналогичных данных в научной литературе мы не нашли. Тем не менее наши результаты согласуются с ранее проведенными исследованиями у пациентов с сепсисом любой этиологии, свидетельствующими о высоком уровне НВЛ при инфекциях кровотока [4, 13].

Отсутствие ассоциаций этиологической принадлежности ИЭ и уровня циркулирующих НВЛ в крови в нашем исследовании могло быть связано с несколькими причинами. Во-первых, некоторые микроорганизмы, в частности, *S. aureus*, способны вырабатывать различные факторы вирулентности, препятствующие образованию или способствующие разрушению НВЛ, ограничивая их количество и защитную активность, реализуя механизмы ускользания бактерии от системы врожденного иммунитета для выживания в среде хозяина [7]. Во-вторых, вовлеченность большого количества НВЛ в состав вегетации могла нивелировать их уровень в циркулирующей крови. В-третьих, недостаточное количество пациентов с установленной этиологией ИЭ, а также трудности определения истинной этиологической принадлежности ИЭ могли внести вклад в получение неопределенных результатов. Для подтверждения этих гипотез необходимо проведение дальнейших исследований на большей популяции пациентов с ИЭ с определением уровня НВЛ в разных видах биологического материала (цельная кровь, ткани резецированных клапанов, вегетации).

Связь маркеров воспаления и НВЛ имеет разнонаправленные ассоциации. Так, Zhang F, et al. (2017) у 23 пациентов с сепсисом не получили корреляционных связей НВЛ с параметрами воспаления [15], в отличие от Zuo Y, et al. (2020), продемонстрировавших четкие взаимосвязи маркеров воспаления и НВЛ у 50 пациентов с COVID-19 [16]. В нашем исследовании не выявлено ассоциаций между лейкоцитами, скоростью оседания эритроцитов, С-реактивным белком и НВЛ, что может быть связано с низкой активностью воспаления на фоне предшествующей антибактериальной терапии.

В единичных экспериментальных исследованиях на крысиной модели ИЭ была выявлена связь НВЛ с увеличением размеров вегетаций и эмболическими событиями [10, 12]. Учитывая особенности патогенеза ИЭ, основанные на имунотромбозе, мы также предполагали наличие связи НВЛ с эмболиями. Однако в нашей когорте пациентов данная гипотеза не нашла подтверждения, что могло быть связано с некоторы-

ми ограничениями исследования. Так как уровень НВЛ динамичен, наиболее информативно его изучение в непосредственной близости от наблюдаемого события. Мы имели возможность исследовать уровень НВЛ при поступлении в стационар, когда эмболические события были отдаленно свершившимися, а в послеоперационном периоде мы не наблюдали ни одного события. Вышесказанное определяет необходимость проведения дальнейших исследований на широкой популяции пациентов с ИЭ.

Таким образом, НВЛ являются новыми перспективными маркерами оценки прогноза у пациентов с ИЭ, в т.ч. оперированных. Значения НВЛ  $\geq 11,2\%$  с высокой точностью предсказывают наступление летального исхода в стационаре и развитие послеоперационного сепсиса, а также неконтролируемое течение инфекционного процесса с развитием внутрисердечных и инфекционных осложнений. Для расширения прогностического потенциала НВЛ, в первую очередь направленного на своевременную оценку риска эмболических событий, актуально продолжение исследований на более крупных популяциях пациентов с ИЭ.

**Ограничения исследования.** ИЭ относится к непредсказуемым заболеваниям, что определяет необходимость постоянного поиска новых возможностей оценки прогноза и определения неблагоприятного течения заболевания. Исследуемая нами группа пациентов, госпитализированных в кардиохирургический стационар по причине невозможности контроля над течением ИЭ и имеющая длительный этап консервативного лечения, неизбежно имела ограничения для изучения, такие как низкая частота развития анализируемых событий из конечных точек и длительные временные промежутки между возникновением неблагоприятного события и взятием крови на исследование.

Также следует отметить отсутствие стандартизированной методики определения НВЛ [17, 18]. НВЛ могут быть идентифицированы как различными методами (гистохимические исследования с последующей световой микроскопией, проточная цитофлуориметрия, иммунофлуоресцентная микроскопия, различные другие виды микроскопии — конфокальная, сканирующая и трансмиссионная электронная, а также другие), так и в различных формах — от изучения компонентов НВЛ (внеклеточная ДНК, нейтрофильная эластаза 2, миелопероксидаза и катепсин G, гистоны H1, H2A, H2B, H3 и H4 и другие) до определения целых клеток. В зарубежных исследованиях преимущественно представлено изучение компонентов НВЛ без их количественной оценки. Мы применили простой в исполнении метод, разработанный в России, по изучению целно клеточного состава клеток крови с обнаружением НВЛ в мазках при автоматической микроскопии<sup>1</sup>, позволивший

нам провести количественный подсчет форменных элементов для выведения пороговых значений. Однако, безусловно, это несколько ограничило прямое сравнение полученных результатов с рядом ранее проведенных немногочисленных исследований.

### Заключение

НВЛ в крови у оперированных пациентов с ИЭ являются новыми перспективными маркерами прогнозирования осложненного течения заболевания. Значения НВЛ  $\geq 11,2\%$  у оперированных пациентов с ИЭ в 24 раза увеличивают вероятность госпиталь-

ной летальности и в 22 раза — развитие послеоперационного сепсиса.

**Отношения и деятельность.** Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 22-75-10012) с использованием человеческого биоматериала, собранного и сохраняемого в рамках научной программы. Оборудование для сбора, хранения и транспортировки биоматериала человека, оборудование для обследования пациентов приобретено за счет средств Программы стратегического академического лидерства РУДН, Приоритет 2030.

### Литература/References

- Demin A, Kobalava Z, Skopin I, et al. Infectious endocarditis and infection of intracardiac devices in adults. *Clinical guidelines 2021. Russian Journal of Cardiology*. 2022; 27(10):5233. (In Russ.) Демин А., Кобалава Ж., Скопин И. и др. Инфекционный эндокардит и инфекция внутрисердечных устройств. *Клинические рекомендации 2021. Российский кардиологический журнал*. 2022;27(10):5233. doi:10.15829/1560-4071-2022-5233.
- Pisaryuk A, Zamarashkina V, Safarova N, et al. Coagulation Disorders in Infective Endocarditis: Role of Pathogens, Biomarkers, Antithrombotic Therapy (Systematic Review). *Rational Pharmacotherapy in Cardiology*. 2022;18(3):320-31. (In Russ.) Писарюк А., Замарашкина В., Сафарова Н. и др. Роль нарушений в системе гемостаза при инфекционном эндокардите: связь с возбудителем, биомаркеры, место антиромботической терапии (систематический обзор). *Рациональная Фармакотерапия в Кардиологии*. 2022;18(3):320-31. doi:10.20996/1819-6446-2022-06-14.
- Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*. 2004;303(5663):1532-5. doi:10.1126/science.1092385.
- Li R, Tablin F. A Comparative Review of Neutrophil Extracellular Traps in Sepsis. *Front Vet Sci*. 2018;5:291. doi:10.3389/fvets.2018.00291.
- Papayannopoulos V. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. *Nat Rev Immunol*. 2018;18(2):134-47. doi:10.1038/nri.2017.105.
- Habib G, Lancellotti P, Antunes M, et al.; ESC Scientific Document Group. 2015 ESC Guidelines for the management of infective endocarditis: The Task Force for the Management of Infective Endocarditis of the European Society of Cardiology (ESC). Endorsed by: European Association of Cardio-Thoracic Surgery (EACTS), the European Association of Nuclear Medicine (EANM). *Eur Heart J*. 2015;36(44):3075-128. doi:10.1093/eurheartj/ehv319.
- Meyers S, Crescente M, Verhamme P, Martinod K. Staphylococcus aureus and Neutrophil Extracellular Traps: The Master Manipulator Meets Its Match in Immunothrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2022;42(3):261-76. doi:10.1161/ATVBAHA.121.316930.
- Khandpur R, Carmona-Rivera C, Vivekanandan-Giri A, et al. NETs are a source of citrullinated autoantigens and stimulate inflammatory responses in rheumatoid arthritis. *Sci Transl Med*. 2013;5(178):178ra40. doi:10.1126/scitranslmed.3005580.
- Schauer C, Janko C, Munoz L, et al. Aggregated neutrophil extracellular traps limit inflammation by degrading cytokines and chemokines. *Nat Med*. 2014;20(5):511-7. doi:10.1038/nm.3547.
- Jung C, Yeh C, Hsu R, et al. Endocarditis pathogen promotes vegetation formation by inducing intravascular neutrophil extracellular traps through activated platelets. *Circulation*. 2015;131(6):571-81. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.114.011432.
- Yipp B, Petri B, Salina D, et al. Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo. *Nat Med*. 2012;18(9):1386-93. doi:10.1038/nm.2847.
- Hsu C, Hsu R, Ohniwa R, et al. Neutrophil Extracellular Traps Enhance Staphylococcus Aureus Vegetation Formation through Interaction with Platelets in Infective Endocarditis. *Thromb Haemost*. 2019;119(5):786-96. doi:10.1055/s-0039-1678665.
- Gur'ev A, Mosalskaia D, Lopatin A, Volkov A. Prognostic value of cellular markers in sepsis: extracellular DNA traps and platelet count relation. Berlin, 32nd Annual Congress of the European Society of Intensive Care Medicine ESICM LIVES 2019. *Intensive Care Med Exp*. 2019;000809:237-8. doi:10.1186/S40635-019-0265-Y.
- Gur'ev A, Vasilenko I, Gur'ev A, et al. Neutrophil extracellular traps: diagnostic and prognostic value in COVID-19. *Almanac of Clinical Medicine*. 2020;48(S1):S43-50. (In Russ.) Кассина Д., Василенко И., Гурьев А. и др. Нейтрофильные внеклеточные ловушки: значение для диагностики и прогноза COVID-19. *Альманах клинической медицины*. 2020;48(S1):S43-50. doi:10.18786/2072-0505-2020-48-029.
- Zhang F, Zhang Z, Ma X. Plasma level of neutrophil extracellular traps in septic patients and its clinical significance: a prospective observational study. *Zhonghua Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue*. 2017;29(2):122-6. Chinese. doi:10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2017.02.006.
- Zuo Y, Yalavarthi S, Shi H, et al. Neutrophil extracellular traps in COVID-19. *JCI Insight*. 2020;5(11):e138999. doi:10.1172/jci.insight.138999.
- Masuda S, Nakazawa D, Shida H, et al. NETosis markers: Quest for specific, objective, and quantitative markers. *Clin Chim Acta*. 2016;459:89-93. doi:10.1016/j.cca.2016.05.029.
- Kasprzyska W, Homa-Mlak I, Mlak R, Małacka-Massalska T. Direct and indirect methods of evaluating the NETosis process. *J Pre Clin Clin Res*. 2019;13(1):50-6. doi:10.26444/jpcr/105563.