

DOI: 10.21055/0370-1069-2020-4-70-74

УДК 616.98:578.2

А.Л. Кравцов, А.Ю. Гончарова, С.А. Бугоркова, З.Л. Девдариани, В.А. Кожевников

ФОРМИРОВАНИЕ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ЛОВУШЕК ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ЧУМНОЙ ИНФЕКЦИИ У МЫШЕЙ, ИММУНИЗИРОВАННЫХ *YERSINIA PESTIS* EV НИИЭГ

ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация

Цель исследования – определить влияние *Yersinia pestis* EV НИИЭГ на процесс формирования нейтрофильных внеклеточных ловушек *in vivo* при моделировании чумной инфекции и оценить их вклад в противочумную защиту. **Материалы и методы.** В работе использовали мышей линии BALB/c, которых подкожно иммунизировали культурой вакцинного штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ. Заражали животных вирулентным штаммом *Y. pestis* 231 в дозе 20 LD₅₀ (10³ КОЕ). Для оценки вклада нейтрофильных внеклеточных ловушек (НВЛ) в антибактериальную защиту применяли экспериментальную модель, основанную на расщеплении НВЛ в брюшной полости мышей нуклеазой. Для подсчета числа НВЛ в перитонеальном экссудате (ПЭ) использовали люминесцентную микроскопию. Фагоцитарную активность клеток ПЭ определяли с помощью проточной цитометрии. Бактериологическим методом регистрировали бактерицидный эффект НВЛ. **Результаты и выводы.** У предварительно иммунизированных мышей процесс формирования НВЛ в ответ на повторное введение живых клеток чумного микроба был в 5 раз интенсивнее, чем у интактных животных и сопровождался существенным усилением киллинга клеток *Y. pestis* в ПЭ. Применение в эксперименте для расщепления образующихся в организме иммунизированных животных НВЛ микрококковой нуклеазы позволило получить доказательства участия НВЛ в обеспечении антиинфекционной защиты от чумной инфекции. Таким образом, установленный факт формирования НВЛ при заражении *Y. pestis* мышей, иммунизированных вакцинным штаммом *Y. pestis* EV НИИЭГ, и влияния этого процесса на эффективность защиты от чумы является основанием для дальнейшего уточнения иммунопатогенетической роли нейтрофильных гранулоцитов при чуме.

Ключевые слова: чумная инфекция, вакцинный штамм *Yersinia pestis* EV НИИЭГ, нейтрофильные внеклеточные ловушки, бактерицидность.

Корреспондирующий автор: Кравцов Александр Леонидович, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Для цитирования: Кравцов А.Л., Гончарова А.Ю., Бугоркова С.А., Девдариани З.Л., Кожевников В.А. Формирование нейтрофильных внеклеточных ловушек при моделировании чумной инфекции у мышей, иммунизированных *Yersinia pestis* EV НИИЭГ. Проблемы особо опасных инфекций. 2020; 4:70–74. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-4-70-74

Поступила 24.04.19. Принята к публ. 12.11.19.

A.L. Kravtsov, A.Yu. Goncharova, S.A. Bugorkova, Z.L. Devdariani, V.A. Kozhevnikov

Formation of Neutrophil Extracellular Traps when Modeling Plague Infection in Mice Immunized with *Yersinia pestis* EV NIEG

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation

Abstract. The purpose of the study was to determine the effect of *Yersinia pestis* EV NIEG on the process of neutrophil extracellular traps formation *in vivo* when modeling plague infection and assess their contribution to anti-plague protection. **Materials and methods.** BALB/c mice, which were immunized subcutaneously with the *Y. pestis* EV NIEG vaccine strain, were used in the study. Animals were infected with a virulent strain *Y. pestis* 231 at a dose of 20 LD₅₀ (10³ CFU). To evaluate the contribution of neutrophil extracellular traps (NETs) to antibacterial protection, an experimental model was used based on fermenting NETs in the abdominal cavity of mice with nuclease. To calculate the number of NETs in peritoneal exudate (PE) fluorescent microscopy was applied. Phagocytic activity of PE cells was determined by flow cytometry. Bactericidal effect of NETs was recorded using bacteriological method. **Results and discussion.** In pre-immunized mice, the process of NETs formation in response to the reintroduction of plague microbe living cells was 5 times more intense than in intact animals and was accompanied by a significant increase in the killing of *Y. pestis* cells in PE. The use of micrococcal nuclease in the experiment for fermentation of the NETs, produced in the body of immunized animals, provided evidence of NET participation in conferring anti-infective protection against plague infection. Thus, the established fact of the NET formation in case of *Y. pestis* infection of mice immunized with *Y. pestis* EV NIEG vaccine strain and the influence of this process on the effectiveness of protection against plague is the basis for further clarifying the immunopathogenetic role of neutrophil granulocytes in plague.

Key words: plague infection, vaccine strain *Yersinia pestis* EV NIEG, neutrophil extracellular traps, bactericidal activity.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Corresponding author: Alexander L. Kravtsov, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Citation: Kravtsov A.L., Goncharova A.Yu., Bugorkova S.A., Devdariani Z.L., Kozhevnikov V.A. Formation of Neutrophil Extracellular Traps when Modeling Plague Infection in Mice Immunized with *Yersinia pestis* EV NIEG. Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2020; 4:70–74. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2020-4-70-74

Received 24.04.19. Accepted 12.11.19.

Kravtsov A.L., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9016-6578>
Goncharova A.Yu., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9994-7936>

Bugorkova S.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7548-4845>
Kozhevnikov V.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7267-7027>

Проблема противоинфекционной защиты организма не теряет своей актуальности с момента открытия И.И. Мечниковым в 1883 г. явления фагоцитоза как основы клеточного иммунитета [1]. Нейтрофильные гранулоциты (НГ) в составе единой иммунофагоцитарной системы (моноцитарно-фагоцитарная система – МФС) организма играют решающую роль в иммунопатогенезе широкого спектра заболеваний [1, 2, 3]. НГ располагают целым арсеналом антимикробных стратегий, направленных на обезвреживание бактерий не только посредством фагоцитоза и экзоцитоза (дегрануляции нейтрофилов), но и за счет формирования нейтрофильных внеклеточных ловушек (НВЛ) [2, 4, 5]. Современные представления о НГ как уникальной мультифункциональной популяции клеток, способствующей полноценной реализации иммунного ответа [2], обуславливают интерес к детализации представлений об иммунопатогенетической роли этих клеток при чуме.

Формирование НВЛ – недавно открытый высокоэффективный противомикробный механизм НГ, в основе которого лежит способность активированных клеток секретировать во внеклеточное пространство ядерный хроматин, декорированный лейкоцитарными протеазами и бактерицидными катионными белками цитоплазматических гранул – «выброс» экстрацеллюлярных ДНК-сетей для связывания и киллинга патогенных микроорганизмов [2, 4, 6]. Этот альтернативный фагоцитозу феномен внеклеточной бактерицидности НГ реализуется при инфекциях, отличающихся генерализацией и незавершенностью фагоцитоза их возбудителей. Например, при псевдотуберкулезе, когда частичное или полное предвратительное обезвреживание клеток *Yersinia pseudotuberculosis* микробоцидными компонентами НГ стимулирует поглотительную и переваривающую функцию макрофагов [1]. При чуме альтернативный фагоцитозу механизм киллинга бактерий также функционирует [7], но остается нерешенным вопрос о его эффективности при этой инфекции. Процесс образования экстрацеллюлярных ДНК-сетей (нетоз) запускается комплексами антиген-антитело [8] и стимулируется цитокинами [9], активируется при агглютинации бактерий [10] и регистрируется при сепсисе, когда благодаря интенсивному формированию в крови НВЛ в 4–5 раз усиливается защитный бактерицидный эффект НГ *in vivo* [11]. Замечено, что интенсивное формирование НВЛ сопутствует более эффективному киллингу бактерий в толерантном к ЛПС (сенсibilизированном) организме с повышенной устойчивостью к инфекционному заражению [12]. Однако о вкладе НВЛ в поствакцинальную противочумную защиту нет информации.

Цель настоящей работы – определить влияние *Yersinia pestis* EV НИИЭГ на процесс формирования нейтрофильных внеклеточных ловушек *in vivo* при моделировании чумной инфекции и оценить их вклад в противочумную защиту.

Материалы и методы

В работе использовали вакцинный штамм *Y. pestis* EV НИИЭГ и вирулентный штамм *Y. pestis* 231(708) основного подвида, полученные из Государственной коллекции патогенных бактерий ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб». Культуры штаммов выращивали на агаре Хоттингера pH 7,2±0,1 (производство ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб») 48 ч при 28 °С. Из выросшей культуры по стандартному образцу мутности ОСО 42-28-59-85П 10 единиц, эквивалентному 1·10⁹ м.к./мл, готовили взвесь чумного микроба в стерильном 0,9 % растворе натрия хлорида pH 7,2. Методом серийных разведений конечную концентрацию клеток доводили до необходимой. Эксперименты проводили на белых мышах линии BALB/c массой от (18,5±1,5) г. В работе использовали здоровое поголовье, полученное из питомника ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб». До начала эксперимента мышей выдерживали на стандартном рационе с достаточным количеством воды в течение 10 дней. Дальнейшие эксперименты на животных выполняли в соответствии с Директивой Европейского парламента и Совета Европейского союза от 22 сентября 2010 г. № 2010/63/ЕС «О защите животных, используемых для научных целей».

Для изучения процесса формирования НВЛ у мышей на фоне иммунизации животным (18 особей) подкожно вводили вакцинный штамм *Y. pestis* EV НИИЭГ в дозе 2,5·10⁴ КОЕ, в качестве контроля использовали intactных мышей (18 особей). На 21-е сутки иммунизированным и intactным мышам инокулировали в брюшную полость по 5,0·10⁷ КОЕ *Y. pestis* EV НИИЭГ. Оценку формирования НВЛ *in vivo* проводили по методу V. Landoni *et al.* [12]. Для этого в группах иммунизированных и intactных животных выделяли по три подгруппы (по 6 особей в каждой). Мышам в первой подгруппе за 10 мин до внутрибрюшинной инъекции *Y. pestis* EV НИИЭГ вводили в брюшную полость стерильный раствор фосфатно-солевого буфера pH 7,2 (ФСБ) в объеме 0,2 мл; во второй подгруппе для разрушения экстрацеллюлярных ДНК-сетей в составе НВЛ аналогичным образом инокулировали микрококковую нуклеазу (МКН) (Thermo Scientific, Литва) в дозе 150U на мышь в 0,2 мл ФСБ; в третьей подгруппе для нейтрализации активности МКН в условиях *in vivo* 150U препарата МКН вводили совместно с этилендиаминтетрауксусной кислотой (ЭДТА) (Sigma-Aldrich, США) в дозе 10 мМ на животное. Через 4 ч умерщвляли мышей путем цервикальной дислокации. Фагоцитарную активность нейтрофилов в перитонеальном экссудате (ПЭ) определяли по методу Miliukienė *et al.* [13]. Для оценки эффективности киллинга бактерий в брюшной полости лабораторных животных по 1 мл перитонеального экссудата (ПЭ) высевали на агар Хоттингера pH 7,2. Посевы инкубировали 72 ч при температуре 28 °С и определяли число выросших колоний (КОЕ/мл). Для визуализации НВЛ по 1 капле ПЭ наносили

на стекла, обработанные поли-L-лизинном (Sigma, Япония), после высушивания капли стекла обеззараживали и фиксировали в 4 % водном растворе формальдегида («НеваРеагент», Россия) и окрашивали ДНК-связывающим флуоресцентным красителем – йодистым пропидием (Biomedicals LLC, Германия) из расчета 50 мкг на 1 мл ФСБ. С помощью люминесцентного микроскопа AXIO LAB.A1 (Zeiss, Швейцария) при увеличении в 1000 раз определяли в препаратах НВЛ, из числа выявленных в 10 полях зрения нейтрофилов высчитывали долю клеток, образовавших НВЛ.

С помощью проточной цитофлуориметрии по параметрам светорассеяния регистрировали изменения в клеточном составе ПЭ, а также оценивали интенсивность дегрануляции и лизиса фагоцитов [4], используя лазерный проточный цитофлуориметр с двумя источниками излучения (488 и 635 нм), двумя каналами светорассеяния (прямое и боковое) и семью каналами флуоресценции.

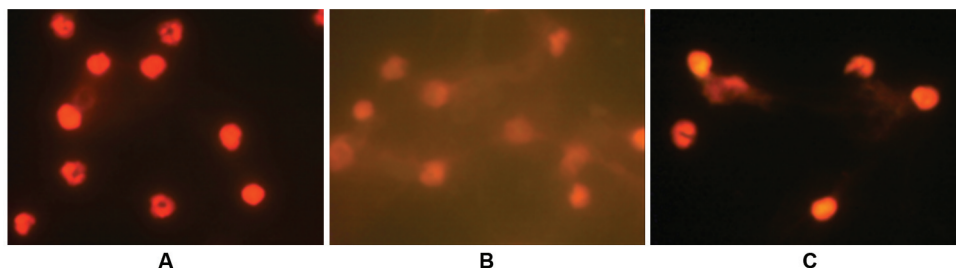
В следующем эксперименте животных опытной группы (20 особей) весом $(18,5 \pm 1,5)$ г подкожно иммунизировали двухсуточной агаровой культурой вакцинного штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ в дозе $1,0 \cdot 10^5$ КОЕ. В качестве контроля были взяты интактные мыши (10 особей). На 21-е сутки иммуногенеза мышам опытной и контрольной групп внутрибрюшинно вводили $1,0 \cdot 10^3$ КОЕ (20 LD₅₀) вирулентного штамма *Y. pestis* 231. Части животных опытной группы (10 мышей) за 10 мин до заражения в брюшную полость вводили по 150U микрококковой нуклеазы (МКН) (Thermo Scientific, Литва) в 0,2 мл фосфатно-солевого буфера pH 7,2 (ФСБ), применяемую для инактивации НВЛ *in vivo* [12]. Остальным мышам опытной группы аналогичным образом вводили ФСБ без нуклеазы. За зараженными животными наблюдали в течение 20 суток, регистрируя гибель мышей с типичными проявлениями чумной инфекции.

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с использованием стандартного пакета программ Microsoft Office Excel 2010 и Statistica 10.0 (StatSoft Inc.). Достоверность различий показателей в исследуемых группах оценивали по t-критерию Стьюдента. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Известно, что основными клеточными элементами в перитонеальном выпоте мышей BALB/c в норме являются лимфоциты (около 70 %), а доля фагоцитов (перитонеальных макрофагов) в суммарной клеточной популяции не превышает 30 % [12]. При изучении процесса формирования НВЛ у мышей на фоне иммунизации *Y. pestis* EV НИИЭГ установлено, что до внутрибрюшинного введения животным клеток чумного микроба, как в опытной, так и в контрольной группах, в составе ПЭ НГ фактически отсутствовали. Через 4 ч после введения в брюшную полость живых клеток чумного микроба клеточный состав ПЭ существенно изменялся: доля фагоцитов увеличивалась до 60–70 % и основными клетками в нем были уже не макрофаги, а НГ. Достоверных различий в фагоцитарной активности клеток ПЭ интактных и предварительно иммунизированных животных по отношению к клеткам *Y. pestis* через 4 ч в условиях *in vivo* не регистрировали. Однако НГ, осуществляющие киллинг микробных клеток в ПЭ предварительно иммунизированных мышей, были в состоянии более выраженной дегрануляции и подвергались более интенсивному аутолизису (нетозу). По данным люминесцентной микроскопии (рисунков), НГ у предварительно иммунизированных животных в большем количестве секретируют НВЛ в экстрацеллюлярное пространство.

Как следует из табл. 1, в опытной группе в образцах ПЭ, полученных от предварительно иммунизированных животных, интенсивность формирования НВЛ была в 5 раз выше, чем у интактных мышей. Однако такого интенсивного формирования НВЛ в ПЭ предварительно иммунизированных животных не наблюдали, если за 10 минут до инокуляции бактерий *Y. pestis* в брюшную полость мышам вводили МКН. Это обусловлено способностью МКН расщеплять ДНК-сети НВЛ. В случаях, когда МКН вводили совместно с ЭДТА, нейтрализующей эффект фермента, НВЛ только частично расщеплялись ферментом. Эффективность киллинга чумного микроба в организме предварительно иммунизированных животных была в 10 раз выше, чем в организме интактных мышей. Но на фоне введения в брюшную



Формирование нейтрофильных внеклеточных ловушек (НВЛ) в перитонеальном экссудате интактных (А), подкожно иммунизированных *Y. pestis* EV НИИЭГ (В, С) мышей линии BALB/c на введение в брюшную полость $5,0 \cdot 10^7$ КОЕ *Y. pestis* вакцинного штамма; С – на фоне блокировки образования НВЛ микрококковой нуклеазой (МКН) до повторной инокуляции *Y. pestis* EV НИИЭГ. Люминесцентная микроскопия. Ок. $\times 10$, Об. $\times 100$

Formation of neutrophil extracellular traps (NETs) in peritoneal exudate of intact (A), subcutaneously immunized with *Y. pestis* EV NIEG BALB/c mice (B, C) in response to administration of $5,0 \cdot 10^7$ CFU of *Y. pestis* vaccine strain; C – against the background of NET formation blocking by micrococcal nuclease (MCN) before re-inoculation with *Y. pestis* EV NIEG. Luminescence microscopy. Ocular lens $\times 10$, objective lens $\times 100$

Таблица 1 / Table 1

Результаты оценки формирования нейтрофильных внеклеточных ловушек (НВЛ) и эффективности киллинга клеток *Y. pestis* в перитонеальном экссудате (ПЭ) мышей линии BALB/c

Results of assessment of neutrophilic extracellular trap formation (NET) and effectiveness of *Y. pestis* cell killing in peritoneal exudates (PE) of BALB/c mice

Группы животных Groups of animals	Обработка животных на 21-е сутки Treatment of animals on Day 21	Количество НВЛ, % The number of NET, %	Количество КОЕ/мл ПЭ The number of CFU/ml of PE
Мыши, иммунизированные <i>Y. pestis</i> EV НИИЭГ в дозе $2,5 \cdot 10^4$ КОЕ, n=18 Mice immunized with <i>Y. pestis</i> EV NIEG at a dose of $2.5 \cdot 10^4$ CFU, n=18	ФСБ + <i>Y. pestis</i> EV НИИЭГ Phosphate-buffer saline + <i>Y. pestis</i> EV NIEG	41,5±2,3*	106,0±3,3*
	МКН + <i>Y. pestis</i> EV НИИЭГ MCN + <i>Y. pestis</i> EV NIEG	11,4±1,6	1442,0±21,0
	МКН + ЭДТА + <i>Y. pestis</i> EV НИИЭГ MCN + EDTA + <i>Y. pestis</i> EV NIEG	26,4±2,0*	340,0±18,0*
Интактные животные (контроль), n=18 Intact animals (control), n=18	ФСБ + <i>Y. pestis</i> EV НИИЭГ Phosphate-buffer saline + <i>Y. pestis</i> EV NIEG	8,3±0,9	1130,0±23,0
	МКН + <i>Y. pestis</i> EV НИИЭГ MCN + <i>Y. pestis</i> EV NIEG	5,9±0,7	1675,0±110,0
	МКН + ЭДТА + <i>Y. pestis</i> EV НИИЭГ MCN + EDTA + <i>Y. pestis</i> EV NIEG	6,4±1,0	1080,0±65,0

Примечание: МКН – микрококковая нуклеаза; * – $p < 0,05$ достоверные различия по отношению к контролю.

Note: MCN – micrococcus nuclease; * – $p < 0,05$ statistically significant differences in relation to the control.

полость МКН перед инокуляцией *Y. pestis* этот показатель также снижался, причем МКН оказывала существенное влияние на процесс образования НВЛ и киллинг чумного микроба только в организме предварительно иммунизированных животных.

Установлено, что иммунизация *Y. pestis* EV НИИЭГ стимулировала интенсивное формирование НВЛ в ответ на повторную инокуляцию живых клеток чумного микроба и существенно повышала эффективность их киллинга в условиях *in vivo*. Причина более интенсивной функциональной активации НГ у предварительно иммунизированных мышей, вероятно, обусловлена праймингом этих клеток медиаторами клеточного ответа (ЛПС, цитокины), вырабатываемыми в процессе иммуногенеза [9, 12]. Кроме того, присутствующие в иммунном организме специфические IgG к поверхностным антигенам чумного микроба не могут не стимулировать нетоз, который является антителозависимым процессом и запускается иммунными комплексами антиген-антитело через Fc-рецепторы на клеточной поверхности НГ [2, 8],

а также через рецептор, который, являясь сенсором размера микроорганизмов (дектин-1), реагирует на агрегацию бактерий [10].

Для подтверждения зависимости эффективности поствакцинальной противочумной защиты от формирования в организме НВЛ животных, предварительно иммунизированных *Y. pestis* EV НИИЭГ, на пике иммуногенеза (21-е сутки) заражали высоковирулентным штаммом *Y. pestis* 231. Согласно данным, представленным в табл. 2, иммунизация мышей оказывала существенное влияние на эффективность защиты животных от чумной инфекции, но заражение *Y. pestis* 231 на фоне предварительной инокуляции в брюшную полость МКН, расщепляющей НВЛ, как значимо уменьшало количество выживших животных, так и в 2 раза сокращало среднюю продолжительность жизни погибших мышей. Выявленные особенности реакции иммунизированных мышей на заражение вирулентной культурой *Y. pestis* 231 являются доказательством вклада НВЛ в обеспечение антиинфекционной защиты при чуме.

Таблица 2 / Table 2

Характеристика влияния инактивации формирования нейтрофильных внеклеточных ловушек (НВЛ) *in vivo* на выживаемость зараженных культурой вирулентного штамма *Y. pestis* 231 мышей линии BALB/c

Characteristics of effect of neutrophilic extracellular trap formation inactivation *in vivo* on survivability of BALB/c mice infected with the culture of virulent *Y. pestis* 231 strain

Группы животных Groups of animals	Обработка мышей на 21-е сутки Treatment of animals on Day 21	Количество животных (павшие/общее) Numbers of animals (non-surviving/total)	Средняя продолжительность жизни павших животных (сутки), M±m Average life span of non-surviving animals (Days), M±m
Иммунизированные животные (<i>Y. pestis</i> EV НИИЭГ в дозе $1,0 \cdot 10^5$ КОЕ), n=20 Immunized animals (<i>Y. pestis</i> EV NIEG at a dose of $1.0 \cdot 10^5$ CFU), n=20	ФСБ + <i>Y. pestis</i> 231, 20 LD ₅₀ Phosphate-buffer saline + <i>Y. pestis</i> 231, 20 LD ₅₀	2/10	7,5±2,1
	МКН + <i>Y. pestis</i> 231, 20 LD ₅₀ MCN + <i>Y. pestis</i> 231, 20 LD ₅₀	8/10	3,9±0,2
Интактные животные (контроль), n=10 Intact animals (control), n=10	ФСБ + <i>Y. pestis</i> 231, 20 LD ₅₀ Phosphate-buffer saline + <i>Y. pestis</i> 231, 20 LD ₅₀	10/10	4,0±0,0

На основании данных литературы [2, 5] и результатов представленного исследования можно предположить, что одним из ключевых механизмов первого этапа межклеточного взаимодействия при попадании возбудителя чумы в организм, защищенный противочумной вакциной, является усиление поглотительной и переваривающей способности макрофагов, стимулированных микробицидными компонентами НГ, образующимися в процессе реализации феномена их внеклеточной бактерицидности.

Изучение антимикробных стратегий НГ открывает новые возможности в аспекте поиска и оценки средств модуляции функциональной активности этих клеток для борьбы с чумной инфекцией. На основании полученных в работе экспериментальных данных можно сделать вывод о связи эффективности противочумной защиты, в том числе и с формированием и функционированием НВЛ в организме иммунизированных животных в ответ на повторный контакт с *Y. pestis*.

Таким образом, установленный факт формирования НВЛ при заражении *Y. pestis* мышей, иммунизированных вакцинным штаммом *Y. pestis* EV НИИЭГ, и влияния этого процесса на эффективность защиты от чумы является основанием для дальнейшего уточнения иммунопатогенетической роли НГ при чуме.

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

Список литературы

1. Исачкова Л.М., Плехова Н.Г. К развитию представлений об антиинфекционной резистентности. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2002; 1:11–5.
2. Нестерова И.В., Колесникова Н.В., Чудилова Г.А., Ломтатидзе Л.В., Ковалева С.В., Евлевский А.А. Нейтрофильные гранулоциты: новый взгляд на «старых игроков» на иммунологическом поле. *Иммунология*. 2015; 4:257–265.
3. Mayadas T.N., Cullere X., Lowell C.A. The multifaceted functions of neutrophils. *Annu Rev. Pathol.* 2014; 9:181–218. DOI: 10.1146/annurev-pathol-020712-164023.
4. Кравцов А.Л. Роль нейтрофильных внеклеточных ловушек при особо опасных бактериальных инфекциях. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2016; 4:95–104. DOI: 10.36233/0372-9311-2016-4-95-104.
5. Матосова Е.В., Андриков Б.Г. Морфофункциональная характеристика защитных механизмов нейтрофилов при бактериальных инфекциях и их вклад в патогенез провоспалительных реакций. *Российский иммунологический журнал*. 2018; 21(1):17–27. DOI: 10.7868/81028722118010021.
5. Долгушин И.И., Савочкина А.Ю., Курносенко И.В., Долгушина В.Д., Савельева А.А., Самусева И.В., Маякова В.Б. Участие внеклеточных ДНК-ловушек в защитных и патологических реакциях организма. *Российский иммунологический журнал*. 2015; 9(2):164–70.
7. Eisele N.A., Lee-Lewis H., Besch-Williford C., Brown C.R., Anderson D.M. Chemokine receptor CXCR2 mediates bacterial clearance rather than neutrophil recruitment in a murine model of pneumonic plague. *Am. J. Pathol.* 2011; 178(3):1190–200. DOI: 10.1016/j.ajpath.2010.11.067.
8. Aleman O.R., Mora N., Cortes-Vieyra R., Uribe-Querol E., Rosales C. Differential use of human neutrophil Fcγ receptors for inducing neutrophil extracellular traps formation. *J. Immunology Research*. 2016; 2016:2908034. DOI: 10.1155/2016/2908034.
9. Martinelli S., Urošević M., Daryadel A., Oberholzer P.A., Baumann C., Fey M.F., Dummer R., Simon H.-U., Yousefi S. Induction of genes mediating interferon-dependent extracellular trap formation during neutrophil differentiation. *J. Biol. Chem.* 2004; 279(42):44123–32. DOI: 10.1074/jbc.M405883200.
10. Branzk N., Lubojemska A., Hardison S.E., Wang Q., Gutterrez M.G., Brown G.D., Papayannopoulos V. Neutrophil sense microbial size and selectively release neutrophil extracellular traps in response to large pathogens. *Nat. Immunol.* 2014; 15(11):1017–25. DOI: 10.1038/ni.2987.
11. McDonald B., Urrutia R., Yipp B.G., Jenne C.N., Kubes P. Intravascular neutrophil extracellular traps capture bacteria from bloodstream during sepsis. *Cell Host Microbe*. 2012; 12(3):324–33. DOI: 10.1016/j.chom.2012.06.011.
12. Landoni V.I., Chiarella P., Martire-Greco D., Schierloh P., van-Rooijen N., Rearte B., Palermo M.S., Isturiz M.A., Fernandez G.C. Tolerance to lipopolysaccharide promotes an enhanced neutrophil extracellular traps formation leading to a more efficient bacterial clearance in mice. *Clin. Exp. Immunol.* 2012; 168(1):153–63. DOI: 10.1111/j.1365-2249.2012.04560.x.
13. Miliukienė V., Siaurys A., Pilinkienė A., Chaustova L. Flow cytometry measurement of *Saccharomyces cerevisiae* phagocytosis by neutrophils in mouse blood. *Biologiya*. 2005; 3:69–73.

response to large pathogens. *Nat. Immunol.* 2014; 15(11):1017–25. DOI: 10.1038/ni.2987.

11. McDonald B., Urrutia R., Yipp B.G., Jenne C.N., Kubes P. Intravascular neutrophil extracellular traps capture bacteria from bloodstream during sepsis. *Cell Host Microbe*. 2012; 12(3):324–33. DOI: 10.1016/j.chom.2012.06.011.

12. Landoni V.I., Chiarella P., Martire-Greco D., Schierloh P., van-Rooijen N., Rearte B., Palermo M.S., Isturiz M.A., Fernandez G.C. Tolerance to lipopolysaccharide promotes an enhanced neutrophil extracellular traps formation leading to a more efficient bacterial clearance in mice. *Clin. Exp. Immunol.* 2012; 168(1):153–63. DOI: 10.1111/j.1365-2249.2012.04560.x.

13. Miliukienė V., Siaurys A., Pilinkienė A., Chaustova L. Flow cytometry measurement of *Saccharomyces cerevisiae* phagocytosis by neutrophils in mouse blood. *Biologiya*. 2005; 3:69–73.

References

1. Isachkova L.M., Plekhova N.G. [To the development of ideas about anti-infective resistance]. *Epidemiologiya i infeksionnye bolezni [Epidemiology and Infectious Diseases]*. 2002; 1:11–5.
2. Nesterova I.V., Kolesnikova N.V., Chudilova G.A., Lomtadidze L.V., Kovaleva S.V., Evlevsky A.A. [Neutrophilic granulocytes: a new look at “old players” on the immunological field]. *Immunologiya [Immunology]*. 2015; 4:257–65.
3. Mayadas T.N., Cullere X., Lowell C.A. The multifaceted functions of neutrophils. *Annu Rev. Pathol.* 2014; 9:181–218. DOI: 10.1146/annurev-pathol-020712-164023.
4. Kravtsov A.L. [Role of neutrophil extracellular traps in especially dangerous bacterial infections]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]* 2016; 4:95–104. DOI: 10.36233/0372-9311-2016-4-95-104.
5. Matosova E.V., Andryukov B.G. [Morphofunctional characteristics of the protective mechanisms of neutrophils against bacterial infections and their contribution in the pathogenesis of pro-inflammatory reactions]. *Rossiyskiy Immunologicheskiy Zhurnal [Russian Immunological Journal]*. 2018; 21(1):17–27. DOI: 10.7868/81028722118010021.
6. Dolgushin I.I., Savochkina A.U., Kurnosenko I.V., Dolgushina V.F., Saveleva A.A., Samuseva I.V., Majakova V.B. [Participation of extracellular DNA traps in protection and pathological reactions of the organism]. *Rossiyskiy Immunologicheskiy Zhurnal [Russian Immunological Journal]*. 2015; 9(2):164–70.
7. Eisele N.A., Lee-Lewis H., Besch-Williford C., Brown C.R., Anderson D.M. Chemokine receptor CXCR2 mediates bacterial clearance rather than neutrophil recruitment in a murine model of pneumonic plague. *Am. J. Pathol.* 2011; 178(3):1190–200. DOI: 10.1016/j.ajpath.2010.11.067.
8. Aleman O.R., Mora N., Cortes-Vieyra R., Uribe-Querol E., Rosales C. Differential use of human neutrophil Fcγ receptors for inducing neutrophil extracellular traps formation. *J. Immunology Research*. 2016; 2016:2908034. DOI: 10.1155/2016/2908034.
9. Martinelli S., Urošević M., Daryadel A., Oberholzer P.A., Baumann C., Fey M.F., Dummer R., Simon H.-U., Yousefi S. Induction of genes mediating interferon-dependent extracellular trap formation during neutrophil differentiation. *J. Biol. Chem.* 2004; 279(42):44123–32. DOI: 10.1074/jbc.M405883200.
10. Branzk N., Lubojemska A., Hardison S.E., Wang Q., Gutterrez M.G., Brown G.D., Papayannopoulos V. Neutrophil sense microbial size and selectively release neutrophil extracellular traps in response to large pathogens. *Nat. Immunol.* 2014; 15(11):1017–25. DOI: 10.1038/ni.2987.
11. McDonald B., Urrutia R., Yipp B.G., Jenne C.N., Kubes P. Intravascular neutrophil extracellular traps capture bacteria from bloodstream during sepsis. *Cell Host Microbe*. 2012; 12(3):324–33. DOI: 10.1016/j.chom.2012.06.011.
12. Landoni V.I., Chiarella P., Martire-Greco D., Schierloh P., van-Rooijen N., Rearte B., Palermo M.S., Isturiz M.A., Fernandez G.C. Tolerance to lipopolysaccharide promotes an enhanced neutrophil extracellular traps formation leading to a more efficient bacterial clearance in mice. *Clin. Exp. Immunol.* 2012; 168(1):153–63. DOI: 10.1111/j.1365-2249.2012.04560.x.
13. Miliukienė V., Siaurys A., Pilinkienė A., Chaustova L. Flow cytometry measurement of *Saccharomyces cerevisiae* phagocytosis by neutrophils in mouse blood. *Biologiya*. 2005; 3:69–73.

Authors:

Kravtsov A.L., Goncharova A.Yu., Bugorkova S.A., Devdariani Z.L., Kozhevnikov V.A. Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”. 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

Об авторах:

Кравцов А.Л., Гончарова А.Ю., Бугоркова С.А., Девдариани З.Л., Кожеевников В.А. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru.