

Влияние азоксимера бромида на формирование внеклеточных нейтрофильных ловушек

Профессор Б.В. Пинегин¹, Ю.А. Дагиль², к.б.н. Н.В. Воробьева³, д.м.н. М.В. Пашченков¹

¹ФГБУ «ГНЦ «Институт иммунологии» ФМБА России, Москва

²ООО «НПО Петровакс Фарм», Москва

³МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

РЕЗЮМЕ

В 2004 г. был описан новый иммунологический процесс, заключающийся в выбросе активированными нейтрофилами нитей ДНК, обранных катионными белками и пептидами. Эти структуры получили название нейтрофильных внеклеточных ловушек (НВЛ). Было показано, что, наряду с положительными свойствами в отношении защиты от инфекции, НВЛ оказывают серьезное негативное влияние на организм, связанное с их белковым составом: они на 70% состоят из положительно заряженных гистонов и на 20–30% — из катионных белков типа α -дефензинов и пептида LL-37, которые так же, как и гистоны, попав во внеклеточное пространство, оказывают токсическое действие на ткани человека. В настоящее время доказано, что НВЛ участвуют в многочисленных патологических процессах, в т. ч. при респираторных инфекциях, значительно усугубляя течение заболевания.

Цель исследования: изучить влияние азоксимера бромида (выпускается под торговым наименованием Полиоксидоний) на формирование внеклеточных нейтрофильных ловушек *in vitro*.

Материал и методы: нейтрофилы здоровых доноров выделяли с помощью центрифугирования в одноступенчатом градиенте плотности Ficoll-Hypaque. Полиоксидоний в дозах 10, 100, 500 или 1000 мкг/мл добавляли к нейтрофилам за 1 ч до внесения в лунки планшета форбол-миристан-ацетата (ФМА). Для обнаружения НВЛ использовали флуоресцентную микроскопию. Препараты окрашивали, применяя Syber Green.

Результаты исследования: показано влияние препарата Полиоксидоний на формирование НВЛ, заключающееся в снижении способности активированных нейтрофилов выделять макромолекулярные комплексы, состоящие из ДНК и гранулярных, ядерных и цитоплазматических белков, в т. ч. антимикробных белков, одинаково токсичных как для прокариотических, так и для эукариотических клеток. Снижение образования и выделения НВЛ вносит существенный вклад в лечебно-профилактический эффект Полиоксидония и наряду с иммуномодулирующими (в т. ч. интерферон-индуцирующим) и детоксицирующими свойствами, объясняет его высокую клиническую эффективность в терапии острых и хронических инфекционно-воспалительных заболеваний респираторного тракта.

Заключение: проведенные исследования выявили принципиально новые механизмы лечебного действия Полиоксидония, а именно его способность уменьшать образование НВЛ активированными нейтрофилами с полным сохранением иммуномодулирующих и детоксицирующих свойств.

Ключевые слова: нейтрофильные внеклеточные ловушки, НЕТоз, респираторные заболевания, ОРВИ, нейтрофилы человека, азоксимера бромид, Полиоксидоний.

Для цитирования: Пинегин Б.В., Дагиль Ю.А., Воробьева Н.В., Пашченков М.В. Влияние азоксимера бромида на формирование внеклеточных нейтрофильных ловушек. РМЖ. 2019;1(*):1–6.

ABSTRACT

Azoximer bromide effect on the neutrophil extracellular traps formation

B.V. Pinegin¹, Yu.A. Dagil², N.V. Vorobieva³, M.V. Pashchenkov¹

¹National Research Center — Institute of Immunology Federal Medical-Biological Agency of Russia, Moscow

²LLC “Petrovax Pharm”, Moscow

³Lomonosov Moscow State University

In 2004, a new immunological process, consisting of DNA strands release framed with cationic proteins and peptides during neutrophil activation, was presented. These structures were called neutrophil extracellular traps (NETs). Along with the presence of NETs positive properties, it was shown that NETs have a serious negative effect associated with their protein composition, consisting of 70% of positively charged histones and 20–30% of cationic proteins such as α -defensins and peptide LL-37 (which in the same manner as histones have a toxic effect on human tissue outside the cellular space) in relation to the infection protection. Currently, it is proved that NETs are involved in numerous pathological conditions, including those with respiratory infections, significantly aggravating the course of the disease.

Aim: to study the effect of azoximer bromide (under «Polyoxidonium» trade name) on the NETs formation *in vitro*.

Patients and Methods: neutrophils of healthy donors were isolated by centrifugation in one-step Ficoll-Hypaque density gradient. Polyoxidonium in 10, 100, 500, or 1000 μ g/ml dosages was added to neutrophils 1 hour before the phorbol myristate acetate (PMA) introduction into the wells. Fluorescence microscopy was used to detect NETs. The preparations were stained with Syber Green.

Results: a new effect of the Polyoxidonium drug has been identified. It consisted in reducing the activated neutrophils ability to secrete macromolecular complexes including DNA, granular, nuclear and cytoplasmic proteins, and antimicrobial proteins as well, which are equally toxic for both prokaryotic and eukaryotic cells. A decrease in the NETs formation and release has made a significant contribution to the therapeutic and prophylactic effect of Polyoxidonium. Also, it explained its high clinical efficacy in the treatment and prevention of acute and chronic respiratory viral infections along with the immunomodulating and detoxifying properties.

Conclusion: conducted researches revealed fundamentally new therapeutic properties of Polyoxidonium, namely, its ability to reduce the NETs formation by activated neutrophils with full preservation of its immunostimulating and detoxifying properties.

Key words: neutrophil extracellular traps, NETosis, respiratory diseases, ARVI, human neutrophils, azoximer bromide, Polyoxidonium.

For citation: Pinegin B.V., Dagil Yu.A., Vorobieva N.V., Pashchenkov M.V. Azoximer bromide effect on the neutrophil extracellular traps formation. *RMJ*. 2019;1(*):2–6.

ВВЕДЕНИЕ

В 2004 г. в лаборатории А. Циклински [1] был описан новый иммунологический процесс, при котором активированные нейтрофилы выбрасывают нити ДНК, обрамленные катионными белками и пептидами. Эти структуры обладают способностью фиксировать микроорганизмы, попавшие во внутреннюю среду макроорганизма, из-за чего они получили название нейтрофильных внеклеточных ловушек (НВЛ). В настоящее время эти ловушки наряду с деградацией и фагоцитозом рассматриваются как третий защитный антиинфекционный механизм нейтрофилов — клеток врожденного иммунитета [1–3]. В силу содержания в составе НВЛ таких мощных антимикробных белков, как миелопероксидаза (МПО) и эластаза, α -дефензинов и пептида LL-37, продукта расщепления гранулярного белка каталепсидина, НВЛ обладают способностью не только фиксировать/захватывать, но и нейтрализовать и приводить к гибели бактерии [4], грибы [5, 6] и оболочечные вирусы [7, 8], особенно на ранних этапах развития инфекции. Однако многие возбудители инфекций, такие как пневмококк, гемофильная палочка, β -гемолитические стрептококки группы А, золотистый стафилококк, стрептококки группы В, клебсиелла и др., в процессе эволюции научились ускользать от НВЛ, делая данный тип защиты бесполезным [9]. К тому же показано, что вместе с положительным НВЛ оказывают и серьезное отрицательное действие, связанное с их белковым составом: они включают 70% положительно заряженных гистонов и 20–30% катионных белков типа α -дефензинов и пептида LL-37. Попав во внеклеточное пространство, они оказывают токсическое действие на ткани организма [10–13]. Это действие особенно ярко проявляется при избыточной миграции нейтрофилов в воспалительный очаг, например в легочную ткань, когда паутина из нитей ДНК пронизывает эту ткань и, более того, выявляется в плазме [13]. При гриппозной инфекции тяжесть заболевания коррелирует с уровнем НВЛ, состоящих преимущественно из МПО-ДНК, и более высокий уровень таких ловушек соответствует более тяжелому поражению легочной ткани [14]. Надо отметить, что, помимо прямого повреждающего действия на легочную ткань, НВЛ оказывают отрицательное влияние, образуясь в кровотоке, где они вызывают механическое нарушение кровообращения (в первую очередь в мелких сосудах органов и тканей) с формированием тромбов из сгустков слизи, состоящих из ДНК, муцина, продуктов распада клеток [15].

Развитие инфекционного процесса практически всегда сопровождается образованием НВЛ. Большинство наблюдений свидетельствуют, что баланс между положительной защитной и отрицательной цитотоксической ролью НВЛ смещается в сторону последней. Это делает НВЛ мишенью для разработки новых подходов в лечении и профилактике инфекционно-воспалительных процессов респираторного тракта [16]. Идеальным является такой вариант, при котором нивелируются патогенные, но сохраняются защитные, положительные свойства нейтрофилов. Та-

ким требованиям удовлетворяет азоксимера бромид, выпускающийся под торговым названием Полиоксидоний и являющийся сополимером N-окси-1,4-этиленпиперазина и (N-карбокси)-1,4-этиленпиперазиния бромида. Полиоксидоний проявляет эффективность при инфекционно-воспалительных заболеваниях вирусной, бактериальной и грибковой этиологии. Характерной особенностью этого препарата является его способность нейтрализовать внеклеточные кислородные радикалы, всегда образующиеся одновременно с НВЛ, и усиливать внутриклеточные. В результате этого усиливаются бактерицидные свойства лейкоцитов, их фагоцитарная активность и, соответственно, повышается антиинфекционный иммунитет, что подтверждается клинической практикой [17]. Цель настоящего исследования — изучение способности Полиоксидония в опытах *in vitro* оказывать влияние на образование внеклеточных ловушек нейтрофилами, стимулированными форабол-миристан-ацетатом (ФМА) — классическим активатором нейтрофилов.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Выделение первичных нейтрофилов человека. Периферическую кровь здоровых доноров в возрасте от 20 до 40 лет забирали в утренние часы натощак в полипропиленовые пробирки с гепарином ($20 \text{ ME} \times \text{мл}^{-1}$ крови). Нейтрофилы выделяли с помощью центрифугирования в одноступенчатом градиенте плотности Ficoll-Нугауе (плотность $1,077 \text{ г/см}^3$), как было описано ранее [18, 19]. Полученные клетки были представлены более чем на 98% гранулоцитами, а их жизнеспособность составляла 99%, что определяли тестом с 0,1% раствором трипанового синего. Нейтрофилы ресуспендировали в полной культуральной среде, включающей RPMI 1640 с добавлением 10 мМ HEPES, 2 мМ L-глутамина 1% инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки (все компоненты предоставлены Sigma-Aldrich), и культивировали при 37°C в атмосфере 5% CO_2 .

Азоксимера бромид. Для экспериментов использовали препарат Полиоксидоний лиофилизат для инъекций (ООО «НПО Петровакс Фарм») во флаконах из темного стекла с дозировкой 3 мг. В качестве растворителя использовался DPBS (Gibco) с pH 7,0–7,3. Для изучения дозозависимого эффекта Полиоксидоний в дозах 10, 100, 500 или 1000 мкг/мл добавляли к нейтрофилам за 1 ч до внесения в лунки планшета ФМА. В основных экспериментах использовали дозу Полиоксидония 100 мкг/мл.

Индукция и иммунофлуоресцентное окрашивание НВЛ. Для обнаружения НВЛ использовали флуоресцентную микроскопию. Для этого свежeweыделенные нейтрофилы ($2 \times 10^5/\text{мл}$) в полной культуральной среде адгезировали на круглых покровных стеклах, находящихся в 24-луночном планшете, в течение 30 мин при 37°C . Нейтрофилы прединкубировали в лунках с различными концентрациями Полиоксидония или средой (контроль) в течение 1 ч при 37°C и 5% CO_2 . Образование НВЛ индуцировали 30 нМ

ФМА в течение 3 ч. После стимуляции НЕТоза (процесс программируемой клеточной гибели, сопровождающийся выбросом нейтрофилом НВЛ) клетки фиксировали в лунках в растворе 4% параформальдегида (Sigma) в течение 15 мин при комнатной температуре. Удаляли супернатант и осторожно промывали стекла в PBS 3 раза по 5 мин. Препараты окрашивали с помощью Syber Green (Invitrogen) в течение 7 мин в темноте. После промывания препаратов дистиллированной водой их погружали в Moviol (ProLong Gold, Molecular Probes) и анализировали с использованием флуоресцентного микроскопа «Leica DM LB» (Leica Microsystems, Германия). Фотографирование препаратов проводили с помощью камеры «Leica DC300F».

Подсчет НВЛ. Количественная оценка нетотических нейтрофилов проводилась с использованием флуоресцентной микроскопии, как было описано ранее [9]. Подсчитывали общее число клеток и число промежуточных и нетотических нейтрофилов в каждом поле зрения. Далее оценивали процент НЕТоза в нескольких полях зрения. Для каждой дозы препарата было поставлено не менее трех экспериментов с тремя разными донорами и проанализировано не менее 300 клеток.

Статистическая обработка. Статистическую обработку данных проводили с помощью программ Excel 2003 (Microsoft, США), а также с использованием одномерного дисперсионного анализа (ANOVA) и теста множественного сравнения Бонферрони для оценки различий между группами.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В ходе проведенного исследования выявлено, что Полиоксидоний обладает способностью дозозависимо ингибировать образование НВЛ *in vitro* в диапазоне доз 10–1000 мкг/мл. На рисунке 1 представлены данные, которые получили, подсчитывая процент нетотических клеток (к ним относили нейтрофилы, выбросившие наружу деконденсированную ДНК) (рис. 2). Полиоксидоний в различных концентрациях добавляли за час до внесения ФМА. Подсчитывали процент нетотических клеток на фотографиях, полученных с использованием флуоресцентного микроскопа. Контролем служили нейтрофилы без добавления ФМА и Полиоксидония.

Как показано на рисунке 1, процент нетотических нейтрофилов под действием 100 мкг/мл Полиоксидония уменьшался на 39%. При дозе препарата 500 мкг/мл данный показатель составил 49%, при дозе 1000 мкг/мл — 63%. Таким образом, можно сделать вывод, что Полиоксидоний обладает способностью ингибировать НЕТоЗ *in vitro* на 39–63% в зависимости от используемой дозы. При этом при применении дозы 100 мкг/мл и более препарат оказывал достоверное действие.

Более детальный анализ клеточной популяции нейтрофилов при использовании дозы Полиоксидония 100 мкг/мл позволил выявить 3 типа нейтрофилов: интактные, промежуточные и нетотические. Промежуточными клетками считали клетки, которые по внешнему виду отличались от интактных, но не выбрасывали свою ДНК и содержимое наружу. Отличительным признаком таких клеток был больший размер по сравнению с интактными нейтрофилами и нечеткие края. Нетотическими нейтрофилами считали полностью разрушенные клетки, деконденсированная ДНК которых в виде сетей (ловушек) была выброшена во вне-

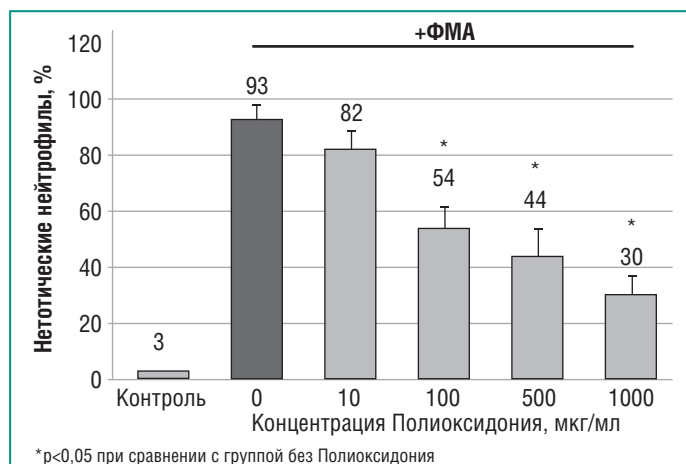


Рис. 1. Дозозависимое действие Полиоксидония на образование НВЛ

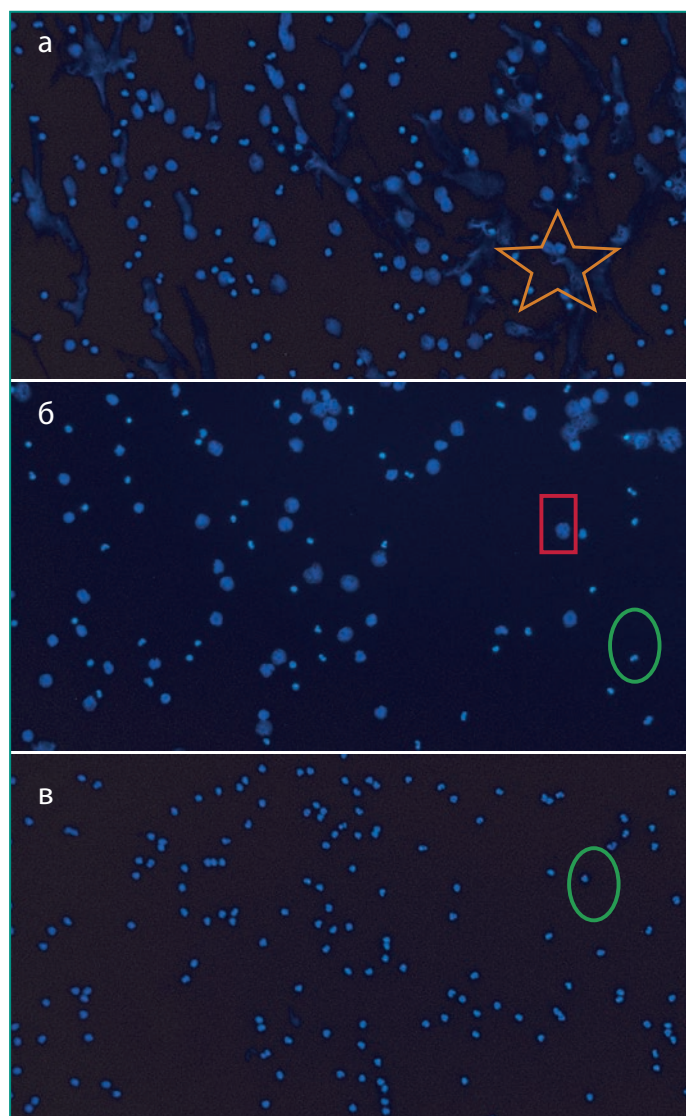


Рис. 2. Действие Полиоксидония на формирование НВЛ при использовании метода флуоресцентной микроскопии.

а — нейтрофилы, стимулированные ФМА; б — нейтрофилы, прединкубированные с применением 100 мкг/мл Полиоксидония в течение 1 ч и стимулированные ФМА; в — нестимулированные нейтрофилы (контроль). Зелеными кружками выделены интактные нейтрофилы, красным квадратом — промежуточные клетки, звездочкой — нетотические клетки (НВЛ), выбросившие свою ДНК и содержимое наружу

клеточное пространство. Примеры интактных, промежуточных и нетотических клеток приведены на рисунке 2.

Влияние Полиоксидония в дозе 100 мкг/мл на образование НВЛ показано на рисунке 3. Полиоксидоний в дозе 100 мкг/мл добавляли в лунки с клетками за 1 ч до добавления ФМА. ФМА добавлен во все лунки. Полиоксидоний примерно в 4 раза уменьшает процент нетотических нейтрофилов, при этом основной эффект Полиоксидония реализуется за счет увеличения количества промежуточных клеток.

Таким образом, Полиоксидоний ингибирует НЕТоз на его промежуточных стадиях, когда мембрана клетки набухает, но далее процесс останавливается и выброса ДНК не происходит. На фотографиях, полученных с использованием флуоресцентного микроскопа, можно видеть, что предварительная инкубация нейтрофилов с Полиоксидонием в дозе 100 мкг/мл в течение 1 ч значительно замедляет НЕТоз (см. рис. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ

Практически при всех острых и хронических воспалительных процессах как инфекционной, так и неинфекционной природы происходит образование НВЛ, вносящих значительный негативный вклад в течение заболеваний [18, 20]. В состав НВЛ входят белки и пептиды, одинаково токсичные как для эукариотических, так и для прокариотических клеток. Важные в составе фагосом нейтрофилов и макрофагов, эти белки и пептиды, выходя за пределы клетки, оказывают повреждающее действие на клетки хозяина и существенно ухудшают течение патологического процесса [10–14].

Патогенетическая роль НВЛ доказана при различных заболеваниях, в т. ч. сопряженных с нарушением функционирования слизистых оболочек, в частности при респираторных инфекциях. Так, например, доказано, что в механизме формирования экссудата (выпота) среднего уха как при остром, так и при хроническом процессе НВЛ играют ключевую роль. Формирование НВЛ приводит к повышению вязкости секрета и ассоциируется с гиперпродукцией преимущественно MUC5B-муцина, что в дальнейшем препятствует процессу элиминации слизи и очищению полости среднего уха, снижая эффективность этиотропной терапии [21].

НВЛ играют также значимую роль в развитии пневмококковой внебольничной пневмонии. Формируясь как на эпителии, так и в эндотелиальном пространстве, они вызывают повреждение альвеолярно-эндотелиального барьера с последующим развитием дыхательной недостаточности. В исследованиях показано, что уровень образования НВЛ напрямую коррелирует с тяжестью течения пневмонии [22].

В основе патогенеза вирусных инфекций, обусловленных вирусами гриппа, респираторно-синцитиальными (РС) вирусами и риновирусами, важную роль также играют НВЛ. Вирус-индуцированные НВЛ приводят к повреждению эпителия и повышают вязкость слизи. С образованием НВЛ связывают обструкцию дыхательных путей у детей при РС-бронхиолитах, сопровождающихся свистящим дыханием [16].

Риновирусные инфекции также небезобидны. Инфицирование риновирусом слизистой оболочки экспериментальных животных повышало формирование НВЛ,

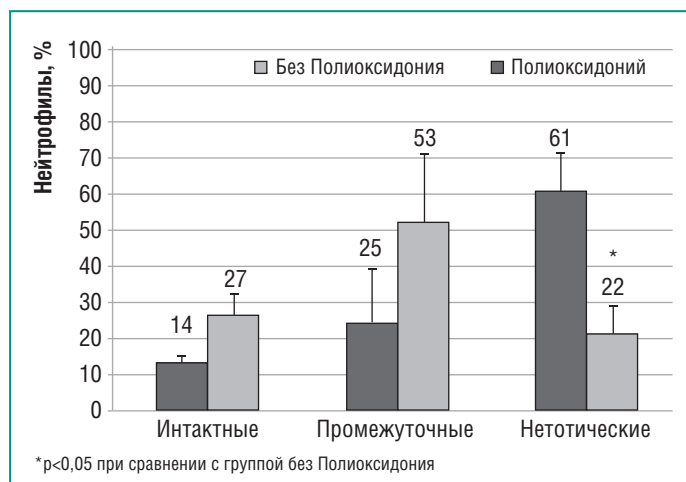


Рис. 3. Ингибирование НВЛ Полиоксидонием

которые определялись в большом количестве в носоглоточном смыве и бронхоальвеолярном лаваже. При этом пик продукции НВЛ наблюдался через 2 сут после инфицирования. Тяжесть респираторных симптомов коррелировала с уровнем ДНК в слизи. Снижение уровня НВЛ приводило к снижению тяжести респираторных симптомов, в т. ч. обострения астмы на фоне аллергенов клеща домашней пыли, обусловленных риновирусом [23].

Повреждающий эффект НВЛ выявлен при развитии инфекционно-воспалительных процессов практически всех органов и тканей, особенно при поражении респираторного тракта, когда наблюдается длительное и повышенное образование НВЛ [10, 11]. На сегодняшний день терапевтические подходы к коррекции формирования НВЛ крайне ограничены, поэтому актуальной задачей клинической медицины является разработка методов, снижающих формирование и токсический эффект НВЛ, образующихся при развитии воспалительного процесса. Такие методы должны входить в комплекс лечебных и профилактических мероприятий.

Данная работа открывает новые перспективные возможности коррекции НВЛ при инфекционно-воспалительной патологии с помощью Полиоксидония. Важно отметить, что Полиоксидоний, обладающий противовоспалительным, иммуномодулирующим и детоксицирующим действием, уже более 20 лет используется в рутинной клинической практике и демонстрирует хороший клинический эффект при лечении острых и хронических инфекционно-воспалительных процессов, в т. ч. респираторного тракта, и высокий профиль безопасности [24]. Это позволяет применять его у детей с 6 мес. и у пациентов с аллергическими заболеваниями, а также в комплексной терапии с антибактериальными, противовирусными, противогрибковыми и антигистаминными препаратами, глюкокортикостероидами и цитостатиками.

Проведенные исследования выявили принципиально новые лечебные свойства Полиоксидония, а именно его способность подавлять образование активированными нейтрофилами внеклеточных ловушек наряду с его противовоспалительными, иммуномодулирующими и детоксицирующими свойствами. Эти эффекты наблюдаются параллельно со снижением образования нейтрофилами внеклеточных активных форм кислорода (АФК, выявляемых с помощью люминол- и люцигенин-зависимой хими-

люминесценции) и повышением образования внутриклеточных АФК, а именно супероксидного аниона и перекиси водорода (выявляемых с помощью дихлорфлуоресцеин диацетата), что было показано методом проточной цитометрии [17, 25]. Общеизвестно, что внеклеточные и внутриклеточные АФК играют различную роль в жизни клетки. Если внеклеточные АФК, в т. ч. в составе НВЛ, оказывают преимущественно токсический эффект на окружающие ткани, то внутриклеточные АФК стимулируют клеточный метаболизм. От них зависит усиление фагоцитоза, бактерицидности, синтеза цитокинов [17, 25]. Таким образом, к комплексу известных положительных эффектов Полиоксидония добавляется и такое важное свойство, как способность снижать образование НВЛ и, следовательно, их цитотоксический эффект, что, без сомнения, вносит существенный вклад в лечебный эффект препарата и открывает новые возможности для коррекции формирования НВЛ и патогенетической терапии большого числа заболеваний.

Конфликт интересов: автор статьи Ю.А. Дагиль является сотрудником компании ООО «НПО Петров-вакс Фарм».

Литература

1. Brinkmann V., Reichard U., Goosmann C. et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*. 2004;303:1532–1535.
2. Kenny E.F., Herzig A., Kruger R. et al. Diverse stimuli engage different neutrophil extracellular trap pathways. *eLife*. 2017;6:1–21. DOI: 10.7554/eLife.24437.
3. Lande R., Ganguly D., Facchinetti V. et al. Neutrophils activate plasmacytoid dendritic cells by releasing self-DNA-peptide complexes in systemic lupus erythematosus. *Sci Transl Med*. 2011;3(73):1–20.
4. Brinkmann V., Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps: is immunity the second function of chromatin? *J Cell Biol*. 2012;198:773–783.
5. Bianchi M., Hakkim A., Brinkmann V. et al. Restoration of NET formation by gene therapy in CGD controls aspergillosis. *Blood*. 2009;114:2619–2622.
6. Branzk N., Lubojemska A., Hardison S.E. et al. Neutrophils sense microbe size and selectively release neutrophil extracellular traps in response to large pathogens. *Nat Immunol*. 2014;15:1017–1025.
7. Saitoh T., Komano J., Saitoh Y. et al. Neutrophil extracellular traps mediate a host defense response to human immunodeficiency virus-1. *Cell Host Microbe*. 2012;12:109–116.
8. Funchal G.A., Jaeger N., Czepielewski R.S. et al. Respiratory syncytial virus fusion protein promotes TLR-4-dependent neutrophil extracellular trap formation human neutrophils. *PLoS ONE*. 2015;10:1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124082>
9. Storisteanu D.M.L., Pocock J.M., Cowburn A.S. et al. Evasion of Neutrophil Extracellular Traps by Respiratory Pathogens. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2017;56(4):423–431.
10. Caudrillier A., Kessenbrock K., Gilliss B.M. et al. Platelets induce neutrophil extracellular traps in transfusion-related acute lung injury. *J Clin Invest*. 2012;122(7):2661–2671.
11. Thomas G.M., Carbo C., Curtis B.R. et al. Extracellular DNA traps are associated with the pathogenesis of TRALI in humans and mice. *Blood*. 2012;119(26):6335–6343.
12. Rossaint J., Herter J.M., Van Aken H. et al. Synchronized integrin engagement and chemokine activation is crucial in neutrophil extracellular trap-mediated sterile inflammation. *Blood*. 2014;123(16):2573–2584.
13. Luo L., Zhang S., Wang Y. et al. Proinflammatory role of neutrophil extracellular traps in abdominal sepsis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2014;307(7):586–596.
14. Zhu L., Liu L., Zhang Y. et al. High Level of Neutrophil Extracellular Traps Correlates With Poor Prognosis of Severe Influenza A Infection. *J Infect Dis*. 2018;217(3): 428–437.
15. Papayannopoulos V., Staab D., Zychlinsky A. Neutrophil elastase enhances sputum solubilization in cystic fibrosis patients receiving DNase therapy. *PLoS One*. 2011;6(12): e28526. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028526> (дата обращения: 13.02.2019).
16. Cortjens B., van Woensel J.B.M., Bem R.A. Neutrophil Extracellular Traps in Respiratory Disease: guided anti-microbial traps or toxic webs. *Paediatric Respiratory Reviews*. 2017;21:54–61.
17. Dyakonova V.A., Dambaeva S.V., Pinegin B.V., Khaitov R.M. Study of interaction between the polyoxidonium immunomodulator and the human immune system cells. *Int Immunopharmacol*. 2004;4(13):1615–1623.
18. Воробьева Н.В., Муругин В.В., Кулаков В.В., Пинегин Б.В. Ингибиторный анализ активности NADPH-оксидазы в хемоаттрактант-индуцированной дегрануляции нейтрофилов. *Иммунология*. 2012;33(1):11–16. [Vorobieva N.V., Murugin V.V., Kulakov V.V., Pinegin B.V. Inhibitory analysis of NADPH oxidase activity in chemoattractant-induced neutrophil degranulation. *Immunology*. 2012;33(1):11–16 (in Russ.)].
19. Воробьева Н.В., Голубева Н.М., Пинегин Б.В. Роль актинового цитоскелета в регуляции дегрануляции нейтрофилов человека, активированных опсонизированным зимозаном. *Иммунология*. 2014;3:124–129. [Vorobeva N.V., Golubeva N.M., Pinegin B.V. The role of the actin cytoskeleton in the regulation of the degranulation of human neutrophils activated by opsonized zymosan. *Immunology*. 2014;3:124–129 (in Russ.)].
20. Pinegin B., Vorobjeva N., Pinegin V. Neutrophil extracellular traps and their role in the development of chronic inflammation and autoimmunity. *Autoimmun Rev*. 2015;14(7):633–640.
21. Val S., Poley M., Brown K. et al. Proteomic Characterization of Middle Ear Fluid Confirms Neutrophil Extracellular Traps as a Predominant Innate Immune Response in Chronic Otitis Media. *PLoS ONE*. 2016;11(4): e0152865. DOI:10.1371/journal.pone.0152865.
22. Moorthy A.N., Rai P., Jiao H. et al. Capsules of virulent pneumococcal serotypes enhance formation of neutrophil extracellular traps during in vivo pathogenesis of pneumonia. *Oncotarget*. 2016;7(15):19327–19340.
23. Toussaint M., Jackson D.J., Swieboda D. et al. Host DNA released by NETosis promotes rhinovirus-induced type-2 allergic asthma exacerbation. *Nat Med*. 2017;23(6):681–691. DOI:10.1038/nm.4332.
24. Актуальные вопросы медицины. Полиоксидоний в клинической практике. Под ред. А.В. Караулова. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2008. [Current issues of medicine. Polyoxidonium in clinical practice. Ed. A.V. Karaulov. M.: GEOTAR-Media; 2008 (in Russ.)].
25. Dambaeva S.V., Mazurov D.V., Golubeva N.M. et al. Effect of polyoxidonium on the phagocytic activity of human peripheral blood leukocytes. *Russ J Immunol*. 2003;8(1):53–60.