

**ОПЫТ РАЗРАБОТКИ И ПРИМЕНЕНИЯ МЕТОДА ИССЛЕДОВАНИЯ  
СПОСОБНОСТИ НЕЙТРОФИЛОВ К ФОРМИРОВАНИЮ  
ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ЛОВУШЕК**

Новиков Д. Г. <sup>1</sup>,  
Золотов А. Н. <sup>1</sup>,  
Савочкина А. Ю. <sup>2</sup>,  
Индутный А. В. <sup>1</sup>,  
Корпачева О. В. <sup>1</sup>,  
Кириченко Н. А. <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Омский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Омск, Россия.

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Челябинск, Россия.

**EXPERIENCE IN THE DEVELOPMENT AND APPLICATION OF A  
METHOD FOR INVESTIGATING THE ABILITY OF NEUTROPHILS TO  
FORM EXTRACELLULAR TRAPS**

Novikov D. G. <sup>a</sup>,  
Zolotov A. N. <sup>a</sup>,  
Savochkina A. Yu. <sup>b</sup>,  
Indutny A. V. <sup>a</sup>,  
Korpacheva O. V. <sup>a</sup>,  
Kirichenko N. A. <sup>a</sup>,

<sup>a</sup> Omsk State Medical University, Omsk, Russia.

<sup>b</sup> South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russia.

## Резюме

Феномен образования нейтрофильных внеклеточных ловушек (НВЛ), или нетоз, играет ключевую роль в патогенезе инфекционных и воспалительных заболеваний. Однако отсутствие стандартизированных методов оценки НВЛ затрудняет корректную интерпретацию результатов. Цель исследования – разработать применимую на практике методику исследования способности нейтрофилов к формированию НВЛ, позволяющую корректно идентифицировать сопряженные с нетозом феномены.

Нейтрофилы выделяли из периферической крови 15 здоровых доноров методом градиентного центрифугирования (фиколл-верографин, градиент плотности 1,077 – 1,105 г/мл). Для стимуляции нетоза использовали смесь бактерий (*Lactobacillus reuteri*, *L. acidophilus*, *L. rhamnosus*, *Bifidobacterium longum*). Для визуализации НВЛ и других люминесцентно-позитивных объектов использовали интеркалирующий краситель пропидия йодид и антитела моноклональные мышинные к человеческим CD15/FITC. Люминесцентную микроскопию проводили при длине волны возбуждения 450-480 нм, эмиссии – от 515 нм. В препарате регистрировали интактные нейтрофилы (объекты ярко-зелёного цвета, без прокрашенного ядра), активированные нейтрофилы (ярко-зелёные с красно-оранжевым, окрашенным пропидия йодидом ядром), клетки раннего нетоза (ярко-зелёные клетки с выходом ядерного материала в одной или более локациях за пределы клеточной мембраны), НВЛ: облаковидные (в виде «облака», окружающего нейтрофил или его фрагменты со всех сторон и более чем 1,5 раза больше его размера) и нитевидные (в виде нитей в 2 и более раза больше размера нейтрофила). Определяли долю каждого из типов наблюдаемых объектов относительно всех люминесцентно-позитивных объектов. В ходе оптимизации методики определены ключевые параметры: температура инкубации лейкоцитов со стимулятором (37°C), его концентрация ( $2,5 \times 10^9$  бактерий/мл), время стимуляции (30 мин).

Оценка воспроизводимости метода показала приемлемый межсерийный коэффициент вариации: 13,8% для нитевидных и 15,2% для облаковидных НВЛ. Метод исследования был применен в различных группах пациентов, имеющих определенную инфекционную (туберкулез легких) и неинфекционную патологию (язвенный колит, аневризмальные костные кисты). Результаты оценки способности нейтрофилов к образованию НВЛ у представителей обследуемых когорт позволяют сделать вывод о достаточном уровне чувствительности и манифестности регистрируемых с помощью данной методики показателей.

**Ключевые слова:** нейтрофилы, нейтрофильные внеклеточные ловушки, нетоз, метод исследования, способность нейтрофилов к формированию внеклеточных ловушек, люминесцентная микроскопия.

### Abstract

The phenomenon of neutrophil extracellular trap (NETs) formation, or netosis, plays a key role in the pathogenesis of infectious and inflammatory diseases. However, the lack of standardized methods for assessing NETs makes it difficult to correctly interpret the results. The aim of the study was to develop a practical methodology to investigate the ability of neutrophils to form NETs, which would allow correct identification of netosis-associated phenomena.

Neutrophils were isolated from peripheral blood of 15 healthy donors by gradient centrifugation (Ficoll-Verographin, density gradient 1.077 - 1.105 g/mL). A mixture of bacteria (*Lactobacillus reuteri*, *L. acidophilus*, *L. rhamnosus*, *Bifidobacterium longum*) was used to stimulate netosis. Propidium iodide intercalating dye and mouse monoclonal antibodies to human CD15/FITC were used to visualize NETs and other luminescence-positive objects. Luminescence microscopy was performed at excitation wavelengths of 450-480 nm and emission wavelengths from 515 nm. Intact neutrophils (bright green objects without a stained nucleus), activated neutrophils (bright green with a red-orange, propidium iodide stained nucleus), early netosis cells (bright green cells with nuclear material in one or more locations outside the cell membrane), NETs: cloud-shaped (in the form of a «cloud» surrounding the neutrophil or its fragments on all sides and more than 1.5 times its size) and filamentous (in the form of filaments 2 or more times the size of the neutrophil) were recorded in the preparation. The proportion of each type of observed objects relative to all fluorescent-positive objects was determined. During the optimization of the method the key parameters were determined: the temperature of leukocytes incubation with the stimulant (37°C), its concentration ( $2.5 \times 10^9$  bacteria/ml), stimulation time (30 min).

Evaluation of the reproducibility of the method showed an acceptable inter-series coefficient of variation: 13.8% for filamentous and 15.2% for cloud-shaped NETs. The study method was applied in different groups of patients with certain infectious (pulmonary tuberculosis) and non-infectious pathology (ulcerative colitis, aneurysmal bone cysts). The results of the assessment of neutrophils' ability to form NETs in the representatives of the examined cohorts allow us to conclude that the level of sensitivity and manifestability of the indicators registered with this technique is adequate.

**Keywords:** neutrophils, neutrophil extracellular traps, netosis, research method, ability of neutrophils to form extracellular traps, luminescence microscopy.

## 1 Введение

Открытие процесса формирования нейтрофильных внеклеточных ловушек (НВЛ) – нетоза, как механизма неспецифической иммунной защиты, произошло сравнительно недавно [9]. Вслед за этим появилось понимание его значения, как важного звена иммунопатологических процессов [7]. Несомненно, что данный феномен привлек внимание исследователей, которыми было разработано множество способов обнаружения как самих НВЛ, так и биомаркеров, сопряженных с нетозом [10, 14, 15]. Маркерный подход заключается в определении компонентов НВЛ, таких как цитруллинированный гистон H3 или нейтрофильная эластаза, циркулирующих в крови или присутствующих других биологических средах [15]. Однако ни один из этих маркеров не является специфичным для нетоза и появление их в кровотоке может быть сопряжено с иными клеточными процессами, отличными от нетоза [11, 15]. Обнаружение НВЛ в месте их формирования (очаге повреждения), как правило, затруднено, но в случае системного воспалительного процесса НВЛ могут быть обнаружены и в крови [15]. В экспериментальных работах НВЛ можно получить, стимулируя культуру нейтрофильных лейкоцитов, однако, в зависимости от вида стимуляторов могут активироваться различные механизмы нетоза [7]. Кроме того, использование разнообразных комбинаций флуоресцентных красителей [15], а в отдельных методических подходах и световой микроскопии для определения компонентов НВЛ [1], отражает отсутствие «золотого стандарта» их определения и затрудняет дифференциацию нетоза от других видов клеточной смерти. Таким образом, перед исследователем нетоза нередко встает задача той или иной адаптации отдельных методик для обеспечения возможности наиболее достоверной идентификации событий состоявшегося нетоза при исследовании конкретного патологического процесса. Цель настоящего исследования: разработать применимую на практике методику исследования способности нейтрофилов к формированию НВЛ, позволяющую корректно идентифицировать сопряженные с нетозом феномены.

## 2 Материалы и методы

Для исследования использовали образцы периферической венозной крови объемом 6 мл, собранные в вакуумную пробирку с наполнителем лития гепарином (Cerebrum, КНР). Все образцы крови были получены от 15 здоровых волонтеров (7 мужчин и 8 женщин) – сотрудников ФГБОУ ВО ОмГМУ Минздрава России в возрасте от 20 до 45 лет, в анамнезе не имеющих хронических аутоиммунных и инфекционных заболеваний, не перенесших острых воспалительных заболеваний в течение 2 недель до обследования, для женщин – вне *mensis* и не принимающих гормональные контрацептивные препараты. Образцы крови и данные пациентов были получены во время проведения профилактического медицинского осмотра сотрудников организации.

Нейтрофилы выделяли из образцов крови согласно стандартному протоколу на растворе фиколла-верографина (ООО НПП «ПанЭко», Россия) – градиент плотности 1,077 – 1,105 г/мл [12]. Собранные нейтрофилы дважды отмывали физиологическим раствором натрия хлорида (ООО НПП «ПанЭко», Россия). Затем, после подсчета в камере Горяева, концентрацию нейтрофилов доводили при помощи 1% раствора альбумина (ООО НПП «ПанЭко», Россия) в растворе Хенкса (ООО НПП «ПанЭко», Россия) до  $5 \times 10^6$  клеток на 1 мл. Визуальная микроскопия выделенных клеток показала, что нейтрофилы составляли более 97% от общего числа клеток. Жизнеспособность клеток, окрашенных трипановым синим (ООО «БиолоТ», Россия), составляла более 95 %.

На выделенные нейтрофилы воздействовали неспецифическим антигенным стимулятором различной концентрации (смесь бактерий *Lactobacillus (L.) reuteri*, *L. acidophilus*, *L. rhamnosus* и *Bifidobacterium longum* в составе коммерческого пробиотика «Reuteri», Nature's Way, США), при различных температурных режимах. Исследовали влияние времени инкубации с антигенным стимулятором на интенсивность формирования нейтрофилами внеклеточных ловушек.

С помощью люминесцентной микроскопии (возбуждение 450-480 нм, эмиссия от 515 нм) идентифицировали люминесцентно-позитивные клетки и нейтрофильные внеклеточные ловушки (НВЛ). Для визуализации этих объектов использовали краситель пропидия йодид (BIO-RAD, США) и антитела моноклональные мышинные к человеческим CD15/FITC, клон C3D-1 (Dako, США). Интактные нейтрофилы визуализировались как объекты ярко-зелёного цвета (люминесценция связавшихся антител к CD15-FITC) без прокрашенного ядра; активированные нейтрофилы были ярко-зелёные с красно-оранжевым, окрашенным пропидия йодидом ядром; ярко-зелёные клетки с выходом ядерного материала в одной или более локациях за пределы клеточной мембраны расценивали как клетки раннего нетоза. НВЛ окрашивались пропидия йодидом в красно-оранжевый цвет, иногда содержали фрагменты клеточной мембраны ярко зеленого цвета. НВЛ подразделялись на нитевидные НВЛ – в виде нитей в 2 и более раза больше размера нейтрофила и облаковидные НВЛ – в виде «облака», окружающего нейтрофил или его фрагменты со всех сторон и более чем 1,5 раза больше его размера (рис.1).

Определяли процентное отношение интактных нейтрофилов, активированных нейтрофилов, клеток раннего нетоза, нитевидных НВЛ и облаковидных НВЛ по отношению ко всем идентифицируемым люминесцентно-позитивным объектам.

Оценка характера распределения анализируемых показателей, выполненная при помощи критерия Шапиро-Уилка продемонстрировала, что их распределение отличалось от нормального, поэтому для анализа данных использовали непараметрические критерии. Для каждого из исследуемых показателей были определены значения медианы (Me) и межквартильного

интервала (Q1-Q3). Уровень статистической значимости различий между группой отрицательного контроля, в которой стимуляция пробиотиком не проводилась и группой, в которой нейтрофилы стимулировались пробиотиком, а также между группами, в которых использовалась разная температура, при которой происходила стимуляция нейтрофилов рассчитывали с помощью U-критерия Манна-Уитни. Для оценки эффективности времени стимуляции использовали T-критерий Вилкоксона. Данные обрабатывали в программе Statistica 10. Статистически значимым считали различия при  $p < 0,05$ . Воспроизводимость методики оценивали, рассчитывая коэффициент вариации в 20 повторениях ( $CV_{20}$ ).

### 3 Результаты

На начальном этапе исследования была разработана и испытана методика стимуляции и выявления внеклеточных ловушек, формируемых нейтрофилами. Нейтрофильные лейкоциты, выделенные из образцов периферической венозной крови здоровых волонтеров, подвергались воздействию неспецифического антигенного стимулятора – смесью бактерий *Lactobacillus (L.) reuteri*, *L. acidophilus*, *L. rhamnosus* и *Bifidobacterium longum*. На основании сертификата фирмы-производителя, концентрация бактерий составляла  $3 \times 10^9$  колониеобразующих единиц на 63 мг препарата. С целью подбора оптимальной концентрации и объема неспецифического антигенного стимулятора, пробиотик разводили в физиологическом растворе NaCl в концентрации  $2,5 \times 10^9$  бактерий на 1 мл раствора. Отношение объема стимулятора к объему взвеси нейтрофилов составляло 1:10. Стимуляция нейтрофилов бактериями в концентрации  $5 \times 10^9$  бактерий на 1 мл раствора приводила к чрезмерному присутствию в препарате пропидия йодид – позитивно окрашенных бактерий. Концентрация  $1 \times 10^9$  бактерий на 1 мл раствора не позволяла достигнуть необходимого уровня стимуляции – нейтрофильные внеклеточные ловушки формировались не во всех препаратах, результат оценки способности нейтрофилов к формированию внеклеточных ловушек был трудновоспроизводим, наблюдался большой межквартильный размах процента НВЛ в препарате.

Для выявления внеклеточных ловушек в препарате качестве интеркалирующего красителя использовали пропидия йодид, что позволило совместить способ визуализации НВЛ с оценкой качества выделения нейтрофилов, так как известно, что пропидия йодид не проникает в клетку через неповрежденную мембрану. Для визуализации поверхности мембран нейтрофилов использовали моноклональные антитела к CD15, меченые FITC. Известно, что антиген CD15 представлен не только на поверхности нейтрофилов, но и моноцитов, макрофагов, эозинофилов, тучных клеток, миелоидных клеток предшественников, однако выполняемая процедура градиентного выделения нейтрофилов исключала участие других клеток в эксперименте. Предлагаемый подход, комбинирующий действие интеркалирующего ДНК-связывающего красителя и специфическое распознавание при помощи меченых антител, позволяет в одном поле зрения

с одним набором светофильтров наблюдать морфологические эквиваленты этапов формирования НВЛ: от жизнеспособных клеток ярко-зеленого цвета без окрашенного ядра и активированных нейтрофилов с явлениями деконденсации ядра и повышением проницаемости клеточной мембраны до сформированных НВЛ.

Проведен сравнительный анализ различных концентраций пропидия йодида с целью определения наименьшей эффективной концентрации для окрашивания внеклеточных ловушек нейтрофилов. При внесении объема 5 мкл во взвесь нейтрофилов объемом 10 мкл оптимальная концентрация пропидия йодида составила 0,1 мг/мл – концентрация от 0,1 мг/мл и выше позволяла уверенно визуализировать нити ДНК, выброшенные нейтрофилом, а снижение концентрации красителя ниже 0,1 мг/мл ухудшало качество визуализации, в частности, происходило снижение интенсивности флюоресценции внеклеточных структур.

Инкубация с моноклональными антителами к CD15 мечеными FITC продемонстрировала оптимальный результат окрашивания при разведении 0,9% раствором NaCl 1:10. Разведение в соотношении больше чем 1:10 снижало качество флюоресценции интактных нейтрофилов, а разведение в соотношении меньше чем 1:10 позволяло выявлять интактные нейтрофилы с сопоставимым качеством, но с большим расходом реактива.

По достижении приемлемых результатов в стимуляции нейтрофилов и в визуализации НВЛ проведены эксперименты для определения оптимальных условий исследования способности нейтрофилов к формированию внеклеточных ловушек. С этой целью на втором этапе был определен оптимальный температурный режим и время стимуляции изолированных нейтрофилов. При сравнении процесса формирования внеклеточных ловушек при комнатной температуре (20–22°C) и при 37°C статистически значимые различия в содержании НВЛ наблюдались при температуре 37°C (табл. 1). Таким образом, температура 37°C была принята оптимальной для формирования нейтрофилом НВЛ в настоящем исследовании.

Кроме того, было подобрано время стимуляции нейтрофилов (табл. 1). Содержание НВЛ через 15 минут после воздействия стимулятора было значимо выше, чем через 5 минут, однако процент сформировавшихся НВЛ оставался незначительным. Значительный прирост доли НВЛ наблюдался через 30 минут после воздействия стимулятора. При этом статистически значимых различий в содержании НВЛ между временем стимуляции 30 минут и 45 минут не было выявлено. В результате проведенного этапа исследования был сделан вывод о том, что 30 минут инкубации нейтрофилов с неспецифическим антигенным стимулятором достаточно для эффективного формирования НВЛ у здоровых волонтеров.

Таким образом, итоговый вид методики определения способности нейтрофилов к формированию НВЛ выглядит следующим образом:

1. Необходимо выделить нейтрофилы на растворе фикола-верографина (градиент плотности 1,077 -1,105 г/мл) [12]. Собранные нейтрофилы



- 176 дважды отмыть физиологическим раствором натрия хлорида и довести  
177 концентрацию клеток до показателя  $5 \times 10^6$  клеток на 1 мл, добавляя  
178 необходимый для этого объем 1% раствора альбумина в растворе  
179 Хенкса.
- 180 2. В две пробирки типа «Eppendorf» внести по 200 мкл полученной взвеси  
181 клеток. В пробирку №1 добавить 20 мкл физиологического раствора  
182 NaCl, а в пробирку №2 – 0,9% раствор NaCl, содержащий  $2,5 \times 10^9$   
183 бактерий пробиотика на 1 мл раствора. Обе пробирки инкубировать в  
184 течение 30 мин при  $37^\circ\text{C}$ .
- 185 3. После инкубации приготовить препарат «раздавленная капля». На  
186 предметное стекло нанести 7 мкл исследуемой взвеси клеток, добавить  
187 2,5 мкл пропидия йодида в концентрации 0,1 мг/мл и 3,5 мкл  
188 моноклональных антител к CD15, меченых FITC в разведении 0,9%  
189 раствором NaCl – 1:10. Каплю медленно и аккуратно накрыть  
190 покровным стеклом 24x48x0,17мм. Инкубировать препарат на водяной  
191 бане при  $37^\circ\text{C}$  в течение 5 мин.
- 192 4. Препарат исследовать методом люминесцентной микроскопии с  
193 применением комбинации светофильтров, имеющей следующие  
194 характеристики: возбуждение флуоресценции при длине волны 450-  
195 480 нм и эмиссия при длине волны от 515 нм. Визуализировать и  
196 подсчитать абсолютное количество: 1) нитевидных НВЛ; 2)  
197 облаковидных НВЛ; 3) клеток раннего нетоза; 4) активированных  
198 нейтрофилов; 5) интактных нейтрофилов. Рассчитать процентное  
199 отношение каждого из объектов, обнаруженных в препарате  
200 относительно суммы всех люминесцентно-позитивных объектов в  
201 препарате.

202 Разработанный протокол был защищен патентом на изобретение (№  
203 2768152 С1, Российская Федерация).

204 Воспроизводимость методики в настоящей работе оценивали путем  
205 одновременного анализа одного и того же образца отмытых лейкоцитов.  
206 Исследование проводили пять специалистов, в четырех постановках.  
207 Коэффициент вариации между сериями исследований ( $CV_{20}$ ) составил 13,8%  
208 для нитевидных нейтрофильных внеклеточных ловушек (НВЛ) и 15,2% для  
209 облаковидных НВЛ. Полученные значения близки к предельно допустимому  
210 значению коэффициента вариации ( $CV_{20} = 12,5\%$ ), установленный для  
211 близкого по биологическому смыслу показателя «Гранулоциты, подсчет в  
212 крови» в соответствии с Приказом Минздрава РФ от 7 февраля 2000 г. № 45  
213 «О системе мер по повышению качества клинических лабораторных  
214 исследований в учреждениях здравоохранения Российской Федерации».

#### 215 4 Обсуждение

216 Предлагаемый нами метод исследования был применен в различных  
217 группах пациентов, имеющих определенную инфекционную и  
218 неинфекционную патологию. Результаты оценки способности нейтрофилов к  
219 образованию нейтрофильных внеклеточных ловушек (НВЛ) у представителей

обследуемых когорт позволяют сделать вывод о достаточном уровне чувствительности и манифестности регистрируемых с помощью данной методики показателей. В частности, у детей и взрослых, больных туберкулезом, была выявлена повышенная способность нейтрофилов к образованию НВЛ по сравнению со здоровыми добровольцами соответствующих возрастных групп [3, 4, 5]. Следует отметить, что у детей с различными формами туберкулеза формирование НВЛ *ex vivo* имело свои особенности. Так, у пациентов с первичным туберкулезным комплексом нейтрофилы преимущественно образовывали нитевидные НВЛ, тогда как у детей с туберкулезом внутригрудных лимфатических узлов после неспецифической антигенной стимуляции преобладали облаковидные НВЛ [6]. У взрослых пациентов с тяжелым течением туберкулезной инфекции, характеризующимся большей распространенностью инфильтративного процесса и наличием распада, доля облаковидных и нитевидных НВЛ была статистически значимо выше, чем у пациентов с туберкулезом без распада [3]. При этом у взрослых с туберкулезной инфекцией преобладали НВЛ облаковидного типа, которые, по мнению некоторых исследователей, ассоциированы с иммунопатологическими процессами [16].

Изменения в способности нейтрофилов к формированию НВЛ были обнаружены у пациентов с язвенным колитом [2]. Интересные данные были получены при исследовании культур нейтрофилов у детей с аневризмальными костными кистами. Нейтрофилы периферической крови демонстрировали отсутствие или низкую способность к образованию НВЛ, тогда как нейтрофилы, извлеченные из крови, заполняющей костный дефект, активно формировали НВЛ. Это позволяет предположить, что модуляция образования НВЛ может играть важную роль в обеспечении межклеточного взаимодействия и пролиферации клеток, необходимых для закрытия полости аневризмальной костной кисты у детей [13]. Кроме того, исследования выявили высокую степень корреляции между образованием нитевидных НВЛ и концентрацией цитруллинированного гистона H3 ( $r=0,86$ ;  $p=0,0137$ ), определенной методом ИФА в образцах периферической крови [8].

## 5 Заключение

Таким образом, предложенная методика позволяет оценить способность нейтрофилов к формированию внеклеточных ловушек, которая может варьировать в зависимости от типа патологии и степени её тяжести. Анализ особенностей неспецифического клеточного иммунитета, в частности, изменений способности нейтрофилов к процессу нетоза, в сочетании с другими общепринятыми диагностическими методами, может стать технически несложным, эффективным и практически применимым инструментом для мониторинга в динамике заболеваний, прогнозирования их течения и оценки эффективности терапии.

## Благодарности

Исследование выполнено с привлечением средств Государственного задания Минздрава России на выполнение НИР «Технологии

264 пациентоориентированного ведения больных различных возрастных групп  
265 детей и взрослых с латентной туберкулезной инфекцией, лекарственно  
266 чувствительным и лекарственно устойчивым туберкулезом с различным  
267 индексом коморбидности на основе углубленной оценки функциональных  
268 характеристик нейтрофильных лейкоцитов и подбора адъювантов  
269 химиотерапии» (№ ГР 124021500060-1 от 15.02.2024 г.)

## ТАБЛИЦЫ

**Таблица 1.** Способность нейтрофилов к формированию внеклеточных ловушек в зависимости от температуры и времени воздействия стимулятора при внесении в среду с нейтрофилами физиологического раствора хлорида натрия (Гр.1, n=15) или пробиотика (Гр.2, n=15), Me [Q1; Q3].

**Table 1.** Ability of neutrophils to form extracellular traps in dependence on temperature and time of stimulant exposure when physiological sodium chloride solution (Gr.1, n=15) or probiotic (Gr2, n=15) was added to the fluid with neutrophils, Me [Q1; Q3].

| Группа<br>Group                                                                                | Условия<br>Conditions | Интактные<br>нейтрофилы<br>Intact neutrophil                          | Активированные<br>нейтрофилы<br>Activated neutrophil | Клетки раннего<br>нетоза<br>Early netosis cells | Облаковидные<br>НВЛ<br>Cloud-shaped NETs | Нитевидные НВЛ<br>Filamentous NETs                                  |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|-----------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|
| 1                                                                                              | 2                     | 3                                                                     | 4                                                    | 5                                               | 6                                        | 7                                                                   |
| Способность нейтрофилов к формированию внеклеточных ловушек в зависимости от температуры       |                       |                                                                       |                                                      |                                                 |                                          |                                                                     |
| Гр.1<br>Gr.1                                                                                   | 22°C                  | 84,4 [77,8; 86,2]                                                     | 9,6 [5,8; 11,9]                                      | 3,7 [2,1; 5,0]                                  | 1,1 [0,9; 2,0]                           | 2,0 [1,7; 3,0]                                                      |
| Гр.2<br>Gr.2                                                                                   | 22°C                  | 67,2 [55,5; 73,5]<br>$p_{гр1} < 0,0001^*$                             | 20,3 [16,4; 25,3]<br>$p_{гр1} < 0,0001^*$            | 4,4 [3,2; 6,1]                                  | 4,7 [4,0; 7,1]<br>$p_{гр1} < 0,0001^*$   | 2,2 [2,0; 4,0]                                                      |
| Гр.1<br>Gr.1                                                                                   | 37°C                  | 83,1 [77,4; 86,4]                                                     | 9,8 [7,5; 11,8]                                      | 3,1 [2,2; 4,8]                                  | 1,7 [0,9; 2,1]                           | 1,9 [1,7; 2,5]                                                      |
| Гр.2<br>Gr.2                                                                                   | 37°C                  | 62,1 [51,2; 65,2]<br>$p_{гр1} < 0,0001^*$ ;<br>$p_{22-37} = 0,0367^*$ | 20,5 [16,3; 25,8]<br>$p_{гр1} = 0,0001^*$            | 4,4 [3,7; 6,2]<br>$p_{гр1} = 0,0367^*$          | 5,1 [4,3; 7,2]<br>$p_{гр1} < 0,0001^*$   | 8,6 [7,4; 10,1]<br>$p_{гр1} < 0,0001^*$ ;<br>$p_{22-37} < 0,0001^*$ |
| Способность нейтрофилов к формированию внеклеточных ловушек в зависимости от времени инкубации |                       |                                                                       |                                                      |                                                 |                                          |                                                                     |
| Гр.1<br>Gr.1                                                                                   | 5 мин<br>5 min        | 83,1 [77,4; 86,3]                                                     | 9,9 [7,8; 11,9]                                      | 3,0 [2,3; 5,0]                                  | 2,0 [0,8; 2,8]                           | 2,0 [1,7; 2,2]                                                      |
| Гр.2<br>Gr.2                                                                                   | 5 мин<br>5 min        | 82,3 [81,4; 84,4]                                                     | 10,1 [9,9; 12,0]                                     | 3,1 [1,8; 5,0]                                  | 1,8 [1,1; 2,1]                           | 2,1 [1,7; 3,2]                                                      |

|              |                  |                                                                                                    |                                                                                                    |                                                                                                 |                                                                                                 |                                                                                                  |
|--------------|------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Гр.1<br>Gr.1 | 15 мин<br>15 min | 82,3 [77,2; 86,7]                                                                                  | 9,8 [7,4; 11,8]                                                                                    | 3,0 [2,2; 4,7]                                                                                  | 1,8 [0,8; 2,3]                                                                                  | 2,2 [1,7; 2,4]                                                                                   |
| 1            | 2                | 3                                                                                                  | 4                                                                                                  | 5                                                                                               | 6                                                                                               | 7                                                                                                |
| Гр.2<br>Gr.2 | 15 мин<br>15 min | 80,8 [78,1; 82,6]                                                                                  | 10,1 [9,8; 11,9]                                                                                   | 2,7 [2,1; 5,0]                                                                                  | 1,8 [0,9; 2,3]                                                                                  | 4,1 [3,1; 5,1]<br>$p_{Гр1} = 0,0014^*$ ;<br>$p_{5'} = 0,0023^{**}$                               |
| Гр.1<br>Gr.1 | 30 мин<br>30 min | 82,6 [76,8; 86,7]                                                                                  | 10,2 [7,6; 11,9]                                                                                   | 3,2 [2,2; 4,6]                                                                                  | 1,6 [0,9; 2,1]                                                                                  | 2,0 [1,7; 2,1]                                                                                   |
| Гр.2<br>Gr.2 | 30 мин<br>30 min | 62,4 [51,5; 65,1]<br>$p_{Гр1} < 0,0001^*$ ;<br>$p_{5'} < 0,0001^{**}$ ;<br>$p_{15'} < 0,0001^{**}$ | 20,1 [15,9; 25,5]<br>$p_{Гр1} = 0,0002^*$ ;<br>$p_{5'} < 0,0001^{**}$ ;<br>$p_{15'} < 0,0001^{**}$ | 4,6 [3,4; 6,3]<br>$p_{Гр1} = 0,0453^*$ ;<br>$p_{5'} = 0,0453^{**}$ ;<br>$p_{15'} = 0,0367^{**}$ | 5,0 [4,4; 7,1]<br>$p_{Гр1} < 0,0001^*$ ;<br>$p_{5'} < 0,0001^{**}$ ;<br>$p_{15'} < 0,0001^{**}$ | 8,8 [7,3;] 10,5<br>$p_{Гр1} < 0,0001^*$ ;<br>$p_{5'} < 0,0001^{**}$ ;<br>$p_{15'} < 0,0001^{**}$ |
| Гр.1<br>Gr.1 | 45 мин<br>45 min | 84,3 [77,7; 85,9]                                                                                  | 9,0 [7,2; 13,0]                                                                                    | 3,3 [2,0; 5,0]                                                                                  | 1,3 [0,9; 2,2]                                                                                  | 1,8 [1,3; 3,3]                                                                                   |
| Гр.2<br>Gr.2 | 45 мин<br>45 min | 62,2 [51,1; 65,0]<br>$p_{Гр1} < 0,0001^*$ ;<br>$p_{5'} < 0,0001^{**}$ ;<br>$p_{15'} < 0,0001^{**}$ | 20,1 [16,3; 25,6]<br>$p_{Гр1} < 0,0001^*$ ;<br>$p_{5'} < 0,0001^{**}$ ;<br>$p_{15'} < 0,0001^{**}$ | 4,5 [3,7; 6,3]<br>$p_{5'} = 0,0408^{**}$ ;<br>$p_{15'} = 0,0408^{**}$                           | 5,1 [3,9; 7,0]<br>$p_{Гр1} < 0,0001^*$ ;<br>$p_{5'} < 0,0001^{**}$ ;<br>$p_{15'} < 0,0001^{**}$ | 8,7 [6,9; 10,6]<br>$p_{Гр1} < 0,0001^*$ ;<br>$p_{5'} < 0,0001^{**}$ ;<br>$p_{15'} < 0,0001^{**}$ |
| Гр.1<br>Gr.1 | 60 мин<br>60 min | 84,1 [79,3; 86,9]                                                                                  | 9,5 [7,3; 14,8]                                                                                    | 3,2 [2,2; 3,8]                                                                                  | 1,2 [0,8; 1,8]                                                                                  | 1,6 [1,2; 2,0]                                                                                   |
| Гр.2<br>Gr.2 | 60 мин<br>60 min | 64,0 [50,8; 68,8]<br>$p_{Гр1} < 0,0001^*$ ;<br>$p_{5'} < 0,0001^{**}$ ;<br>$p_{15'} < 0,0001^{**}$ | 21,4 [10,3; 30,2]<br>$p_{Гр1} = 0,0027^*$ ;<br>$p_{5'} = 0,0032^{**}$ ;<br>$p_{15'} = 0,0032^{**}$ | 4,3 [1,8; 6,2]                                                                                  | 5,0 [4,0; 7,3]<br>$p_{Гр1} < 0,0001^*$ ;<br>$p_{5'} < 0,0001^{**}$ ;<br>$p_{15'} < 0,0001^{**}$ | 7,7 [6,8;] 10,0<br>$p_{Гр1} < 0,0001^*$ ;<br>$p_{5'} < 0,0001^{**}$ ;<br>$p_{15'} < 0,0001^{**}$ |

**Примечание:** таблица составлена авторами; \* – по U-критерию Манна-Уитни; \*\* – по критерию Вилкоксона.  
Сокращения: НВЛ – нейтрофильные внеклеточные ловушки;  $p_{Гр1}$  – уровень значимости  $p$  по отношению к группе 1 при

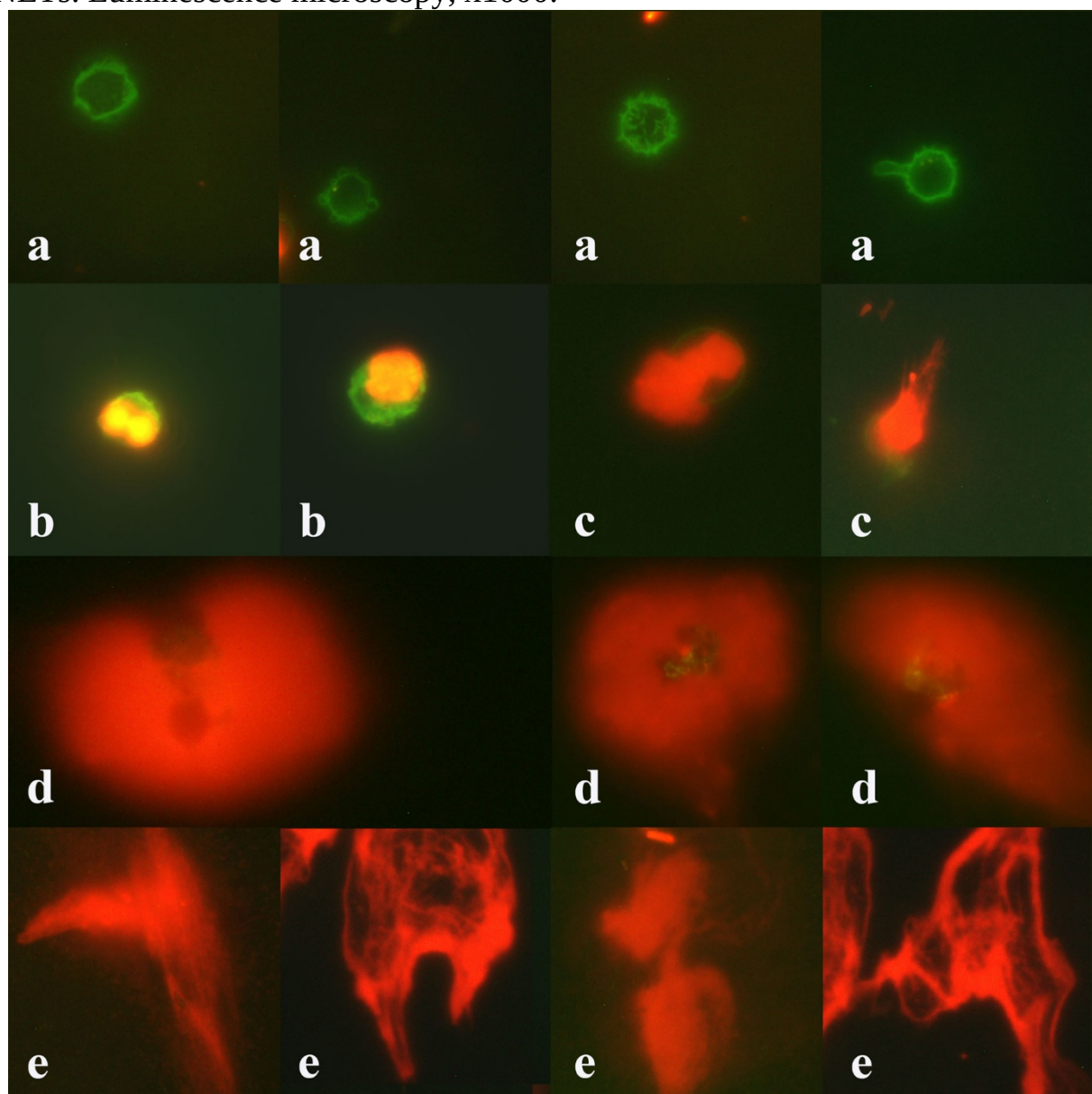
тех же условиях;  $p_{22-37}$  – уровень значимости  $p$  по отношению к аналогичной группе при 22°C;  $p_{5'}$ ,  $p_{15'}$  – уровень значимости  $p$  по отношению к времени инкубации 5 и 15 минут, соответственно.

**Note:** the table was compiled by the authors; \* - by the Mann–Whitney U test; \*\* - by the Wilcoxon test. Abbreviations: NET, neutrophil extracellular traps;  $p_{гр1}$ ,  $p$  significance level relative to group 1 under the same conditions;  $p_{22-37}$ ,  $p$  significance level relative to the same group at 22°C;  $p_{5'}$ ,  $p_{15'}$  –  $p$  significance level relative to incubation times of 5 and 15 minutes, respectively.

## РИСУНКИ

**Рисунок 1.** Разновидности люминесцентно-позитивных объектов, определяемых в микропрепарате после воздействия стимулятора на нейтрофильные лейкоциты: а – интактные нейтрофилы; б – активированные нейтрофилы; с – клетки раннего нетоза; d – облаковидные НВЛ; е – нитевидные НВЛ. Люминесцентная микроскопия, x1000.

**Figure 1.** Types of luminescence-positive objects determined in a micro preparation after stimulant exposure of neutrophil leukocytes: a – intact neutrophils; b – activated neutrophils; c – early netosis cells; d – cloud-shaped NETs; e – filamentous NETs. Luminescence microscopy, x1000.



## ТИТУЛЬНЫЙ ЛИСТ\_МЕТАДАННЫЕ

### Блок 1. Информация об авторе ответственном за переписку

**Новиков Дмитрий Георгиевич**, кандидат медицинских наук, доцент, доцент кафедры клинической лабораторной диагностики ДПО, заведующий ЦНИЛ. Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Омский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации; адрес: 644099, Омская область, г. Омск, ул. Ленина, 12; телефон: 8(906)991-80-88; e-mail: [novikov.dm.omsk@gmail.com](mailto:novikov.dm.omsk@gmail.com)

**Dmitry Georgievich Novikov**, Candidate of Medical Sciences, Associate Professor, Associate Professor of the Department of Clinical Laboratory Diagnostics of Additional Professional Education, Head of the Central Scientific Research Laboratory (CSRL); Omsk State Medical University; address: ul. Lenina, 12, Omsk 644099, Russia; telephone: 8(906)991-80-88; e-mail: [novikov.dm.omsk@gmail.com](mailto:novikov.dm.omsk@gmail.com)

### Блок 2. Информация об авторах

**Золотов А. Н.**, кандидат медицинских наук, доцент, старший научный сотрудник ЦНИЛ, доцент кафедры патофизиологии;  
**Zolotov A. N.**, Candidate of Medical Sciences, Associate Professor, Senior Researcher of the Central Scientific Research Laboratory (CSRL), Associate Professor of the Department of Pathophysiology;

**Савочкина А. Ю.**, доктор медицинских наук, доцент, директор НИИ иммунологии, заведующий кафедрой микробиологии, вирусологии, иммунологии;  
**Savochkina A. Y.**, Doctor of Medical Sciences, Associate Professor, Director of the Research Institute of Immunology, Head of the Department of Microbiology, Virology, Immunology;

**Индутный А. В.**, доктор медицинских наук, доцент, заведующий кафедрой клинической лабораторной диагностики ДПО;  
**Indutny A. V.**, Doctor of Medical Sciences, Associate Professor, Head of the Department of Clinical Laboratory Diagnostics of Additional Professional Education;

**Корпачева О. В.**, доктор медицинских наук, профессор, проректор по научно-исследовательской работе, заведующий кафедрой патофизиологии;  
**Korpacheva O. V.**, Doctor of Medical Sciences, Professor, Vice-Rector for Research, Head of the Department of Pathophysiology;



**Кириченко Н. А.**, ассистент кафедры клинической лабораторной диагностики ДПО, младший научный сотрудник ЦНИЛ;

**Kirichenko N. A.**, Assistant of the Department of Clinical Laboratory Diagnostics of Additional Professional Education, Associate Researcher of the Central Scientific Research Laboratory (CSRL).

**Блок 3. Метаданные статьи**

ОПЫТ РАЗРАБОТКИ И ПРИМЕНЕНИЯ МЕТОДА ИССЛЕДОВАНИЯ  
СПОСОБНОСТИ НЕЙТРОФИЛОВ К ФОРМИРОВАНИЮ  
ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ЛОВУШЕК

EXPERIENCE IN THE DEVELOPMENT AND APPLICATION OF A METHOD FOR  
INVESTIGATING THE ABILITY OF NEUTROPHILS TO FORM EXTRACELLULAR  
TRAPS

**Сокращенное название статьи для верхнего колонтитула:**

СПОСОБНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ К НЕТОЗУ

ABILITY OF NEUTROPHILS TO NETOSIS

**Ключевые слова:** нейтрофилы, нейтрофильные внеклеточные ловушки, нетоз, метод исследования, способность нейтрофилов к формированию внеклеточных ловушек, люминесцентная микроскопия.

**Keywords:** neutrophils, neutrophil extracellular traps, netosis, research method, ability of neutrophils to form extracellular traps, luminescence microscopy.

Оригинальные статьи.

Количество страниц текста – 6,

Количество таблиц – 1,

Количество рисунков – 1.

07.02.2025

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

| Порядковый номер ссылки | Авторы, название публикации и источника, где она опубликована, выходные данные                                                                                                                                                           | ФИО, название публикации и источника на английском                                                                                                                                                                                       | Полный интернет-адрес (URL) цитируемой статьи или ее doi. |
|-------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| 1.                      | Кассина Д.В., Василенко И.А., Гурьев А.С., Волков А.Ю., Метелин В.Б. Нейтрофильные внеклеточные ловушки: значение для диагностики и прогноза COVID-19 // Альманах клинической медицины. – 2020. – №48. – С. 43–50.                       | Kassina D.V., Vasilenko I.A., Gur'ev A.S., Volkov A.Yu., Metelin V.B. Neutrophil extracellular traps: diagnostic and prognostic value in COVID-19. Almanac of clinical medicine, 2020, no. 48, pp. 43–50.                                | DOI 10.18786/2072-0505-2020-48-029                        |
| 2.                      | Ливзан М.А., Бикбавова Г.Р., Новиков Д.Г., Золотов А.Н., Кириченко Н.А., Пахтусова П.О., Михалева Л.В. Оценка нетозобразующей способности нейтрофилов у пациентов с язвенным колитом // Медицинский алфавит. – 2023. – № 18. – С. 23-27. | Livzan M.A., Bikbavova G.R., Novikov D.G., Zolotov A.N., Kirichenko N.A., Pakhtusova P.O., Mikhaleva L.V. Assessment of neutrophil nets-forming activity in patients with ulcerative colitis. Medical alphabet, 2023, no. 18, pp. 23-27. | DOI 10.33667/2078-5631-2023-18-23-27                      |

|    |                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                         |
|----|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|
| 3. | Мордык А.В., Золотов А.Н., Новиков Д.Г., Кириченко Н.А., Пахтусова П.О., Птухин А.О. Нетозформирующая способность нейтрофилов у пациентов с ограниченным и распространенным туберкулезным процессом // Туберкулез и болезни легких. – 2023. – Т. 101, № 3. – С. 78-86.                       | Mordyk A.V., Zolotov A.N., Novikov D.G., Kirichenko N.A., Pakhtusova P.O., Ptukhin A.O. Netosis-forming ability of neutrophils in patients with limited and disseminated tuberculous lesions. Tuberculosis and lung diseases, 2023, Vol. 101, no. 3, pp. 78-86.                                             | DOI 10.58838/2075-1230-2023-101-3-78-86 |
| 4. | Мордык А.В., Золотов А.Н., Новиков Д.Г., Романова М.А., Индутный А.В., Кириченко Н.А., Птухин А.О. Возрастные особенности формирования внеклеточных ловушек нейтрофилов у здоровых лиц и больных туберкулёзом // Вестник современной клинической медицины. – 2023. – Т. 16, № 6. – С. 37-45. | Mordyk A.V., Zolotov A.N., Novikov D.G., Romanova M.A., Indutny A.V., Kirichenko N.A., Ptukhin A.O. Age-related differences of forming neutrophil extracellular traps in healthy individuals and in tuberculosis patients. The bulletin of contemporary clinical medicine, 2023, Vol. 16, no. 6. pp. 37-45. | DOI 10.20969/VSKM.2023.16(6).37-45      |
| 5. | Мордык А.В., Золотов А.Н., Новиков Д.Г., Романова М.А., Кириченко Н.А., Птухин А.О. Нетозобразующая способность                                                                                                                                                                              | Mordyk A.V., Zolotov A.N., Novikov D.G., Romanova M.A., Kirichenko N.A., Ptukhin A.O. Netosis-forming ability of                                                                                                                                                                                            | DOI 10.20953/1817-7646-2023-5-7-12      |

|    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                     |
|----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|
|    | нейтрофилов у детей с латентной туберкулезной инфекцией при положительной пробе с аллергеном туберкулезным рекомбинантным // Вопросы практической педиатрии. – 2023. – Т. 18, № 5. – С. 7–12.                                                                                                                                      | neutrophils in children with latent tuberculosis infection with the positive test with a tuberculosis recombinant allergen. Clinical practice in pediatrics, 2023, Vol. 18, no. 5, pp. 7-12.                                                                                                                       |                                     |
| 6. | Мордык А.В., Новиков Д.Г., Золотов А.Н., Романова М.А., Кириченко Н.А., Птухин А.О., Самусева Н.Л. Способность нейтрофилов к формированию внеклеточных ловушек у детей с первичным туберкулезным комплексом и туберкулезом внутригрудных лимфатических узлов. // Вопросы практической педиатрии. – 2024. – Т. 19, № 5. – С. 46–53. | Mordyk A.V., Novikov D.G., Zolotov A.N., Romanova M.A., Kirichenko N.A., Ptukhin A.O., Samuseva N.L. Ability of neutrophils to form extracellular traps in children with primary tuberculosis complex and intrathoracic lymph node tuberculosis. Clinical practice in pediatrics, 2024, Vol. 19, no. 5, pp. 46-53. | DOI 10.20953/1817-7646-2024-5-46-53 |
| 7. | Насонов Е.Л., Авдеева А.С., Решетняк Т.М., Алексанкин А.П., Рубцов Ю.П. Роль нетоза в патогенезе иммуновоспалительных ревматических заболеваний //                                                                                                                                                                                 | Nasonov E.L., Avdeeva A.S., Reshetnyak T.M., Aleksankin A.P., Rubtsov Yu.P. The role of NETosis in the pathogenesis of immunoinflammatory rheumatic diseases. Rheumatology Science and                                                                                                                             | DOI 10.47360/1995-4484-2023-513-530 |

|    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                                                                                                                                                                                        |                                      |
|----|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|
|    | Научно-практическая ревматология. – 2023. – Т. 61, №5. – С. 513-530.                                                                                                                                                                                                                                           | Practice, 2023, Vol. 61, no. 5, pp. 513-530.                                                                                                                                                                                                           |                                      |
| 8. | Новиков Д.Г., Золотов А.Н., Индутный А.В., Мордык А.В., Кириченко Н.А., Романова М.А., Птухин А.О. Характеристика продукции нейтрофильных внеклеточных ловушек и концентрации цитруллинированного гистона H3 у детей, больных туберкулезом. // Бюллетень сибирской медицины. –2024. – Т. 23, № 4. – С. 95-104. | Novikov D.G., Zolotov A.N., Indutny A.V., Mordyk A.V., Kirichenko N.A., Romanova M.A., Ptukhin A.O. NETs production and citrullinated histone H3 level in children with tuberculosis. Bulletin of Siberian medicine, 2024, Vol. 23, no. 4, pp. 95-104. | DOI 10.20538/1682-0363-2024-4-95-104 |
| 9. | Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. Science, 2004, Vol. 303, no. 5663, pp. 1532-1535.                                                                                                                | –                                                                                                                                                                                                                                                      | DOI 10.1126/science.1092385          |
| 10 | Inozemtsev V, Sergunova V, Vorobjeva N, Kozlova E, Sherstyukova E, Lyapunova S,                                                                                                                                                                                                                                | –                                                                                                                                                                                                                                                      | DOI 10.3390/ijms241512355            |

|     |                                                                                                                                                                                                                                                                  |   |                              |
|-----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---|------------------------------|
|     | Chernysh A. Stages of NETosis Development upon Stimulation of Neutrophils with Activators of Different Types. Int J Mol Sci, 2023, Vol. 24, no. 15, pp. 12355.                                                                                                   |   |                              |
| 11. | Konig MF, Andrade F. A Critical Reappraisal of Neutrophil Extracellular Traps and NETosis Mimics Based on Differential Requirements for Protein Citrullination. Front Immunol., 2016, Vol. 7, pp. 461.                                                           | – | DOI 10.3389/fimmu.2016.00461 |
| 12. | Oh H, Siano B, Diamond S. Neutrophil isolation protocol. J Vis Exp., 2008, no. 17. pp. 745.                                                                                                                                                                      | – | DOI 10.3791/745              |
| 13. | Pisklakov A.V., Novikov D.G., Zolotov A.N., Palianov K.V., Korobeinikov M.M., Ponomarev V.I., Kalinichev A.G., Lysov A.V. Netosis as a process involved in the consolidation of aneurysmal bone cysts in children using hemostatic agents. Medical News of North | – | DOI 10.14300/mnnc.2024.19025 |

|     |                                                                                                                                                                                                                                   |   |                              |
|-----|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---|------------------------------|
|     | Caucasus, 2024, Vol. 19, no. 2, pp. 111-116.                                                                                                                                                                                      |   |                              |
| 14. | Sergunova V, Inozemtsev V, Vorobjeva N, Kozlova E, Sherstyukova E, Lyapunova S, Chernysh A. Morphology of Neutrophils during Their Activation and NETosis: Atomic Force Microscopy Study. Cells, 2023, Vol. 12, no. 17, pp. 2199. | – | DOI 10.3390/cells12172199    |
| 15. | Stoimenou M, Tzoros G, Skendros P, Chrysanthopoulou A. Methods for the Assessment of NET Formation: From Neutrophil Biology to Translational Research. Int J Mol Sci., 2022, Vol. 23, no. 24. pp. 15823.                          | – | DOI 10.3390/ijms232415823    |
| 16. | Yousefi S, Simon HU. NETosis - Does It Really Represent Nature's "Suicide Bomber"? Front Immunol., 2016, Vol. 7, pp. 328.                                                                                                         | – | DOI 10.3389/fimmu.2016.00328 |