

А.Л.Кравцов, С.Н.Клюева, Т.Н.Щуковская, С.А.Бугоркова

## ЭФФЕКТ ИММУНОМОДУЛЯТОРОВ И ПРОТИВОТУЛЯРЕМИЙНОЙ ВАКЦИНАЦИИ НА АПОПТОЗ И ЛИЗИС СПЛЕНОЦИТОВ, ВЗАИМОДЕЙСТВУЮЩИХ *IN VITRO* С ТУЛЯРИНОМ

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

**Цель работы.** Оценка влияния иммуномодуляторов на интенсивность пост-апоптотического лизиса лейкоцитов сенсibilизированного организма в присутствии специфических антигенов туляремийного микроба в условиях *in vitro*. **Материалы и методы.** В работе использовался метод проточной цитофлуориметрии для определения относительного содержания пролиферирующих и апоптотических спленоцитов мышей, иммунизированных против туляремии на фоне иммуномодуляции. **Результаты и выводы.** В работе получена информация, которая согласуется с современными данными о массивном апоптозе и пост-апоптотическом аутолизисе (вторичном некрозе) лейкоцитов при туляремийной инфекции. Учитывая важную роль лейкоцитолита в развитии системной воспалительной реакции, для снижения реактогенных свойств живой туляремийной вакцины может быть перспективно использование иммуномодуляторов, подавляющих апоптоз макрофагов и лизис погибших лейкоцитов при взаимодействии с антигенами *Francisella tularensis*.

**Ключевые слова:** *Francisella tularensis*, живая туляремийная вакцина, апоптоз и вторичный некроз лейкоцитов, полиоксидоний, даларгин, проточная цитометрия.

Корреспондирующий автор: Кравцов Александр Леонидович, e-mail: rusrap1@microbe.ru.

A.L.Kravtsov, S.N.Klyueva, T.N.Shchukovskaya, S.A.Bugorkova

## Effect of Immunomodulators and Anti-Tularemia Vaccination on Apoptosis and Lysis of Splenocytes Interacting with Tulyarin *in vitro*

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

**Objective** of the study is to evaluate the effect of immunomodulators on the intensity of the post-apoptotic lysis of sensitized organism leukocytes in the presence of specific antigens of tularemia microbe *in vitro*. **Materials and methods.** Flow cytometry method was used to determine the relative content of apoptotic and proliferating splenocytes obtained from mice, immunized against tularemia against the background of immunomodulation. **Results and conclusions.** Obtained is the evidence that is consistent with modern data on the massive leukocyte apoptosis and post-apoptotic leukocyte autolysis (secondary necrosis) in case of tularemia infection. Given the important role of secondary necrosis in the systemic inflammatory response development, the use of immunomodulators suppressing macrophage apoptosis and dead leukocyte lysis, emerging in the course of interaction with *Francisella tularensis* antigens, may be promising in order to reduce the live tularemia vaccine reactogenicity.

**Keywords:** *Francisella tularensis*, live tularemia vaccine, apoptosis and secondary necrosis of leukocytes, polyoxidonium, dalargin, flow cytometry.

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

**Corresponding author:** Alexander L. Kravtsov, e-mail: rusrap1@microbe.ru.

**Citation:** Kravtsov A.L., Klyueva S.N., Shchukovskaya T.N., Bugorkova S.A. Effect of Immunomodulators and Anti-Tularemia Vaccination on Apoptosis and Lysis of Splenocytes Interacting with Tulyarin *in vitro*. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2017; 3:90–94. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2017-3-90-94

При диагностике туляремии у человека, а также при оценке напряженности иммунитета у лиц, вакцинированных против туляремии, перспективно использование реакции лейкоцитолита, основанной на явлении разрушения лейкоцитов сенсibilизированного организма под действием специфического антигена в условиях *in vitro*. Результат реакции оценивается в настоящее время субъективно путем визуального подсчета лейкоцитов в камере Горяева. Разрушенные клеточные элементы при этом не учитывают [4].

Молекулярные механизмы, лежащие в основе феномена лейкоцитолита, недостаточно изучены, и анализ литературы за последнее десятилетие свидетельствует, что при туляремии лизируются лейко-

циты, которые, взаимодействуя с бактериальными антигенами и токсинами, гибнут по типу индуцированного апоптоза, но в условиях массивной гибели и снижения функциональной активности макрофагов своевременно не удаляются из организма с помощью фагоцитоза. Такие клетки подвергаются *in vivo* пост-апоптотическому аутолизису (вторичному некрозу), что приводит к высвобождению в ткани организма опасных аутологических молекул (DAMPs – damage associated molecular patterns), способных запускать системную воспалительную реакцию. Считается, что вторичный некроз лейкоцитов (лейкоцитолит) играет важную роль в патогенезе туляремии и других бактериальных инфекций с массивной гибелью лейкоцитов по типу апоптоза [9].

При отсутствии или недостаточном количестве функционально активных клеток «мусорщиков» (тканевых макрофагов) апоптоз всегда завершается вторичным некрозом. Именно поэтому в условиях *in vitro* лейкоцитоллиз неизбежен, если механизм гибели лейкоцитов по типу апоптоза уже запущен [10]. Модуляторы функциональной активности клеток врожденного иммунитета (фагоцитов), такие как даларгин (ДА) [2] или полиоксидоний (ПО) [3], должны влиять, согласно нашей гипотезе, на интенсивность пост-апоптотического лизиса лейкоцитов сенсibilизированного организма в присутствии специфических антигенов туляремийного микроба в условиях *in vitro*.

Целью настоящей работы явилось экспериментальное подтверждение данной гипотезы на модели взаимодействия с тулярином спленоцитов мышей, привитых живой туляремийной вакциной.

### Материалы и методы

Вакцинный штамм *F. tularensis* 15 НИИЭГ, полученный из «Государственной коллекции патогенных бактерий» ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб», выращивали на FT-агаре с глюкозо-витаминной добавкой (ФБУН ГНЦ ПМБ) при температуре 37 °С в течение 48 ч. Взвеси живых микробных клеток готовили в стерильном 0,9 % растворе натрия хлорида, рН 7,2, по стандартному образцу мутности ОСО-42-28-85П 10 единиц, эквивалентному  $5 \cdot 10^9$  м.к./мл.

Мышей линии Balb/c массой 18–20 г подкожно иммунизировали *F. tularensis* 15 НИИЭГ в дозе  $10^4$  м.к., а также в сочетании с ПО или ДА. Иммуномодуляторы (ПО фирмы ООО «НПО Петровакс Фарм», Россия и ДА ФГУ «РКНПК», Россия) вводили животным подкожно за 60 мин до вакцинации в дозе 4 и 2 мкг соответственно. Контрольную группу составили интактные мыши. Всего в работе использовано 48 животных (по 12 особей в каждой группе).

Все манипуляции на животных осуществляли с одобрения комитета по биоэтике Российского научно-исследовательского противочумного института «Микроб» (протокол № 1 от 30.09.2015 г.).

На 21-е сутки иммуногенеза мышей умерщвляли декапитацией, забирали селезенку и общепринятым методом выделяли спленоциты (СП). В мазках, окрашенных по Романовскому-Гимзе, определяли относительное содержание лимфоцитов и фагоцитов (селезеночных макрофагов). Макрофаги селезенки (МС) выделяли из суммарной фракции СП путем адгезии на пластиковых чашках Петри, инкубируемых в течение 2 ч при 37 °С в CO<sub>2</sub>-инкубаторе. Жизнеспособность СП и макрофагов в момент их выделения подтверждали в тесте с трипановым синим [6].

В опытах *in vitro* использовали аллерген туляремийный жидкий для накожного применения (коммерческий препарат тулярин), представляющий

собой взвесь туляремийных микробов вакцинного штамма *F. tularensis* линии 15 НИИЭГ, убитых нагреванием в 0,9 % растворе хлорида натрия (ФГУН «НПО «Микроген», Омск). Исследуемые взвеси СП и МС каждой группы мышей делили на четыре части, в которые добавляли соответственно физиологический раствор (контроль), тулярин в количестве  $5 \cdot 10^8$  м.к./мл, тулярин в сочетании с ПО или ДА. Рабочие концентрации ПО и ДА для экспериментов *in vitro* выбирали по литературным данным [2, 3]: 100 и 2 мкг/мл соответственно. Клетки инкубировали в течение 24 ч при 37 °С во влажной атмосфере CO<sub>2</sub>.

Методом проточной цитофлуориметрии исследовали до и после инкубации характер распределения отдельных клеток по клеточному циклу для определения относительного содержания (в %) пролиферирующих и апоптотических клеток, несущих соответственно более 2С ДНК (стадии S+G2+М клеточного цикла) и менее 2С ДНК на клетку [5]. Для этого клетки осаждали центрифугированием (400 g, 10 мин), фиксировали 70 % этанолом, окрашивали раствором, содержащим 50 мкг/мл пропидия йодида (MP Biomedicals, LLC, Germany), 100 мкг/мл РНКазы (Thermo Scientific, Lithuania-Литва), 0,1 % Triton X-100 (MP Biomedicals, LLC, Germany) [7] и анализировали на проточном цитометре CyAn ADP (Дания).

Часть СП и СМ подвергали гипотоническому шоку в деионизованной воде с восстановлением солевого баланса 10-кратным раствором Хенкса (МПБП, Россия) через 10 с, чтобы обеспечить лизис эритроцитов при сохранении стабильности мембран мышечных спленоцитов [1]. Интенсивного лизиса СП добивались путем увеличивая срока пребывания клеток в воде до 18 с. После данной процедуры клетки и клеточный дебрис осаждали центрифугированием, фиксировали этанолом и после окраски по ДНК исследовали на проточном цитометре.

Результаты анализа обрабатывали статистически, определяя достоверность различий по t-критерию Стьюдента.

### Результаты и обсуждение

Результаты контрольных экспериментов с лейкоцитами, подвергнутыми гипотоническому шоку, показали способность проточной цитофлуориметрии регистрировать разрушенные клеточные элементы по интенсивности их ДНК-флуоресценции. Неповрежденные диплоидные клетки, обладающие в норме одинаково интенсивной ДНК-флуоресценцией (рис. 1, А), сохраняли свою целостность после 10 с пребывания в условиях гипотонического шока. Состояние их ядер не изменялось (рис. 1, Б). При увеличении срока пребывания клеток в воде до 18 с лейкоциты и их ядра разрушались. В результате (рис. 1, В), в более чувствительном логарифмическом режиме ДНК-анализа учитывались сигналы ДНК-флуоресценции, как от оставшихся неповрежденных

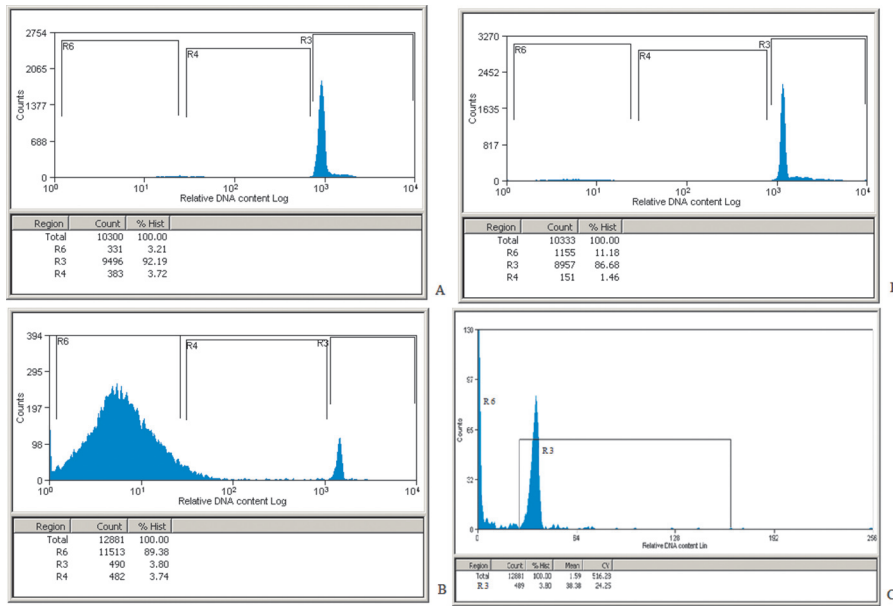


Рис. 1. Результаты цитофлуориметрического ДНК-анализа спленоцитов контрольного животного, подвергнутого в деионизованной воде гипотоническому шоку различной длительности:

A – контроль (без гипотонического шока); B – гипотонический шок в течение 10 с; B – гипотонический шок в течение 18 с; C – гипотонический шок в течение 18 с в линейном режиме ДНК-анализа; A, B, B – получены в логарифмическом режиме ДНК-анализа; R3, R4, R6 – области гистограмм, соответствующие целым, неповрежденным апоптотическим и лизированным клеткам

диплоидных СП (область R3 на ДНК-гистограмме), так и от разрушенных (лизированных) клеток (область R6). При ДНК-анализе того же образца в линейном режиме с относительно небольшим числом каналов измерения невозможно было идентифицировать пик на ДНК-гистограмме, характерный для лизированных СП (рис. 1, Г), поскольку слабые импульсы ДНК-флуоресценции от разрушенных клеточных ядер не дифференцировались от фонового свечения красителя.

Полученные в логарифмическом режиме ДНК-гистограммы (рис. 2) наглядно иллюстрируют различную реакцию лейкоцитов иммунного и не иммунного организма на контакт с тулярином в условиях *in vitro*. Через 24 ч инкубации в популяциях СП и МС, выделенных из иммунного организма через три недели после иммунизации мышей живой туляремийной вакциной, клетки подвергаются в присутствии тулярина значительно более интенсивному лизису (рис. 2, Б и Г), чем в популяциях СП и МС, получен-

ных от контрольных животных (рис. 2, А и В).

В таблице представлены статистически обработанные экспериментальные данные, которые свидетельствуют, что, когда эффект исследуемых иммуномодуляторов (*in vivo* и *in vitro*) отсутствовал, соблюдалась прямая корреляция между интенсивностью лизиса СП мышей через сутки взаимодействия их с тулярином в условиях *in vitro* и интенсивностью гибели МС по типу апоптоза *in vivo* к моменту начала процесса инкубации. На 21-е сутки после иммунизации мышей живыми клетками вакцинного штамма туляремийного микроба доля МС в апоптозе увеличилась относительно нормы в 2,5 раза (в среднем с 10,3 до 24,9 %,  $p < 0,05$ ). Поэтому одной из вероятных причин более интенсивного лизиса МС, выделенных именно из иммунного организма, может быть попадание в условия *in vitro* для взаимодействия с тулярином значительно большего числа клеток с уже запущенным *in vivo* механизмом гибели.

Кроме того, нами замечено, что при исследова-

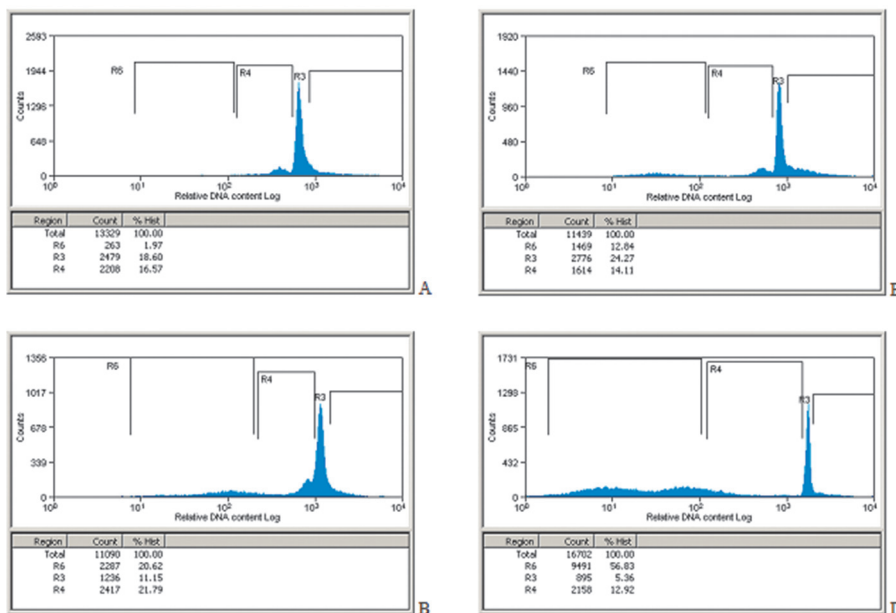


Рис. 2. Цитофлуориметрические ДНК-гистограммы, иллюстрирующие влияние противотуляремийной вакцинации на лизис спленоцитов и макрофагов селезенки, взаимодействующих *in vitro* с тулярином:

A, B – спленоциты контрольного и иммунного животного соответственно; B, Г – макрофаги селезенки контрольного и иммунного животного соответственно; R3, R4, R6 – области гистограмм, соответствующие пролиферирующим, апоптотическим и лизированным клеткам

нии СП вакцинированных животных значения показателя клеточной пролиферативной активности были ниже в пробах с тулярином, где регистрировался повышенный уровень лейкоцитоза, чем в пробах без тулярина (таблица). Проллиферирующие лейкоциты, находящиеся на стадиях репликации ДНК, предмитоза и митоза, обладали более высокой чувствительностью к внешнему цитотоксическому воздействию. Более интенсивным аутолизом на повторный контакт с инфекционным агентом (или его антигенами) могут также отвечать лейкоциты сенсibilизированного организма, формирующие во внеклеточном пространстве бактерицидные ДНК-сети (внеклеточные ловушки), необходимые для существенного повышения эффективности киллинга бактерий в условиях *in vivo* и *in vitro* [8].

Иммуномодуляторы, добавленные к СП или МС совместно с тулярином, оказывали влияние на интенсивность реакции лейкоцитоза (таблица), так как в присутствии ПО или ДА тулярин фактически

утрачивал способность к запуску процесса лизиса СП и МС иммунного организма. В случае, когда ПО применялся *in vivo* при противотуляремийной вакцинации (группа *F. tularensis* + ПО), отмечали *in vitro* повышение уровня клеточной пролиферативной активности при существенном снижении интенсивности лизиса СП в присутствии тулярина. Введение ДА за 60 мин до противотуляремийной вакцинации (группа *F. tularensis* + ДА) активировало пролиферацию СП. В присутствии тулярина, а также тулярина с ДА, СП подвергались апоптозу, но фактически не лизировались.

Таким образом, полученная в работе информация согласуется с современными представлениями о важной роли индуцируемого бактериями апоптоза в развитии при туляремии процесса лейкоцитоза. Противотуляремийная вакцинация активировала в организме животных апоптоз селезеночных макрофагов и в результате стимулировала процесс пост-апоптотического лизиса спленоцитов, взаимодей-

**Влияние иммуномодуляторов и противотуляремийной вакцинации на показатели лизиса, апоптоза и пролиферации спленоцитов (СП) и макрофагов селезенки (МС) при взаимодействии *in vitro* с тулярином**

Группа животных	Клетки	Индуктор	N <sub>лиз</sub>	N <sub>A</sub>	N <sub>П</sub>	N <sub>A</sub> <sup>0</sup> /N <sub>П</sub> <sup>0</sup>
Контроль	СП	ФР	3,5±0,3	20,8±0,6	22,20±1,0	3,9±0,7/8,6±0,5
		Тулярин	3,0±0,6	19,8±1,2	19,7±0,8	
		Тулярин + ПО	2,8±0,2	23,3±0,9	20,6±0,6	
		Тулярин + ДА	8,8±0,7*	26,3±1,1*	29,2±1,5	
	МС	ФР	5,4±1,1	44,5±2,4	14,2±1,8	10,3±0,6/14,7±0,4
		Тулярин	24,5±2,7*	26,1±0,4*	8,2±1,3	
		Тулярин + ПО	5,5±0,1	51,8±2,8	10,6±0,1	
		Тулярин + ДА	15,5±1,7*	45,1±3,5	5,6±0,3*	
<i>F. tularensis</i>	СП	ФР	5,2±0,7	12,2±0,2	32,1±1,5*	2,1±0,7/6,6±0,4
		Тулярин	15,5±2,2*	27,5±2,6	23,9±1,9	
		Тулярин + ПО	4,9±0,7	19,7±1,5*	27,2±0,2*	
		Тулярин + ДА	6,6±1,8	30,9±0,5*	25,7±1,4	
	МС	ФР	3,2±0,8	29,2±1,6	9,4±1,0	24,9±2,4*/7,6±0,6
		Тулярин	38,4±4,6	21,1±2,1	10,9±1,5	
		Тулярин + ПО	9,6±2,6	28,5±2,3*	16,6±2,0	
		Тулярин + ДА	8,9±0,2	35,0±4,1	14,7±2,5	
<i>F. tularensis</i> + ПО	СП	ФР	1,5±0,07	16,5±1,3	33,0±0,6	2,8±0,6/11,6±1,1
		Тулярин	7,8±0,9*	17,6±1,3	25,2±0,6*	
		Тулярин + ПО	2,6±0,4	22,1±1,3	25,6±1,0*	
	МС	ФР	25,83±1,0*	23,1±0,4*	14,6±0,2	18,6±0,3/15,2±0,4
		Тулярин	19,8±3,3	39,5±0,3*	10,0±0,6	
		Тулярин + ПО	5,3±0,7	30,3±2,2*	22,5±2,0*	
<i>F. tularensis</i> + ДА	СП	ФР	2,7±0,1	18,3±2,8	37,6±2,6*	13,4±0,3/9,3±1,1
		Тулярин	5,8±0,6*	36,0±0,5*	23,8±0,3	
		Тулярин + ДА	2,9±0,3*	28,4±0,3	28,8±0,5	
	МС	ФР	5,5±1,0	55,6±0,1	10,9±0,1	33,3±1,3*/9,8±0,8
		Тулярин	10,0±0,3*	39,6±0,2*	7,0±0,8	
		Тулярин + ДА	4,4±0,4*	36,4±0,3*	11,0±0,6*	

\* достоверность различий по отношению к аналогичным показателям в контроле (p<0,05).

ПО – полиоксидоний, ДА – далаггин, ФР – физиологический раствор (0,9 % раствор натрия хлорида, рН 7,2), N<sub>лиз</sub>, N<sub>A</sub>, N<sub>П</sub> – соответственно количество лизированных, апоптотических и пролиферирующих клеток через 24 ч инкубации; N<sub>A</sub><sup>0</sup>/N<sub>П</sub><sup>0</sup> – показатели апоптоза и пролиферации интактных и вакцинированных животных на 21-е сутки иммуногенеза в момент начала культивирования *in vitro* (0 ч).

ствующих с тулярином в условиях *in vitro*. Учитывая важную роль вторичного некроза фагоцитов в развитии системного воспаления при туляремии [9], для снижения реактогенных свойств живой туляремийной вакцины перспективно использование иммуномодуляторов (ПО и ДА), подавляющих апоптоз макрофагов при противотуляремийной вакцинации, а также лизис лейкоцитов сенсibilизированного организма под влиянием специфических антигенов туляремийного микроба в условиях *in vitro*. Кроме того, полученные нами экспериментальные данные свидетельствуют, что на основе метода проточной цитофлуориметрии в перспективе возможна разработка более совершенного способа учета результатов реакции лейкоцитолита в опытах с лейкоцитами крови человека и лабораторных животных.

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

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ахматова Н.К., Грубер И.М., Ахматов Э.А., Черкасова Л.С., Игнатова О.М., Михайлова Н.А. Стафилококковая вакцина: влияние на киллерную активность лейкоцитов и неспецифическую резистентность. *Иммунология*. 2014; 35(3):143–6.
2. Балачевский Б.В., Курзанов А.Н., Славинский А.А. Даларгин-индуцируемая модуляция функционально-метаболической активности нейтрофильных лейкоцитов. *Успехи совр. естествознания*. 2008; 5:75–7.
3. Дьяконова В.А., Дамбаева С.В., Голубева Н.М., Бураков В.В., Шаронов Г.В., Комогорова Е.Э., Пинегин Б.В. Изучение механизма действия иммуномодулятора полиоксидония на клеточном и молекулярном уровнях на клетках периферической крови человека в условиях *in vitro*. *Физиол. и патол. иммунной системы*. 2004; 8(2):32–6.
4. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. Практическое руководство. М.: ЗАО «Шико»; 2013. 560 с.
5. Сибиряк С.В., Хайдуков С.В., Зурочка А.В. Оценка апоптоза в иммунологических исследованиях. Вопросы современной проточной цитометрии. Клиническое применение. Челябинск: Бумажный двор; 2008. 195 с.
6. Фримель Х. Иммунологические методы. М.: Медицина; 1987. 472 с.
7. Bi Y., Du Z., Yang H., Guo Z., Tan Y., Zhu Z., Yang R. Reduced apoptosis of mouse macrophages induced by *uscW* mutant of *Yersinia pestis* results from the reduced secretion of YopJ and relates to caspase-3 signal pathway. *Scand. J. Immunol.* 2009; 70(4):358–67. DOI: 10.1111/j.1365-3083.2009.02297.x.
8. 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. Exper. Immunol.* 2012; 168(1):153–63. DOI: 10.1111/j.1365-2249.2012.04560.x.

9. Silva M.T. Bacteria-induced phagocyte secondary necrosis as a pathogenicity mechanism. *J. Leuk. Biology.* 2010; 88(5):885–96. DOI: 10.1189/jlb.0410205.

10. Silva M.T., do Vale A., dos Santos N.M. Secondary necrosis in multicellular animals: an outcome of apoptosis with pathogenic implications. *Apoptosis*. 2008; 13(4):463–82. DOI: 10.1007/s10495-008-0187-8.

#### References

1. Akhmatova N.K., Gruber I.M., Akhmatov E.A., Cherkasova L.S., Ignatova O.M., Mikhailova N.A. [Staphylococcal vaccine: effect on killer activity of leucocytes and non-specific resistance]. *Immunologia*. 2014; 35(3):143–6.
2. Balachevsky B.V., Kurzanov A.N., Slavinsky A.A. [Dalargin-induced modulation of functional-metabolic activity in neutrophilic leucocytes]. *Uspekhi Sovrem. Estestvoznaniya*. 2008; 5:75–7.
3. D'yakonova V.A., Dambaeva S.V., Golubeva N.M., Burakov V.V., Sharonov G.V., Komogorova E.E., Pinegin B.V. [Investigation of the mechanism of action of such immune-modulator as polyoxidonium at the cellular and molecular levels by the example of human peripheral blood cells *in vitro*]. *Fiziol. i Patol. Immunnoi Sistemy*. 2004; 8(2):32–6.
4. Onishchenko G.G., Kutyrev V.V., editors. [Laboratory Diagnostics of Dangerous Infectious Diseases. Practice Guidelines]. M.: CJSC "Shiko"; 2013. 560 p.
5. Sibiryak S.V., Khaidukov S.V., Zurochka A.V. [Assessment of apoptosis in immunological investigations]. In: [Problems of Modern Flow Cytometry. Clinical Application]. Chelyabinsk; 2008. 195 p.
6. Frimel Kh. [Immunological Methods]. M.: "Meditsina"; 1987. 472 p.
7. Bi Y., Du Z., Yang H., Guo Z., Tan Y., Zhu Z., Yang R. Reduced apoptosis of mouse macrophages induced by *uscW* mutant of *Yersinia pestis* results from the reduced secretion of YopJ and relates to caspase-3 signal pathway. *Scand. J. Immunol.* 2009; 70(4):358–67. DOI: 10.1111/j.1365-3083.2009.02297.x.
8. 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. Exper. Immunol.* 2012; 168(1):153–63. DOI: 10.1111/j.1365-2249.2012.04560.x.
9. Silva M.T. Bacteria-induced phagocyte secondary necrosis as a pathogenicity mechanism. *J. Leuk. Biology.* 2010; 88(5):885–96. DOI: 10.1189/jlb.0410205.
10. Silva M.T., do Vale A., dos Santos N.M. Secondary necrosis in multicellular animals: an outcome of apoptosis with pathogenic implications. *Apoptosis*. 2008; 13(4):463–82. DOI: 10.1007/s10495-008-0187-8.

#### Authors:

Kravtsov A.L., Klyueva S.N., Shchukovskaya T.N., Bugorkova S.A. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrap@microbe.ru.

#### Об авторах:

Кравцов А.Л., Ключева С.Н., Щуковская Т.Н., Бугоркова С.А. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrap@microbe.ru.

Поступила 29.07.16..