



Нейтрофильные внеклеточные ловушки в борьбе с биопленкообразующими микроорганизмами: охотники или добыча?

Долгушин И.И., Мезенцева Е.А.

ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет», 454092, Челябинск, Россия

В обзоре представлены современные данные о взаимоотношениях нейтрофильных внеклеточных ловушек (НВЛ) и биопленкообразующих микроорганизмов *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *Candida* spp., полученные в исследованиях *in vitro* и *in vivo*. До 80% микробных инфекций человека связаны с биопленкообразующими микроорганизмами. Формирование высокоспециализированных сообществ в виде биопленок является одной из основных стратегий выживания бактерий и грибов, значительно повышая их толерантность к действию агрессивных и стрессовых внешних условий, химиотерапевтических препаратов, факторов иммунной системы, способствуя их персистенции и хронизации инфекционного процесса. Образование НВЛ в процессе нетоза является одним из биологических механизмов, используемых нейтрофилами в защите от патогенов. Хемоаттрактанты биопленочного происхождения, а также выделяемые эпителиальными и иммунокомпетентными клетками, привлекают и активируют мигрирующие нейтрофилы. Однако учитывая, что в биопленках бактерии образуют достаточно крупные клеточные кластеры и агрегаты, процесс фагоцитоза порой оказывается затруднен или невозможен. В этих условиях логично предположить, что значимость НВЛ в антибиопленочном иммунитете увеличивается. Однако за счет компонентов внеклеточного биопленочного матрикса (например, экзополисахарид Psl *P. aeruginosa*), молекул системы quorum sensing (например, quorum sensing-система LasR *P. aeruginosa*), ферментов (например, LasA-протеаза и LasB-эластаза *P. aeruginosa*), токсинов (например, лейкоцидин Пантона–Валентайна и γ -гемолизин АВ *S. aureus*) и, вероятно, других, пока не изученных, факторов микроорганизмы в биопленках способны влиять на сигнальные системы, задействованные в нетозе, на интенсивность формирования НВЛ, механизмы севестрации и киллинга в них, порой подчиняя и используя компоненты НВЛ для собственных целей.

Ключевые слова: нейтрофилы; нейтрофильные внеклеточные ловушки; нетоз; биопленки; биопленочные инфекции; биопленкообразующие микроорганизмы; обзор.

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии финансирования при проведении исследования.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Для цитирования: Долгушин И.И., Мезенцева Е.А. Нейтрофильные внеклеточные ловушки в борьбе с биопленкообразующими микроорганизмами: охотники или добыча? *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2020; 97(5): 468–481.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-5-9>

Поступила 18.06.2020

Принята в печать 28.08.2020

Neutrophil extracellular traps in the fight against biofilm-forming microorganisms: hunters or prey?

Ilya I. Dolgushin, Elena A. Mezentseva

South-Ural State Medical University, 454092, Chelyabinsk, Russia

The review presents up-to-date data on the relationships between neutrophil extracellular traps (NETs) and biofilm-forming microorganisms *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *Candida* spp. obtained *in vitro* and *in vivo* studies. Up to 80% of human microbial infections are associated with biofilm-forming microorganisms. The formation of highly specialized biofilm communities is one of the main strategies for the survival of bacteria and fungi, significantly increasing their tolerance to aggressive and stressful environmental conditions, chemotherapeutic drugs, and immune system factors, contributing to their persistence and chronicity of the infectious process. The formation of NETs in the process of NETosis is one of the biological mechanisms used by neutrophils in protection against pathogens. Chemoattractants of biofilm origin, as well as those secreted by epithelial and immunocompetent cells, attract and activate migrating neutrophils. However, given that bacteria form fairly large

cell clusters and aggregates in biofilms, the process of phagocytosis is sometimes difficult or impossible. Under these conditions, it is logical to assume that the importance of NETs in anti-biofilm immunity increases. However, due to the components of the extracellular biofilm matrix (e.g., Psl exopolysaccharide *P. aeruginosa*), quorum sensing (QS) molecules (e.g., LasR QS system *P. aeruginosa*), enzymes (e.g., LasA protease and LasB elastase *P. aeruginosa*), toxins (e.g., Panton-Valentine leukocidin and AB γ -hemolysin *S. aureus*) and probably other factors yet to be studied, the microorganisms in biofilms are able to influence the signaling systems involved in NETosis, the intensity of the formation of NETs, the sequestration and killing mechanisms in them, sometimes subordinating and using NETs components for their own purposes.

Keywords: *neutrophils; neutrophilic extracellular traps; NETosis; biofilms; biofilm infections; biofilm-forming microorganisms; review.*

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

Conflict of interest. The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

For citation: Dolgushin I.I., Mezentseva E.A. Neutrophil extracellular traps in the fight against biofilm-forming microorganisms: hunters or prey? *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, èpidemiologii i immunobiologii*. 2020; 97(5): 468–481. (In Russ.).
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-5-9>

Received 18 June 2020
Accepted 28 August 2020

Введение

Открытие V. Brinkmann и коллегами в 2004 г. нейтрофильных внеклеточных ловушек (НВЛ) как формы врожденного ответа, который связывает микроорганизмы, предотвращает их распространение и обеспечивает высокую локальную концентрацию антимикробных агентов [1, 2], послужило толчком к изучению роли НВЛ, наряду с фагоцитозом и деградацией, в защите от патогенов и продемонстрировало их эффективность при ряде бактериальных, грибковых и вирусных инфекций [3–9]. Однако, несмотря на широкий арсенал средств противостояния, борьба с микроорганизмами резко осложняется, когда они формируют ассоциации, называемые биопленками, участвующие в развитии персистирующих инфекций и деструктивных воспалительных процессов [10, 11].

Основная часть

Для бактерий и грибов характерны два разных «образа жизни»: планктонный и биопленочный [12, 13].

При планктонном существовании одиночные клетки или клеточки в небольших цепочках (например, стрептококки) либо скоплениях (например, стафилококки) «плавают» без защиты от токсических веществ, бактериофагов и фагоцитов. Следовательно, такой стиль жизни опасен для микробов [12].

При биопленочном образе жизни микроорганизмов образование совокупностей клеток, окруженных самопродуцируемым внеклеточным матриксом, является одной из стратегий выживания [14]. Такие микробные агрегаты могут прилипать к естественным или искусственным поверхностям (сидячий рост, адгезированные биопленки), например к зубам, клеткам эпидермиса, венозным катетерам, искусственным суставам, или могут располагаться в тканях (неадгезированные или суспензион-

ные биопленки), например на слизистых оболочках, в мокроте или в труднозаживающих ранах [12]. Таким образом, биопленка — это постоянно обновляющееся сообщество микробов на биогенном или абиогенном субстрате, окруженных внеклеточным полимерным матриксом из экзополисахаридов, внеклеточной ДНК, белков, РНК и липидов, который предохраняет их от вредных воздействий, химиотерапевтических препаратов и влияний организма-хозяина, представляет собой один из факторов межмикробного взаимодействия и коммуникации, способствует горизонтальному переносу генов, является источником питательных веществ для бактерий во время голодания [13–22].

Использование современных технологий позволило установить, что развитие биопленки включает несколько последовательных этапов:

- 1) первоначальное прикрепление планктонных бактерий к поверхности (субстрату);
- 2) созревание биопленки;
- 3) отделение планктонных форм (дисперсия, отслойка, рассредоточение биопленки) с последующей их миграцией в новые локусы [13, 23].

Внутри биопленок микроорганизмы используют межклеточную коммуникационную систему из небольших сигнальных молекул, аутоиндукторов, называемую quorum sensing (QS) [14, 18, 20]. Система QS не только определяет плотность популяции, но и регулирует различные признаки, такие как бактериальный фенотип, экспрессия генов факторов вирулентности, пространственная дифференциация и формирование биопленок [18, 21]. Высвобождение QS-молекул обеспечивает быструю локальную связь между клетками в зараженной области, синхронизацию их роста, а также реакции на изменения температуры и pH окружающей среды, присутствие биоцидных соединений и т.д. [13, 24]. До 80% микробных инфекций человека, включая

эндокардит, периодонтит, риносинусит, остеомиелит, хронические незаживающие раны, менингит, инфекции почек, постимплантационные инфекции, микробно-воспалительные процессы в бронхолегочной системе при муковисцидозе связаны с биопленкообразующими микроорганизмами [13, 20]. Как ни парадоксально, большие дозы антибиотиков, используемых для лечения биопленочных инфекций, способствуют формированию антибиотико-резистентных штаммов бактерий [13].

НВЛ представляют собой волокна ДНК, «декорированные» набором белков ядерного, цитозольного и гранулярного происхождения, из которых часть составляют «протеомное ядро», относительно постоянное, независимо от индуцирующего стимула, включая гистоны H2A, H2B, H4, лактоферрин, миелопероксидазу (МПО), нейтрофильную эластазу (НЭ), резистин, нейтрофильный дефензин-2, α -актинин, β -актин, миозин-9, мезин, профилин-1, пластин-2, филамин-А, липокалин, ассоциированный с желатиназой нейтрофилов, α -энолазу, глюкозо-6-фосфат-изомеразу, транскетолазу [25–28]. Существование протеомных вариаций может быть связано с тем, что различные стимулы запускают отличающиеся внутриклеточные сигнальные каскады, которые в итоге приводят к некоторым изменениям в белковом составе НВЛ. Хотя возможен и другой сценарий, по которому адгезия дополнительных белков может происходить уже после высвобождения НВЛ в зависимости от окружающей их среды [28].

На сегодняшний день известны NADPH-оксидаза (NOX)-зависимые и NOX-независимые механизмы формирования НВЛ [29, 30]. Наиболее изученным является NOX-зависимый механизм, при котором активационный стимул, например форбол-12-миристат-13-ацетат (ФМА) или бактериальный липополисахарид, вызывает выход запасов Ca^{2+} в цитозоль, повышение активности протеинкиназы C и фосфорилирование gp91phox/Nox2 [29, 31]. Данный процесс облегчает сборку комплекса NADPH-оксидазы, тем самым стимулируя генерацию активных форм кислорода (АФК), способствующих последующей дезинтеграции мембран ядра и гранул [9, 29, 32–35]. Выходящие при этом из азурофильных гранул НЭ и МПО контактируют с содержимым ядра, участвуя в расщеплении гистонов и деконденсации хроматина [9, 29, 34]. Кульминацией процесса является выброс деконденсированной ДНК, «декорированной» белками, в межклеточное пространство через разрывы в клеточной мембране нейтрофила, чему способствует генерация HClO под действием МПО [30], или поры, образованию которых помогает гасдермин D [36], и гибель нейтрофила [9, 29].

В деконденсации хроматина также принимает участие пептидиларгинин-деиминаза 4 (PAD4) —

фермент, который конвертирует положительно заряженный аргинин гистонов в нейтрально заряженный цитруллин, изменяя тем самым общий заряд молекул и способствуя диссоциации гистонов и ДНК [37]. Однако роль PAD4 в NOX-зависимом формировании НВЛ остается предметом спора [29]: данные одних исследователей свидетельствуют, что цитруллинирование гистонов не является необходимым событием NADPH-оксидаза-зависимого образования НВЛ [29, 38, 39], в то время как результаты, полученные другими учеными, доказывают обратное [29, 40, 41]. В одной из последних работ, опубликованных в 2020 г., H.R. Thiam и соавторы установили, что при нетозе происходит цепь последовательных клеточных событий, которая сохраняется у разных видов (у человека, мышей), при этом ядерная локализация и цитруллинирующая активность PAD4 являются необходимыми условиями для деконденсации и высвобождения ДНК [37].

Ионофоры кальция (иономицин, A23187), некоторые цитокины, фосфолипидные медиаторы воспаления, кристаллы мочевой кислоты могут запускать NOX-независимый механизм формирования НВЛ [29, 30, 42–47]. Приток и повышение уровня Ca^{2+} в цитозоле нейтрофила, с одной стороны, активирует кальцийзависимые калиевые каналы и выработку митохондриальных АФК [29, 30, 39]; а с другой стороны, вызывает активацию PAD4 и ее транслокацию в ядро с последующей цитруллиниацией гистонов и деконденсацией хроматина [29].

Нейтрофильные внеклеточные ловушки и биопленки *Pseudomonas aeruginosa*

Хроническая биопленочная инфекция дыхательных путей, вызванная *Pseudomonas aeruginosa*, у пациентов с муковисцидозом (МВ) является наиболее хорошо изученной и описанной биопленочной инфекцией в медицине [12]. При МВ происходят мутации гена, кодирующего синтез регулятора трансмембранной проводимости муковисцидоза (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator — CFTR), белка, участвующего в транспорте бикарбонатных ионов и ионов хлора через мембрану [47]. CFTR экспрессируется во многих органах, включая эпителиальные клетки дыхательных путей, поджелудочной железы, а также клетки врожденного иммунитета, в частности нейтрофилы [47, 48]. Мутации гена CFTR приводят к нарушению нормального транспорта ионов и жидкости через эпителий дыхательных путей, образованию толстого слоя вязкой слизи, нарушению мукоцилиарного клиренса, развитию воспаления и хронических бактериальных инфекций, приводящих к нарушению функции легких и дыхательной недостаточности [47]. *P. aeruginosa* инфицирует респираторный тракт пациентов с МВ в раннем возрасте и становится персистирующим патогеном в последующие

годы, что обусловлено ее способностью образовывать биопленки [47, 49].

В элиминации *P. aeruginosa*, в том числе из дыхательных путей, ключевую роль играют нейтрофильные гранулоциты. Наиболее эффективными способами борьбы являются классический фагоцитоз и последующий внутриклеточный киллинг, причем *P. aeruginosa* устойчива к кислородзависимым механизмам и чувствительна к действию таких кислороднезависимых факторов, как НЭ, лизоцим, кателицидины, дефензины [49]. Однако при МВ мигрирующие в большом количестве в легкие нейтрофилы не могут эффективно уничтожать бактерии, проявляя дисфункциональный фенотип, вызывая повреждение тканей легких и нарушение их функции [47, 49, 50].

Первоначально считалось, что основной формой гибели нейтрофилов в дыхательных путях при МВ является вторичный некроз, т.е. некроз после апоптоза вследствие несвоевременного удаления апоптозных клеток [49]. В работах 2005 [51] и 2009 гг. [52] группой американских ученых установлено, что комплекс ДНК и белка актина, выделяющихся при некрозе нейтрофилов, значительно усиливает биопленкообразование *P. aeruginosa* штамма PAO1 в условиях *in vitro*, что, вероятно, имеет место в респираторных путях у больных МВ. Похожие результаты были получены в работе и другой группы ученых из США 2011 г. по изучению взаимоотношений биопленкообразующей активности *P. aeruginosa* штамма 6294 и нейтрофилов при развитии кератита вследствие ношения контактных линз [53]. Авторы установили, что каркас из F-актина и ДНК, выделяющихся из некротизированных нейтрофилов, успешно используется бактериями для адгезии и дальнейшего формирования биопленки на поверхности контактной линзы [53].

Однако ряд исследований показал, что нейтрофилы также массово подвергаются нетозу с выделением НВЛ, которые в большом количестве определяются в дыхательных путях и мокроте больных МВ [27, 28, 47, 49].

Одним из мощных индукторов образования НВЛ является мобильность *P. aeruginosa*, обусловленная флагеллиновыми жгутиками, поэтому превалирование подвижных планктонных немуюкоидных форм бактерий на ранних стадиях заболевания вызывает активный нетоз [27, 28, 49, 54]. Еще одним триггером НВЛ-формирования является экзотоксин *P. aeruginosa* пиоцианин [55]. Его индукция посредством передачи QS-сигналов коррелирует со стадией роста биопленки *P. aeruginosa*. Хотя пиоцианин обладает широким спектром токсических эффектов, предполагаемой основой его токсичности является проникновение через мембрану клетки и окисление NADPH (т.е. пиоцианин является неферментной NADPH-оксидазой) с образованием

супероксид-аниона и других АФК внутри клетки, что приводит к развитию в клетках-мишенях окислительного стресса [56–58]. Однако в 2013 г. был установлен новый механизм действия пиоцианина — индукция образования НВЛ через окислительный стресс (посредством АФК, ферментов JNK и PI3K и аутофагии), но вызванный не прямым окислением NADPH, а активацией NADPH-оксидазы нейтрофила [55].

Находясь в дыхательных путях, *P. aeruginosa* индуцирует выработку нейтрофилами фактора ингибирования миграции макрофагов — провоспалительного цитокина, обладающего аутокринной и паракринной активностью, который, в свою очередь, вызывает активацию нейтрофильной митоген-активируемой протеинкиназы и последующее образование АФК внутри нейтрофила, также потенцируя нетоз и ингибируя при этом апоптоз [27].

У *P. aeruginosa* имеется несколько QS-систем, при этом система Las занимает самое высокое место в иерархии, регулируя нижестоящие системы Rhl и Pqs [59, 60]. Индукторами нетоза являются такие важные факторы вирулентности *P. aeruginosa*, контролируемые QS-системой LasR, как ферменты LasA-протеаза и LasB-эластаза, а также экзотоксины, выделяемые с помощью системы секреции III типа (T3SS) [60].

Важно отметить, что разные генетические варианты *P. aeruginosa* индуцируют различные механизмы, участвующие в образовании НВЛ: одни запускают NOX-зависимые пути, другие — АФК-независимые; влияние одних приводит к цитруллинации гистонов при нетозе, другим не требуется PAD4 и цитруллинация для высвобождения НВЛ [60]. Кроме того, было обнаружено, что в составе НВЛ, индуцируемых разными вариантами *P. aeruginosa*, обязательно присутствует белок, усиливающий бактерицидное действие нейтрофилов, специфически нацеленный на грамотрицательные бактерии, такие как *P. aeruginosa*, а НЭ и МПО — не всегда [60].

Таким образом, ряд прямых и опосредованных *P. aeruginosa* факторов способствуют нетозу и выбросу большого количества НВЛ, начиная с ранних стадий заболевания. Однако секвестрация *P. aeruginosa* ловушками при сублитической концентрации антимикробных НВЛ-ассоциированных белков не приводит к полному уничтожению бактерий, а, наоборот, способствует их микроколонизации, образованию агрегатов и в итоге биопленкообразованию [28]. В процессе формирования биопленки *P. aeruginosa* экзополисахариды Psl внеклеточного матрикса взаимодействуют с внеклеточной ДНК не только самих бактерий, но и НВЛ, используя их в качестве «строительных лесов», т.е. каркаса для дальнейшего биопленкообразования и колонизации слизистой [17, 18, 27, 28, 61]. Удержание *P. aeruginosa* в остовах ловушек и влияние на них

некоторых компонентов НВЛ, например белка LL-37, способствует мутагенезу бактерий [28, 62]. По мере прогрессирования болезни пребывание *P. aeruginosa* в дыхательных путях сопровождается генетическими изменениями и конверсией ряда признаков, в том числе трансформацией в неподвижные мукоидные формы, образующие биопленки. При этом и утрата жгутиков, и продукция альгинатсодержащей слизи сохраняет, но снижает способность *P. aeruginosa* индуцировать нетоз [54, 61], а слизиобразование также подавляет захват и уничтожение бактерий НВЛ, т.е. снижает эффективность защиты [27, 28, 49].

Интересно, что у 63% пациентов с МВ при хронической синегнойной инфекции формируются мутантные формы *P. aeruginosa* с инактивацией QS-системы LasR [60, 63], однако появление таких штаммов ассоциируется с ухудшением функции легких и у детей, и у взрослых с МВ [60, 64]. Данный парадокс свидетельствует о том, что *P. aeruginosa* компенсирует потерю факторов вирулентности другими патогенными механизмами, в частности путем ускользания от нейтрофил-опосредованных бактерицидных функций с помощью снижения интенсивности формирования НВЛ [60].

Таким образом, приведенные данные демонстрируют сложные динамические взаимоотношения НВЛ и биопленочной инфекции *P. aeruginosa* в дыхательных путях больных МВ, одновременно подчеркивая потенциальные недостатки НВЛ-модели защиты в контексте данной инфекции [28]. НВЛ, формируемые под действием бактериальных триггеров, осуществляют захват *P. aeruginosa*, однако неспособность уничтожить секвестрированные бактерии, с одной стороны, способствует биопленкообразованию последних, а с другой — запускает процесс их патoadaptации [27, 28], приводящей к формированию ещё большей устойчивости к НВЛ-опосредованной бактерицидной активности.

В 2019 г. были опубликованы результаты изучения влияния НВЛ на биопленкообразование *P. aeruginosa* штамма PAO1 на модели бактериального кератита у мышей [65]. Использование мультиточечной микроскопии, 3D-реконструкции в сочетании с электронной микроскопией и окраской глазных биоптатов по Граму выявило, что уже через 24 ч после заражения *P. aeruginosa* формировали толстую экзополисахарид Psl-содержащую биопленку на поверхности роговицы, а мигрирующие через периферическую лимбальную сосудистую сеть нейтрофилы собирались под этим бактериальным слоем, образуя видимый «щит». При этом между слоем нейтрофилов (снизу) и слоем бактерий (сверху) обнаруживалась «мертвая зона», заполненная ДНК в сочетании с белками-гистонами, НЭ и МПО, т.е. НВЛ. Важным является тот факт, что у животных 3 групп, нокаутных по PAD4, нейтрофильной эластазе и катепсину С и характеризую-

щихся нарушением НВЛ-образующей способности, отсутствовала «мертвая зона» в сочетании с утратой структурированной биопленки *P. aeruginosa*, выявляемой у мышей дикого типа, что позволило авторам предположить, что присутствие НВЛ обуславливало формирование биопленки высокорепликативными планктонными бактериями. При этом у всех 3 групп нокаутных животных через 7 дней после инокуляции на роговицу *P. aeruginosa* обнаруживались в головном мозге, вероятно проходя через канал зрительного нерва, исходя из чего авторы сделали вывод, что нейтрофилы формируют НВЛ-барьер для сдерживания бактерий снаружи в виде биопленки и предотвращения их распространения в мозг, «принося в жертву» глаз, т.к. планктонные бактерии гораздо более подвижны, чем биопленочные. Таким образом, формирование НВЛ, вероятно, является эволюционно полезным механизмом для защиты мозга от инфекций, распространяющихся через глазной путь [65]. При этом авторы обратили особое внимание на то, что изучаемые ими нейтрофилы — это клетки, естественным путем мигрировавшие в ткани, а не выделенные из крови, поэтому исследованная ими система *in vivo* отражает истинный комплекс взаимоотношений нейтрофилов и *P. aeruginosa*. При инфицировании роговицы глаза *P. aeruginosa* бактериальная система T3SS высвобождает токсин ExoS в направлении накопления нейтрофилов и, с одной стороны, останавливает их под слоем бактерий, давая возможность биопленке созреть, а с другой стороны, побуждает их к формированию НВЛ, которые, в свою очередь, способствуют переходу *P. aeruginosa* из планктонной формы в биопленочную. Образование непроницаемой биопленки помогает бактериям формировать устойчивость к антибиотикам, но при этом сдерживает их инвазию и распространение в мозг. Внутривенное введение животным биспецифичных антител — против T3SS и экзополисахарида Psl — способствует переходу от НВЛ-опосредованной программы уничтожения бактерий к фагоцитозу и внутриклеточному протеазоопосредованному механизму их киллинга, препятствуя образованию биопленок. Сочетанное введение антител с местным лечением антибиотиками демонстрирует эффективную ликвидацию инфекции и уменьшение воспаления глаз у мышей со сформированной биопленкой [65].

В 2020 г. группой ученых из Дании и США были опубликованы интересные результаты по исследованию взаимоотношений нейтрофилов и биопленок *P. aeruginosa in vivo* [66]. С помощью трансмиссионной электронной микроскопии авторы выявили плотный контакт между нейтрофилами и биопленкой *P. aeruginosa*, сформированной на силиконовом имплантате, через 24 и 48 ч после его введения в брюшную полость мышей. Используя специальные красители совместно с техноло-

гией Click-iT® для маркировки внеклеточной ДНК (вкДНК) *in vivo* и конфокальной сканирующей лазерной микроскопией, ученые показали, что нити вкДНК нейтрофильного происхождения локализуются вокруг биопленки *P. aeruginosa*, но не внутри нее, т.е. не являются ее частью. Исследование срезов легочной ткани больных МВ методом флуоресцентной гибридизации *in situ* с использованием специфичных красителей также выявило, что фибриллы вкДНК нейтрофилов располагаются снаружи, окружая биопленки *P. aeruginosa*. Иммуногистохимические методы исследования таких компонентов НВЛ, как гистоны НЗ, цитруллинированные гистоны НЗ (citНЗ) и НЭ, и в материале от мышей, и в срезах легочной ткани человека показали, что citНЗ (основной маркер НВЛ) отсутствуют внутри биопленок *P. aeruginosa*; НЗ локализуются снаружи, т.е. вокруг, по периферии биопленки, но не совместно с ней, а НЭ колокализуются с бактериями в биопленке. Исходя из этого, авторы выдвинули гипотезу, что бактериальные биопленки *P. aeruginosa in vivo* не используют вкДНК хозяина в качестве каркаса, а скорее, экстрацеллюлярная нейтрофильная ДНК выполняет функцию своего рода оболочки вокруг биопленки (вторичный матрикс), ограничивая диссеминацию бактерий (что частично совпадает с результатами работы А. Thanabalasuriar и соавт. [65]), но и защищая ее от фагоцитоза. При этом основным источником вкДНК является некротический лизис нейтрофилов, а нетоз вносит весьма скромный вклад в этот процесс. В заключение авторы отметили, что данное исследование является первым, в котором изучается прямое распределение вкДНК хозяина и бактерий при хронических бактериальных инфекциях *in vivo*. В отличие от индукции *in vitro*, стимуляция нейтрофилов бактериальными биопленками во время хронических инфекций *in vivo*, по-видимому, не вызывает активного формирования НВЛ; однако некротизированные нейтрофилы действительно высвобождают вкДНК, гистоны НЗ и антибактериальные ферменты, такие как НЭ [66].

Нейтрофильные внеклеточные ловушки и биопленки *S. aureus*

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) — известный человеческий патоген, который может вызывать широкий спектр заболеваний — от инфекций кожи и подкожной жировой клетчатки до опасных для жизни инвазивных зоокомиальных инфекций. При хронизации стафилококковых инфекций наблюдается образование биопленок как на имплантированных конструкциях (сердечные клапаны, катетеры, суставные протезы), так и на человеческих тканях [67–71].

В 2018 г. группой ученых из США установлено, что в условиях *in vitro* биопленки метицил-

линрезистентного штамма *S. aureus* USA300, по сравнению с бактериями в планктонном состоянии, резко снижают жизнеспособность нейтрофилов и способствуют их гибели путем нетоза за счет своих секреторных белков [72]. Основную роль в индукции нетоза биопленочными бактериями играет продукция таких факторов вирулентности стафилококков, как лейкоцидин Пантона–Валентайна и γ -гемолизин АВ (лейкоцидиновый гемолизин). При этом образующиеся НВЛ не влияют на биомассу биопленки и выживаемость бактерий в ней, т.е. оказываются неэффективными в уничтожении биопленочных бактерий. Полученные *in vitro* результаты были подтверждены авторами в модели хронической ожоговой раневой инфекции у свиней, демонстрируя, что лейкоцидины *S. aureus* индуцируют нетоз и способствуют персистенции бактерий при хронических инфекциях *in vivo*. Одной из возможных причин устойчивости *S. aureus* к бактерицидной активности НВЛ, как отметили авторы, может быть продукция термонуклеазы Nuc, расщепляющей ДНК ловушек [72].

В 2019 г. группой ученых из Нидерландов были опубликованы данные о взаимоотношениях биопленок разных штаммов *S. aureus* и их фермента термонуклеазы 1 (Nuc1) с нейтрофилами *in vitro* [73]. Одним из важнейших компонентов внеклеточного биопленочного матрикса *S. aureus* является вкДНК, формированию которой способствует аутолиз бактериальных клеток, имитирующий апоптоз эукариотических клеток [74], и которая, как полагают, играет решающую роль в стабилизации структуры биопленок [75]. Однако, как установили авторы, уже с ранних стадий биопленкообразования *S. aureus* (через 1, 2, 4 ч) в IMDM (Iscove's modified Dulbecco's medium) — среде для культивирования клеток млекопитающих — стафилококки продуцируют Nuc1, фермент, разрушающий ДНК, что, по логике, должно вызывать дестабилизацию и ремоделирование биопленки. Однако в проведенных экспериментах увеличение количества Nuc1 происходило параллельно с устойчивым формированием биопленки. Это совпадает с данными других исследований, показывающих, что на ранних этапах биопленкообразования *S. aureus* не чувствительны к ДНКазе I [76, 77]. Авторы сделали вывод, что формирование биопленки *S. aureus* в среде IMDM, в отличие от триптического соевого бульона — классической среды для культивирования бактерий, не зависит от вкДНК [73].

Также было выявлено, что *S. aureus*-биопленкоиндуцированный нетоз является АФК-независимым [73]. При этом после 90-минутной коинкубации свежесделанных нейтрофилов крови человека и 3-часовых, т.е. раннестадийных, биопленок стафилококков авторы наблюдали минимальные количества НВЛ в ответ на *S. aureus* дикого типа, в то

время как *nuc*-мутантный штамм, не образующий термонуклеазу 1, индуцировал массивное образование НВЛ. Полученные данные, с одной стороны, подтверждают, что раннестадийные биопленки *S. aureus* являются индукторами нетоза; с другой стороны, учитывая выявленную способность биопленочных бактерий уже с первых часов продуцировать термонуклеазу, разрушающую ДНК НВЛ, подобно планктонным формам *S. aureus*, свидетельствуют о способности стафилококков активно уклоняться от антимикробного влияния нейтрофилов. Требуются дальнейшие исследования для выяснения механизмов регуляции баланса между индукцией нетоза и деградацией НВЛ биопленками *S. aureus*, которые могут быть связаны с продукцией не только Nuc, но и других иммуномодулирующих факторов стафилококков [73].

Нейтрофильные внеклеточные ловушки и биопленки *Candida spp.*

Candida albicans (*C. albicans*) является широко распространенным внутрибольничным грибковым патогеном. На сосудистых, мочевых катетерах, зубных протезах и других медицинских устройствах, а также на слизистых оболочках *C. albicans* ведет биопленочный образ жизни, что способствует его устойчивости к противогрибковым средствам и защитным факторам макроорганизма, значительно снижая эффективность лечения кандидоза [7, 78–80]. Учитывая, что, с одной стороны, высвобождение НВЛ является основным способом контроля гифальных, но не дрожжевых, форм *C. albicans*, которые не могут быть фагоцитированы из-за своего размера [81], и что, с другой стороны, в биопленках *C. albicans* находится в агрегированном состоянии, допустимо предположить, что ловушкообразование может быть идеальным методом борьбы с биопленочными *C. albicans* [79].

Однако в 2016 г. группой ученых из США, изучавших взаимоотношения нейтрофилов и биопленок *C. albicans* гифального штамма SC5314 *in vitro* и *in vivo* (на модели биопленочной инфекции сосудистого катетера у крыс), установлено, что биопленочные формы *C. albicans*, в отличие от планктонных, подавляют высвобождение НВЛ [78]. Так, после 4-часовой коинкубации нейтрофилов и биопленок *C. albicans* не наблюдалось образования НВЛ, несмотря на активную миграцию и адгезию нейтрофилов к гифам гриба, в то время как планктонные формы вызывали 20-кратное повышение свободной ДНК в комплексе с цитруллинированными гистонами, оказываясь опутанными сетеподобными фибриллярными структурами. Биопленки *C. albicans* нарушали даже ФМА-индуцированное ловушкообразование. Авторы впервые определили, что ключевой механизм подавления высвобождения НВЛ биопленками *C. albicans* свя-

зан с ингибированием NADPH-оксидазы и генерации АФК у нейтрофилов такими компонентами внеклеточного биопленочного матрикса, как полисахариды α -маннаны, но не растворимыми молекулами. Кроме того, биопленочный матрикс, возможно, маскирует эпитопы клеточной стенки *C. albicans*, распознаваемые рецепторами нейтрофилов и необходимые для запуска формирования НВЛ. Таким образом, биопленочный стиль жизни позволяет *C. albicans* избегать НВЛ-опосредованного киллинга, способствуя выживаемости и резистентности биопленок к атаке нейтрофилов [78]. Помимо этого, ингибирование НВЛ может иметь более широкие последствия *in vivo*, учитывая их роль в предотвращении диссеминации микробов, «разоблачении» эпитопов для распознавания грибов, рекрутировании дополнительных воспалительных клеток [78, 82, 83].

В следующем своем исследовании 2017 г. эта же группа ученых изучала реакцию нейтрофилов на 4 клинических изолята (штамма) *C. albicans*, отобранных по их различиям в биопленкообразующей способности, архитектуре формируемых биопленок и степени филаментации: SC5314 (как и в предыдущем исследовании [78]), 3153, 98-210 и 98-17 [79]. Штамм 3153 демонстрировал биопленочную архитектуру, аналогичную контрольному штамму SC5314, образуя плотную биопленку с внешним слоем, состоящим почти целиком из гифальных клеток. Заметно более низкая степень образования гиф наблюдалась у биопленок, сформированных штаммами 98-210 и особенно 98-17, которые содержали преимущественно дрожжевые формы на поверхности биопленки. Толщина биопленок коррелировала со способностью к гифообразованию: штаммы, демонстрирующие высшую степень филаментации, — SC5314 и 3153 — формировали самые толстые биопленки. При этом было установлено, что биопленки *C. albicans*, вне зависимости от штамма, после 4-часовой инкубации с нейтрофилами не вызывают ловушкообразования, ингибируя нетоз, в то время как планктонные формы всех 4 изучаемых изолятов индуцируют образование НВЛ. Полученные данные позволили авторам предположить, что гифальная архитектура биопленок не имеет решающего значения для ингибирования высвобождения НВЛ и даже биопленки, состоящие преимущественно из дрожжевых морфотипов, сохраняют способность нарушать функции нейтрофилов, что подтверждает большую значимость в угнетении ловушкообразования других специфичных для биопленки компонентов, таких как внеклеточный матрикс [79]. В то время как предыдущее исследование выявило ингибирование биопленкой штамма SC5314 продукции АФК нейтрофилов [78], текущее исследование показало, что данная супрессия является штаммзависимой [79]. Так, биопленка,

образованная штаммом 98-210, в отличие от других изолятов, вызывала образование АФК у нейтрофилов. Сохранение при этом НВЛ-подавляющей активности биопленки данного штамма *C. albicans* указывает на возможное расхождение путей ингибирования формирования АФК и НВЛ, индуцированных биопленками. Для дальнейшего изучения этих сложных ингибирующих путей необходимы дополнительные исследования [79].

В 2018 г. той же группой ученых было установлено, что предварительная обработка биопленок *C. albicans* препаратами из группы эхинокандинов (анидулафунгин, каспофунгин, микафунгин) способствует образованию НВЛ [80], что, вероятно, может служить проявлением синергичного действия нейтрофилов и лекарственных средств данного класса в борьбе с кандидозом [80, 84]. Эхинокандины нарушают целостность клеточной стенки грибковых патогенов, вызывая демаскировку β -глюкана, провоспалительного полисахарида, который может служить триггером для ловушкообразования нейтрофилов [80, 85].

В 2019 г. польскими учеными были опубликованы результаты по изучению влияния 3 ауторегуляторных QS-молекул *C. albicans* (фарнезола, фарнезиловой кислоты и тирозола) на ловушкообразование нейтрофилов [24]. Интересно, что, с одной стороны, фарнезол, вырабатываемый у грибов в ответ на повышение плотности клеток, предотвращает образование биопленок и блокирует переход из бластоспор в гифы [86]. С другой стороны, бластоспоры, как частицы более мелких размеров, чем гифы, индуцируют нетоз в меньшей степени [81]. Возможно, таким образом, что грибы используют фарнезол, ингибируя свою филаментацию и прогрессию инфекции, как способ избежать внимания нейтрофилов и выжить в среде, инфильтрированной ими [24]. Однако польскими учеными было впервые установлено, что фарнезол, но не фарнезиловая кислота и тирозол, вызывает активацию АФК-зависимого пути нетоза нейтрофилов и усиливает их хемотаксис через CD11b/CD18- и TLR2-рецепторы. Таким образом, нейтрофилы все-таки «слышат» QS-язык грибов, что способствует защите организма от *C. albicans* [24].

Помимо *C. albicans* были исследованы взаимоотношения биопленочных форм *C. glabrata* (одного из наиболее часто встречающихся возбудителей не-*albicans* кандидоза) и НВЛ [7]. *C. glabrata* образует только относительно небольшие (1–4 мкм) дрожжевые формы, в отличие от *C. albicans*, формирующего более крупные (4–7 мкм) дрожжевые морфотипы, а также нитевидные формы (псевдогифы и гифы). После 4-часового совместного культивирования нейтрофилов с 24-часовыми биопленками *C. glabrata* из овоидных дрожжевых клеток с помощью сканирующей электронной микроскопии были визуализированы

сетчатые структуры, исходящие из гранулоцитов, что указывало на образование НВЛ, однако интенсивность и динамика формирования НВЛ были значительно ниже, чем в ответ на планктонные формы *C. glabrata*. Из этого авторы заключили, что отсроченное и нарушенное высвобождение НВЛ является потенциальным механизмом эвазии биопленок *C. glabrata* от врожденного иммунитета [7].

Использование дифенилен-йодония, фармакологического ингибитора NADPH-оксидазы [32], не влияло на нетоз, индуцированный биопленочными формами *C. glabrata*, предполагая участие альтернативного, АФК-независимого пути высвобождения НВЛ. При этом авторы установили, что как биопленочные, так и планктонные формы *C. glabrata* индуцируют высвобождение НВЛ через фагоцитоз-зависимый путь, отличный от механизма индукции ФМА. Данный процесс включает фагоцитоз дрожжевых клеток с последующей экструзией ДНК с цитруллинированными гистонами и гибелью нейтрофила. В то время как гифальные формы *C. albicans* являются более мощным триггером для высвобождения НВЛ, чем дрожжевые [81, 87], индукция нетоза с помощью дрожжевых морфотипов *C. glabrata* указывает на различия нейтрофильного ответа и подчеркивает важность индивидуального для каждого вида изучения взаимодействий хозяина и патогена [7]. В основе различий НВЛ-формирования в ответ на биопленки *C. albicans* и *C. glabrata* могут лежать отличия в структуре биопленочной архитектуры и/или внеклеточного матрикса. Таким образом, несмотря на то, что биопленки *C. glabrata*, в отличие от *C. albicans*, «дозволяют» НВЛ высвободиться, хотя и в меньшей степени, чем планктонные формы, ингибирующая НВЛ-модифицирующая активность и нарушение функций нейтрофилов — это общая черта биопленок разных видов *Candida*, служащая для избежания нейтрофильной атаки [7].

Заключение

Влияние биопленочных микроорганизмов на функции нейтрофилов, в частности на формирование НВЛ, неоднозначно, порой разнонаправленно и зависит от ряда факторов, включая как особенности самого возбудителя, так и условия проведения экспериментальных исследований *in vitro* и *in vivo*. Однако не вызывает сомнений, что микробные биопленки, являясь целью нейтрофилов, пытаются не только «разоружить» противника, но и использовать его оружие для достижения своих целей. Дальнейшее детальное изучение взаимоотношений микробов в биопленках и НВЛ поможет не только расширить наши представления о механизмах персистенции возбудителей биопленочных инфекций, но и, возможно, разработать новые подходы к их лечению.

ЛИТЕРАТУРА

1. Brinkmann V., Reichard U., Goosmann C., Fauler B., Uhlemann Y., Weiss D.S., et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*. 2004; 303(5663): 1532–5. <https://doi.org/10.1126/science.1092385>
2. Brinkmann V. Neutrophil extracellular traps in the second decade. *J. Innate Immun*. 2018; 10(5-6): 414–21. <https://doi.org/10.1159/000489829>
3. Saitoh T., Komano J., Saitoh Y., Misawa T., Takahama M., Kozaki T., et al. Neutrophil extracellular traps mediate a host defense response to human immunodeficiency virus-1. *Cell Host Microbe*. 2012; 12(1): 109–16. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.05.015>
4. Jenne C.N., Wong C.H.Y., Zemp F.J., McDonald B., Rahman M.M., Forsyth P.A., et al. Neutrophils recruited to sites of infection protect from virus challenge by releasing neutrophil extracellular traps. *Cell Host Microbe*. 2013; 13(2): 169–80. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.01.005>
5. Nel J.G., Theron A.J., Pool R., Durandt C., Tintinger G.R., Anderson R. Neutrophil extracellular traps and their role in health and disease. *South Afr. J. Sci.* 2016; 112(1/2). <https://doi.org/10.17159/sajs.2016/20150072>
6. Schönrich G., Raftery M.J. Neutrophil extracellular traps go viral. *Front. Immunol.* 2016; 7: 366. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00366>
7. Johnson C.J., Kernien J.F., Hoyer A.R., Nett J.E. Mechanisms involved in the triggering of neutrophil extracellular traps (NETs) by *Candida glabrata* during planktonic and biofilm growth. *Sci. Rep.* 2017; 7: 13065. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13588-6>
8. Seki M. The role of neutrophil extracellular traps in infectious diseases. *J. Infect. Dis. Ther.* 2017; 5(3). <https://doi.org/10.4172/2332-0877.1000321>
9. Burgener S.S., Schroder K. Neutrophil extracellular traps in host defense. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2019; 12(7): a037028. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a037028>
10. Costerton J.W., Stewart P.S., Greenberg E.P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*. 1999; 284(5418): 1318–22. <https://doi.org/10.1126/science.284.5418.1318>
11. Meyle E., Stroh P., Günther F., Hoppy-Tichy T., Wagner C., Hänsch G.M. Destruction of bacterial biofilms by polymorphonuclear neutrophils: relative contribution of phagocytosis, DNA release, and degranulation. *Int J. Artif. Organs*. 2010; 33(9): 608–20. <https://doi.org/10.1177/039139881003300906>
12. Høiby N., Bjarnsholt T., Moser C., Jensen P.Ø., Kolpen M., Qvist T., et al. Diagnosis of biofilm infections in cystic fibrosis patients. *APMIS*. 2017; 125(4): 339–43. <https://doi.org/10.1111/apm.12689>
13. Khatoun Z., McTiernan C.D., Suuronen E.J., Mah T.F., Alarcon E.I. Bacterial biofilm formation on implantable devices and approaches to its treatment and prevention. *Heliyon*. 2018 4(12): e01067. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e01067>
14. Борисова М.И., Лазакович Д.Н., Сидорова Н.А., Савушкин А.И. Биопленкообразующая активность и феномен персистенции микроорганизмов. *Journal of Biomedical Technologies*. 2015; (2): 28–35.
15. Чеботарь И.В. Механизмы антибиопленочного иммунитета. *Вестник Российской академии медицинских наук*. 2012; 67(12): 22–9.
16. Zarnowski R., Westler W.M., Lacmbouh G.A., Marita J.M., Bothe J.R., Bernhardt J., et al. Novel entries in a fungal biofilm matrix encyclopedia. *mBio*. 2014; 5(4): e01333-14. <https://doi.org/10.1128/mBio.01333-14>
17. Wang S., Liu X., Liu H., Zhang L., Guo Y., Yu S., et al. The exopolysaccharide psl–eDNA interaction enables the formation of a biofilm skeleton in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol. Rep.* 2015; 7(2): 330–40. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12252>
18. Lee K., Yoon S.S. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm, a programmed bacterial life for fitness. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2017; 27(6): 1053–64. <https://doi.org/10.4014/jmb.1611.11056>
19. Ray V.A., Hill P.J., Stover C.K., Roy S., Sen C.K., Yu L., et al. Anti-psl targeting of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms for neutrophil-mediated disruption. *Sci. Rep.* 2017; 7(1): 16065. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16215-6>
20. Galdiero E., Lombardi L., Falanga A., Libralato G., Guida M., Carotenuto R. Biofilms: novel strategies based on antimicrobial peptides. *Pharmaceutics*. 2019; 11(7): 322. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11070322>
21. Geddes-McAlister J., Kugadas A., Gadjeva M. Tasked with a challenging objective: why do neutrophils fail to battle *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Pathogens*. 2019; 8(4): 283. <https://doi.org/10.3390/pathogens8040283>
22. Deng B., Ghatak S., Sarkar S., Singh K., Das Ghatak P., Mathew-Steiner S.S., et al. Novel bacterial diversity and fragmented eDNA identified in hyperbiofilm-forming *Pseudomonas aeruginosa* rugose small colony variant. *iScience*. 2020; 23(2): 100827. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.100827>
23. Omar A., Wright J.B., Schultz G., Burrell R., Nadworny P. Microbial biofilms and chronic wounds. *Microorganisms*. 2017; 5(1): 9. <https://doi.org/10.3390/microorganisms5010009>
24. Zawrotniak M., Wojtalik K., Rapala-Kozik M. Farnesol, a quorum-sensing molecule of *Candida albicans* triggers the release of neutrophil extracellular traps. *Cells*. 2019; 8(12): 1611. <https://doi.org/10.3390/cells8121611>
25. Urban C.F., Ermer D., Schmid M., Abu-Abed U., Goosmann C., Nacken W., et al. Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. *PLoS Pathog.* 2009; 5(10): e1000639. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000639>
26. Khandpur R., Carmona-Rivera C., Vivekanandan-Giri A., Gizinski A., Yalavarthi S., Knight J.S., et al. NETs are a source of citrullinated autoantigens and stimulate inflammatory responses in rheumatoid arthritis. *Sci. Transl. Med.* 2013; 5(178): 178ra40. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3005580>
27. Dwyer M., Shan Q., D'Ortona S., Maurer R., Mitchell R., Olesen H., et al. Cystic fibrosis sputum DNA has NETosis characteristics and neutrophil extracellular trap release is regulated by macrophage migration-inhibitory factor. *J. Innate Immun.* 2014; 6(6): 765–79. <https://doi.org/10.1159/000363242>
28. Rahman S., Gadjeva M. Does NETosis contribute to the bacterial pathoadaptation in cystic fibrosis? *Front. Immunol.* 2014; 5: 378. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00378>
29. Ravindran M., Khan M.A., Palaniyar N. Neutrophil extracellular trap formation: physiology, pathology, and pharmacology. *Biomolecules*. 2019; 9(8): 365. <https://doi.org/10.3390/biom9080365>
30. Takishita Y., Yasuda H., Shimizu M., Matsuo A., Morita A., Tsutsumi T., et al. Formation of neutrophil extracellular traps in mitochondrial DNA-deficient cells. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 2020; 66(1): 15–23. <https://doi.org/10.3164/jcbs.19-77>
31. Kaplan M.J., Radic M. Neutrophil extracellular traps: double-edged swords of innate immunity. *J. Immunol.* 2012; 189(6): 2689–95. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201719>
32. Fuchs T.A., Abed U., Goosmann C., Hurwitz R., Schulze I., Wahn V., et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J. Cell Biol.* 2007; 176(2): 231–41. <https://doi.org/10.1083/jcb.200606027>
33. Долгушин И.И., Андреева Ю.С., Савочкина А.Ю. *Нейтрофильные внеклеточные ловушки и методы оценки функционального статуса нейтрофилов*. М.; 2009.
34. Papaayannopoulos V., Metzler K.D., Hakkim A., Zychlinsky A. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *J. Cell. Biol.* 2010; 191(3): 677–91. <https://doi.org/10.1083/jcb.201006052>
35. Долгушин И.И., Савочкина А.Ю., Курносенко И.В., Долгушина В.Ф., Савельева А.А., Самусева И.В. и др. Участие

- внеклеточных ДНК-ловушек в защитных и патологических реакциях организма. *Российский иммунологический журнал*. 2015; 9(2): 164–70.
36. Sollberger G., Choidas A., Burn G.L., Habenberger P., Di Lucrezia R., Kordes S., et al. Gasdermin D plays a vital role in the generation of neutrophil extracellular traps. *Sci. Immunol.* 2018; 3(26): eaar6689. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aar6689>
37. Thiam H.R., Wong S.L., Qiu R., Kittisopikul M., Vahabikashi A., Goldman A.E., et al. NETosis proceeds by cytoskeleton and endomembrane disassembly and PAD4-mediated chromatin decondensation and nuclear envelope rupture. *PNAS.* 2020; 117(13): 7326–37. <https://doi.org/10.1073/pnas.1909546117>
38. Neeli I., Radic M. Opposition between PKC isoforms regulates histone deimination and neutrophil extracellular chromatin release. *Front. Immunol.* 2013; 4: 38. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00038>
39. Douda D.N., Khan M.A., Grasmann H., Palaniyar N. SK3 channel and mitochondrial ROS mediate NADPH oxidase-independent NETosis induced by calcium influx. *PNAS.* 2015; 112(9): 2817–22. <https://doi.org/10.1073/pnas.1414055112>
40. Li P., Li M., Lindberg M.R., Kennett M.J., Xiong N., Wang Y. PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps. *J. Exp. Med.* 2010; 207(9): 1853–62. <https://doi.org/10.1084/jem.20100239>
41. Tasiy O., McDonald P.P. Physiological stimuli induce PAD4-dependent, ROS-independent NETosis, with early and late events controlled by discrete signaling pathways. *Front. Immunol.* 2018; 9: 2036. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02036>
42. Parker H., Dragunow M., Hampton M.B., Kettle A.J., Winterbourn C.C. Requirements for NADPH oxidase and myeloperoxidase in neutrophil extracellular trap formation differ depending on the stimulus. *J. Leukoc. Biol.* 2012; 92(4): 841–9. <https://doi.org/10.1189/jlb.1211601>
43. Kenny E.F., Herzig A., Krüger R., Muth A., Mondal S., Thompson P.R., et al. Diverse stimuli engage different neutrophil extracellular trap pathways. *ELife.* 2017; 6: e24437. <https://doi.org/10.7554/elife.24437>
44. Naffah de Souza C., Breda L.C.D., Khan M.A., de Almeida S.R., Camara N.O.S., Swezey N., et al. Promotes NADPH oxidase-independent neutrophil extracellular trap formation: a matter of mitochondrial reactive oxygen species generation and citrullination and cleavage of histone. *Front. Immunol.* 2017; 8: 1849. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01849>
45. Chatfield S.M., Grebe K., Whitehead L.W., Rogers K.L., Nebl T., Murphy J.M., et al. Monosodium urate crystals generate nuclease-resistant neutrophil extracellular traps via a distinct molecular pathway. *J. Immunol.* 2018; 200(5): 1802–16. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1701382>
46. Khan M.A., Pace-Asciak C., Al-Hassan J.M., Afzal M., Liu Y.F., Oommen S., et al. Furanoid f-acid F6 uniquely induces NETosis compared to C16 and C18 fatty acids in human neutrophils. *Biomolecules.* 2018; 8(4): 144. <https://doi.org/10.3390/biom8040144>
47. Khan M.A., Ali Z.S., Swezey N., Grasmann H., Palaniyar N. Progression of cystic fibrosis lung disease from childhood to adulthood: neutrophils, neutrophil extracellular trap (NET) formation, and NET degradation. *Genes.* 2019; 10(3): 183. <https://doi.org/10.3390/genes10030183>
48. Zhou Y., Song K., Painter R.G., Aiken M., Reiser J., Stanton B.A., et al. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator recruitment to phagosomes in neutrophils. *J. Innate Immun.* 2013; 5(3): 219–30. <https://doi.org/10.1159/000346568>
49. Rada B. Interactions between neutrophils and *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *Pathogens.* 2017; 6(1): 10. <https://doi.org/10.3390/pathogens6010010>
50. Hayes E., Pohl K., McElvaney N.G., Reeves E.P. The cystic fibrosis neutrophil: a specialized yet potentially defective cell. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)* 2011; 59(2): 97–112. <https://doi.org/10.1007/s00005-011-0113-6>
51. Walker T.S., Tomlin K.L., Worthen G.S., Poch K.R., Lieber J.G., Saavedra M.T., et al. Enhanced *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development mediated by human neutrophils. *Infect. Immun.* 2005; 73(6): 3693–701. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.6.3693-3701.2005>
52. Parks Q.M., Young R.L., Poch K.R., Malcolm K.C., Vasil M.L., Nick J.A. Neutrophil enhancement of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development: human f-actin and DNA as targets for therapy. *J. Med. Microbiol.* 2009; 58(4): 492–502. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.005728-0>
53. Robertson D.M., Parks Q.M., Young R.L., Kret J., Poch K.R., Malcolm K.C., et al. Disruption of contact lens-associated *Pseudomonas aeruginosa* biofilms formed in the presence of neutrophils. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2011; 52(5): 2844–50. <https://doi.org/10.1167/iovs.10-6469>
54. Floyd M., Winn M., Cullen C., Sil P., Chassaing B., Yoo D.G., et al. Swimming motility mediates the formation of neutrophil extracellular traps induced by flagellated *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Pathog.* 2016; 12(11): e1005987. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005987>
55. Rada B., Jendrysik M.A., Pang L., Hayes C.P., Yoo D.G., Park J.J., et al. Pyocyanin-enhanced neutrophil extracellular trap formation requires the NADPH oxidase. *PLoS One.* 2013; 8(1): e54205. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054205>
56. Rada B., Lekstrom K., Damian S., Dupuy C., Leto T.L. The pseudomonas toxin pyocyanin inhibits the dual oxidase-based antimicrobial system as it imposes oxidative stress on airway epithelial cells. *J. Immunol.* 2008; 181(7): 4883–93. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.7.4883>
57. Rada B., Leto T.L. Redox warfare between airway epithelial cells and pseudomonas: dual oxidase versus pyocyanin. *Immunol. Res.* 2009; 43(1-3): 198–209. <https://doi.org/10.1007/s12026-008-8071-8>
58. Rada B., Gardina P., Myers T.G., Leto T.L. Reactive oxygen species mediate inflammatory cytokine release and EGFR-dependent mucin secretion in airway epithelial cells exposed to *Pseudomonas pyocyanin*. *Mucosal Immunol.* 2011; 4(2): 158–71. <https://doi.org/10.1038/mi.2010.62>
59. Лазарева А.В., Чеботарь И.В., Крыжановская О.А., Чеботарь В.И., Маянский Н.А. *Pseudomonas aeruginosa*: патогенность, патогенез и патология. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия.* 2015; 17(3): 170–86.
60. Skorpelja-Gardner S., Theprungsirikul J., Lewis K.A., Hammond J.H., Carlson K.M., Hazlett H.F., et al. Regulation of *Pseudomonas aeruginosa*-mediated neutrophil extracellular traps. *Front. Immunol.* 2019; 10: 1670. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01670>
61. Young R.L., Malcolm K.C., Kret J.E., Caceres S.M., Poch K.R., Nichols D.P., et al. Neutrophil extracellular trap (NET)-mediated killing of *Pseudomonas aeruginosa*: evidence of acquired resistance within the CF airway, independent of CFTR. *PLoS One.* 2011; 6(9): e23637. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023637>
62. Limoli D.H., Rockel A.B., Host K.M., Jha A., Kopp B.T., Hollis T., et al. Cationic antimicrobial peptides promote microbial mutagenesis and pathoadaptation in chronic infections. *PLoS Pathog.* 2014; 10(4): e1004083. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004083>
63. Feltner J.B., Wolter D.J., Pope C.E., Groleau M.C., Smalley N.E., Greenberg E.P., et al. LasR variant cystic fibrosis isolates reveal an adaptable quorum-sensing hierarchy in *Pseudomonas aeruginosa*. *mBio.* 2016; 7(5): e01513–6. <https://doi.org/10.1128/mBio.01513-16>
64. Hoffman L.R., Kulasekara H.D., Emerson J., Houston L.S., Burns J.L., Ramsey B.W., et al. *Pseudomonas aeruginosa* lasR mutants are associated with cystic fibrosis lung disease progression. *J. Cyst. Fibros.* 2009; 8(1): 66–70. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2008.09.006>

65. Thanabalasuriar A., Scott B.N.V., Peiseler M., Willson M.E., Zeng Z., Warrener P., et al. Neutrophil extracellular traps confine *Pseudomonas aeruginosa* ocular biofilms and restrict brain invasion. *Cell Host Microbe*. 2019; 25(4): 526–36. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.02.007>
66. Alhede M., Qvortrup K., Kragh K.N., Jensen P.Ø., Stewart P.S., Bjarnsholt T. The origin of extracellular DNA in bacterial biofilm infections *in vivo*. *Pathogens Dis*. 2020; 78(2): ftaa018. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftaa018>
67. Lew D.P., Waldvogel F.A. Osteomyelitis. *Lancet*. 2004; 364(9431): 369–79. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)16727-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)16727-5)
68. Brady R.A., Leid J.G., Calhoun J.H., Costerton J.W., Shirtliff M.E. Osteomyelitis and the role of biofilms in chronic infection. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2008; 52(1): 13–22. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2007.00357.x>
69. Ashong C.N., Raheem S.A., Hunter A.S., Mindru C., Barshes N.R. Methicillin-resistant staphylococcus aureus in foot osteomyelitis. *Surg. Infect.* 2017; 18(2): 143–8. <https://doi.org/10.1089/sur.2016.165>
70. Ferrando A., Part J., Baeza J. Treatment of cavitory bone defects in chronic osteomyelitis: biogactive glass S53P4 vs. calcium sulphate antibiotic beads. *J. Bone Jt. Infect.* 2017; 2(4): 194–201. <https://doi.org/10.7150/jbji.20404>
71. de Vor L., Rooijackers S.H.M., van Strijp J.A.G. Staphylococci evade the innate immune response by disarming neutrophils and forming biofilms. *FEBS Lett.* 2020; 594(16): 2556–69. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13767>
72. Bhattacharya M., Berends E.T.M., Chan R., Schwab E., Roy S., Sen C.K., et al. *Staphylococcus aureus* biofilms release leukocidins to elicit extracellular trap formation and evade neutrophil-mediated killing. *PNAS*. 2018; 115(28): 7416–21. <https://doi.org/10.1073/pnas.1721949115>
73. Sultan A.R., Hoppenbrouwers T., Lemmens-den Toom N.A., Snijders S.V., van Neck J.W., Verbon A., et al. During the early stages of *Staphylococcus aureus* biofilm formation, induced neutrophil extracellular traps (NETs) are degraded by autologous thermonuclease. *Infect. Immun.* 2019; 87(12): e00605-19. <https://doi.org/10.1128/IAI.00605-19>
74. Montanaro L., Poggi A., Visai L., Ravaoli S., Campoccia D., Speziale P., et al. Extracellular DNA in biofilms. *Int. J. Artif. Organs*. 2011; 34(9): 824–31. <https://doi.org/10.5301/ijao.5000051>
75. Whitchurch C.B., Tolker-Nielsen T., Ragas P.C., Mattick J.S. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science*. 2002; 295(5559): 1487. <https://doi.org/10.1126/science.295.5559.1487>
76. Grande R., Nistico L., Sambanthamoorthy K., Longwell M., Iannitelli A., Cellini L., et al. Temporal expression of agrB, cidA, and alsS in the early development of *Staphylococcus aureus* UAMS-1 biofilm formation and the structural role of extracellular DNA and carbohydrates. *Pathog. Dis*. 2014; 70(3): 414–22. <https://doi.org/10.1111/2049-632x.12158>
77. Moormeier D.E., Bose J.L., Horswill A.R., Bayles K.W. Temporal and stochastic control of *Staphylococcus aureus* biofilm development. *mBio*. 2014; 5(5): e01341-14. <https://doi.org/10.1128/mBio.01341-14>
78. Johnson C.J., Cabezas-Olcoz J., Kernien J.F., Wang S.X., Beebe D.J., Huttenlocher A., et al. The extracellular matrix of *Candida albicans* biofilms impairs formation of neutrophil extracellular traps. *PLoS Pathog*. 2016; 12(9): e1005884. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005884>
79. Kernien J.F., Johnson C.J., Nett J.E. Conserved inhibition of neutrophil extracellular trap release by clinical *Candida albicans* biofilms. *J. Fungi*. 2017; 3(3): 49. <https://doi.org/10.3390/jof3030049>
80. Hoyer A.R., Johnson C.J., Hoyer M.R., Kernien J.F., Nett J.E. Echinocandin treatment of candida albicans biofilms enhances neutrophil extracellular trap formation. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2018; 62(9): e00797–18. <https://doi.org/10.1128/AAC.00797-18>
81. Branzk N., Lubojemska A., Hardison S.E., Wang Q., Gutierrez M.G., Brown G.D., et al. Neutrophils sense microbe size and selectively release neutrophil extracellular traps in response to large pathogens. *Nat. Immunol.* 2014; 15(11): 1017–25. <https://doi.org/10.1038/ni.2987>
82. Uppuluri P., Chaturvedi A.K., Srinivasan A., Banerjee M., Ramasubramanian A.K., Köhler J.R., et al. Dispersion as an important step in the candida albicans biofilm developmental cycle. *PLoS Pathog*. 2010; 6(3): e1000828. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000828>
83. Hopke A., Nicke N., Hidu E.E., Degani G., Popolo L., Wheeler R.T. Neutrophil attack triggers extracellular trap-dependent *Candida* cell wall remodeling and altered immune recognition. *PLoS Pathog*. 2016; 12(5): e1005644. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005644>
84. Katragkou A., Kruhlak M.J., Simitopoulou M., Chatzimousschou A., Taparkou A., Cotten C.J., et al. Interactions between human phagocytes and candida albicans biofilms alone and in combination with antifungal agents. *J. Infect. Dis*. 2010; 201(12): 1941–9. <https://doi.org/10.1086/652783>
85. Byrd A.S., O'Brien X.M., Johnson C.M., Lavigne L.M., Reicher J.S. An extracellular matrix-based mechanism of rapid neutrophil extracellular trap formation in response to *Candida albicans*. *J. Infect. Dis*. 2010; 201(12): 1941–49. <https://doi.org/10.1086/652783>
86. Шпаков А.О. Внутри- и межвидовая хемокоммуникация у грибов. *Микология и фитопатология*. 2009; 43(6): 490–505.
87. Kenno S., Perito S., Mosci P., Vecchiarelli A., Monari C. Autophagy and reactive oxygen species are involved in neutrophil extracellular traps release induced by *C. albicans* morphotypes. *Front. Microbiol.* 2016; 7: 879. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00879>

REFERENCES

1. Brinkmann V., Reichard U., Goosmann C., Fauler B., Uhlemann Y., Weiss D.S., et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*. 2004; 303(5663): 1532–5. <https://doi.org/10.1126/science.1092385>
2. Brinkmann V. Neutrophil extracellular traps in the second decade. *J. Innate Immun.* 2018; 10(5-6): 414–21. <https://doi.org/10.1159/000489829>
3. Saitoh T., Komano J., Saitoh Y., Misawa T., Takahama M., Kozaki T., et al. Neutrophil extracellular traps mediate a host defense response to human immunodeficiency virus-1. *Cell Host Microbe*. 2012; 12(1): 109–16. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.05.015>
4. Jenne C.N., Wong C.H.Y., Zemp F.J., McDonald B., Rahman M.M., Forsyth P.A., et al. Neutrophils recruited to sites of infection protect from virus challenge by releasing neutrophil extracellular traps. *Cell Host Microbe*. 2013; 13(2): 169–80. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.01.005>
5. Nel J.G., Theron A.J., Pool R., Durandt C., Tintinger G.R., Anderson R. Neutrophil extracellular traps and their role in health and disease. *South Afr. J. Sci.* 2016; 112(1/2). <https://doi.org/10.17159/sajs.2016/20150072>
6. Schönrich G., Raftery M.J. Neutrophil extracellular traps go viral. *Front. Immunol.* 2016; 7: 366. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00366>
7. Johnson C.J., Kernien J.F., Hoyer A.R., Nett J.E. Mechanisms involved in the triggering of neutrophil extracellular traps (NETs) by *Candida glabrata* during planktonic and biofilm growth. *Sci. Rep.* 2017; 7: 13065. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13588-6>
8. Seki M. The role of neutrophil extracellular traps in infectious diseases. *J. Infect. Dis. Ther.* 2017; 5(3). <https://doi.org/10.4172/2332-0877.1000321>

9. Burgener S.S., Schroder K. Neutrophil extracellular traps in host defense. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2019; 12(7): a037028. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a037028>
10. Costerton J.W., Stewart P.S., Greenberg E.P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science.* 1999; 284(5418): 1318–22. <https://doi.org/10.1126/science.284.5418.1318>
11. Meyle E., Stroh P., Günther F., Hoppy-Tichy T., Wagner C., Hänsch G.M. Destruction of bacterial biofilms by polymorphonuclear neutrophils: relative contribution of phagocytosis, DNA release, and degranulation. *Int J. Artif. Organs.* 2010; 33(9): 608–20. <https://doi.org/10.1177/039139881003300906>
12. Høiby N., Bjarnsholt T., Moser C., Jensen P.Ø., Kolpen M., Qvist T., et al. Diagnosis of biofilm infections in cystic fibrosis patients. *APMIS.* 2017; 125(4): 339–43. <https://doi.org/10.1111/apm.12689>
13. Khatoun Z., McTiernan C.D., Suuronen E.J., Mah T.F., Alarcon E.I. Bacterial biofilm formation on implantable devices and approaches to its treatment and prevention. *Heliyon.* 2018 4(12): e01067. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e01067>
14. Borisova M.I., Lazakovich D.N., Sidorova N.A., Savushkin A.I. Biofilm-forming activity and the phenomenon of persistence in microorganisms. *Journal of Biomedical Technologies.* 2015; (2): 28–35. (in Russian)
15. Chebotar' I.V. Mechanisms of antibiofilm immunity. *Vestnik Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk.* 2012; 67(12): 22–9. (in Russian)
16. Zarnowski R., Westler W.M., Lacmbouh G.A., Marita J.M., Bothe J.R., Bernhardt J., et al. Novel entries in a fungal biofilm matrix encyclopedia. *mBio.* 2014; 5(4): e01333-14. <https://doi.org/10.1128/mBio.01333-14>
17. Wang S., Liu X., Liu H., Zhang L., Guo Y., Yu S., et al. The exopolysaccharide psl–eDNA interaction enables the formation of a biofilm skeleton in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol. Rep.* 2015; 7(2): 330–40. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12252>
18. Lee K., Yoon S.S. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm, a programmed bacterial life for fitness. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2017; 27(6): 1053–64. <https://doi.org/10.4014/jmb.1611.11056>
19. Ray V.A., Hill P.J., Stover C.K., Roy S., Sen C.K., Yu L., et al. Anti-psl targeting of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms for neutrophil-mediated disruption. *Sci. Rep.* 2017; 7(1): 16065. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16215-6>
20. Galdiero E., Lombardi L., Falanga A., Libralato G., Guida M., Carotenuto R. Biofilms: novel strategies based on antimicrobial peptides. *Pharmaceutics.* 2019; 11(7): 322. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11070322>
21. Geddes-McAlister J., Kugadas A., Gadjeva M. Tasked with a challenging objective: why do neutrophils fail to battle *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Pathogens.* 2019; 8(4): 283. <https://doi.org/10.3390/pathogens8040283>
22. Deng B., Ghatak S., Sarkar S., Singh K., Das Ghatak P., Matthew-Steiner S.S., et al. Novel bacterial diversity and fragmented eDNA identified in hyperbiofilm-forming *Pseudomonas aeruginosa* rugose small colony variant. *iScience.* 2020; 23(2): 100827. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.100827>
23. Omar A., Wright J.B., Schultz G., Burrell R., Nadworny P. Microbial biofilms and chronic wounds. *Microorganisms.* 2017; 5(1): 9. <https://doi.org/10.3390/microorganisms5010009>
24. Zawrotniak M., Wojtalik K., Rapala-Kozik M. Farnesol, a quorum-sensing molecule of *Candida albicans* triggers the release of neutrophil extracellular traps. *Cells.* 2019; 8(12): 1611. <https://doi.org/10.3390/cells8121611>
25. Urban C.F., Ermert D., Schmid M., Abu-Abed U., Goosmann C., Nacken W., et al. Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. *PLoS Pathog.* 2009; 5(10): e1000639. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000639>
26. Khandpur R., Carmona-Rivera C., Vivekanandan-Giri A., Gizinski A., Yalavarthi S., Knight J.S., et al. NETs are a source of citrullinated autoantigens and stimulate inflammatory responses in rheumatoid arthritis. *Sci. Transl. Med.* 2013; 5(178): 178ra40. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3005580>
27. Dwyer M., Shan Q., D'Ortona S., Maurer R., Mitchell R., Olesen H., et al. Cystic fibrosis sputum DNA has NETosis characteristics and neutrophil extracellular trap release is regulated by macrophage migration-inhibitory factor. *J. Innate Immun.* 2014; 6(6): 765–79. <https://doi.org/10.1159/000363242>
28. Rahman S., Gadjeva M. Does NETosis contribute to the bacterial pathoadaptation in cystic fibrosis? *Front. Immunol.* 2014; 5: 378. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00378>
29. Ravindran M., Khan M.A., Palaniyar N. Neutrophil extracellular trap formation: physiology, pathology, and pharmacology. *Biomolecules.* 2019; 9(8): 365. <https://doi.org/10.3390/biom9080365>
30. Takishita Y., Yasuda H., Shimizu M., Matsuo A., Morita A., Tsutsumi T., et al. Formation of neutrophil extracellular traps in mitochondrial DNA-deficient cells. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 2020; 66(1): 15–23. <https://doi.org/10.3164/jcbn.19-77>
31. Kaplan M.J., Radic M. Neutrophil extracellular traps: double-edged swords of innate immunity. *J. Immunol.* 2012; 189(6): 2689–95. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201719>
32. Fuchs T.A., Abed U., Goosmann C., Hurwitz R., Schulze I., Wahn V., et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J. Cell Biol.* 2007; 176(2): 231–41. <https://doi.org/10.1083/jcb.200606027>
33. Dolgushin I.I., Andreeva Yu.S., Savochkina A.Yu. *Neutrophil Extracellular Traps and Methods for Evaluating the Functional Status of Neutrophils [Neytrofil'nye vnekletochnye lovushki i metody otsenki funktsional'nogo statusa neytrofilov]*. Moscow; 2009. (in Russian)
34. Papayannopoulos V., Metzler K.D., Hakkim A., Zychlinsky A. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *J. Cell Biol.* 2010; 191(3): 677–91. <https://doi.org/10.1083/jcb.201006052>
35. Dolgushin I.I., Savochkina A.Yu., Kurnosenko I.V., Dolgushina V.F., Savel'eva A.A., Samuseva I.V. i dr. Participation of extracellular dna traps in protective and pathological reactions of the organism. *Rossiyskiy immunologicheskij zhurnal.* 2015; 9(2): 164–70. (in Russian)
36. Sollberger G., Choidas A., Burn G.L., Habenberger P., Di Lucrezia R., Kordes S., et al. Gasdermin D plays a vital role in the generation of neutrophil extracellular traps. *Sci. Immunol.* 2018; 3(26): eaar6689. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aar6689>
37. Thiam H.R., Wong S.L., Qiu R., Kittisopikul M., Vahabikashi A., Goldman A.E., et al. NETosis proceeds by cytoskeleton and endomembrane disassembly and PAD4-mediated chromatin decondensation and nuclear envelope rupture. *PNAS.* 2020; 117(13): 7326–37. <https://doi.org/10.1073/pnas.1909546117>
38. Neeli I., Radic M. Opposition between PKC isoforms regulates histone deimination and neutrophil extracellular chromatin release. *Front. Immunol.* 2013; 4: 38. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00038>
39. Douda D.N., Khan M.A., Grasemann H., Palaniyar N. SK3 channel and mitochondrial ROS mediate NADPH oxidase-independent NETosis induced by calcium influx. *PNAS.* 2015; 112(9): 2817–22. <https://doi.org/10.1073/pnas.1414055112>
40. Li P., Li M., Lindberg M.R., Kennett M.J., Xiong N., Wang Y. PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps. *J. Exp. Med.* 2010; 207(9): 1853–62. <https://doi.org/10.1084/jem.20100239>
41. Tsiy O., McDonald P.P. Physiological stimuli induce PAD4-dependent, ROS-independent NETosis, with early and late events controlled by discrete signaling pathways. *Front. Immunol.* 2018; 9: 2036. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02036>

42. Parker H., Dragunow M., Hampton M.B., Kettle A.J., Winterbourn C.C. Requirements for NADPH oxidase and myeloperoxidase in neutrophil extracellular trap formation differ depending on the stimulus. *J. Leukoc. Biol.* 2012; 92(4): 841–9. <https://doi.org/10.1189/jlb.1211601>
43. Kenny E.F., Herzog A., Krüger R., Muth A., Mondal S., Thompson P.R., et al. Diverse stimuli engage different neutrophil extracellular trap pathways. *ELife.* 2017; 6: e24437. <https://doi.org/10.7554/elife.24437>
44. Naffah de Souza C., Breda L.C.D., Khan M.A., de Almeida S.R., Camara N.O.S., Swezey N., et al. Promotes NADPH oxidase-independent neutrophil extracellular trap formation: a matter of mitochondrial reactive oxygen species generation and citrullination and cleavage of histone. *Front. Immunol.* 2017; 8: 1849. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01849>
45. Chatfield S.M., Grebe K., Whitehead L.W., Rogers K.L., Nebl T., Murphy J.M., et al. Monosodium urate crystals generate nuclease-resistant neutrophil extracellular traps via a distinct molecular pathway. *J. Immunol.* 2018; 200(5): 1802–16. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1701382>
46. Khan M.A., Pace-Asciak C., Al-Hassan J.M., Afzal M., Liu Y.F., Oommen S., et al. Furanoid f-acid F6 uniquely induces NETosis compared to C16 and C18 fatty acids in human neutrophils. *Biomolecules.* 2018; 8(4): 144. <https://doi.org/10.3390/biom8040144>
47. Khan M.A., Ali Z.S., Swezey N., Grasmann H., Palaniyar N. Progression of cystic fibrosis lung disease from childhood to adulthood: neutrophils, neutrophil extracellular trap (NET) formation, and NET degradation. *Genes.* 2019; 10(3): 183. <https://doi.org/10.3390/genes10030183>
48. Zhou Y., Song K., Painter R.G., Aiken M., Reiser J., Stanton B.A., et al. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator recruitment to phagosomes in neutrophils. *J. Innate Immun.* 2013; 5(3): 219–30. <https://doi.org/10.1159/000346568>
49. Rada B. Interactions between neutrophils and *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *Pathogens.* 2017; 6(1): 10. <https://doi.org/10.3390/pathogens6010010>
50. Hayes E., Pohl K., McElvaney N.G., Reeves E.P. The cystic fibrosis neutrophil: a specialized yet potentially defective cell. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)* 2011; 59(2): 97–112. <https://doi.org/10.1007/s00005-011-0113-6>
51. Walker T.S., Tomlin K.L., Worthen G.S., Poch K.R., Lieber J.G., Saavedra M.T., et al. Enhanced *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development mediated by human neutrophils. *Infect. Immun.* 2005; 73(6): 3693–701. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.6.3693-3701.2005>
52. Parks Q.M., Young R.L., Poch K.R., Malcolm K.C., Vasil M.L., Nick J.A. Neutrophil enhancement of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development: human f-actin and DNA as targets for therapy. *J. Med. Microbiol.* 2009; 58(4): 492–502. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.005728-0>
53. Robertson D.M., Parks Q.M., Young R.L., Kret J., Poch K.R., Malcolm K.C., et al. Disruption of contact lens-associated *Pseudomonas aeruginosa* biofilms formed in the presence of neutrophils. *Invest. Ophthalmol Vis. Sci.* 2011; 52(5): 2844–50. <https://doi.org/10.1167/iovs.10-6469>
54. Floyd M., Winn M., Cullen C., Sil P., Chassaing B., Yoo D.G., et al. Swimming motility mediates the formation of neutrophil extracellular traps induced by flagellated *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Pathog.* 2016; 12(11): e1005987. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005987>
55. Rada B., Jendrysik M.A., Pang L., Hayes C.P., Yoo D.G., Park J.J., et al. Pyocyanin-enhanced neutrophil extracellular trap formation requires the NADPH oxidase. *PLoS One.* 2013; 8(1): e54205. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054205>
56. Rada B., Lekstrom K., Damian S., Dupuy C., Leto T.L. The *Pseudomonas* toxin pyocyanin inhibits the dual oxidase-based antimicrobial system as it imposes oxidative stress on airway epithelial cells. *J. Immunol.* 2008; 181(7): 4883–93. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.7.4883>
57. Rada B., Leto T.L. Redox warfare between airway epithelial cells and pseudomonas: dual oxidase versus pyocyanin. *Immunol. Res.* 2009; 43(1-3): 198–209. <https://doi.org/10.1007/s12026-008-8071-8>
58. Rada B., Gardina P., Myers T.G., Leto T.L. Reactive oxygen species mediate inflammatory cytokine release and EGFR-dependent mucin secretion in airway epithelial cells exposed to pseudomonas pyocyanin. *Mucosal Immunol.* 2011; 4(2): 158–71. <https://doi.org/10.1038/mi.2010.62>
59. Lazareva A.V., Chebotar' I.V., Kryzhanovskaya O.A., Chebotar' V.I., Mayanskiy N.A. *Pseudomonas aeruginosa*: pathogenicity, pathogenesis and diseases. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya.* 2015; 17(3): 170–86. (in Russian)
60. Skopelja-Gardner S., Theprungsirikul J., Lewis K.A., Hammond J.H., Carlson K.M., Hazlett H.F., et al. Regulation of *Pseudomonas aeruginosa*-mediated neutrophil extracellular traps. *Front. Immunol.* 2019; 10: 1670. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01670>
61. Young R.L., Malcolm K.C., Kret J.E., Caceres S.M., Poch K.R., Nichols D.P., et al. Neutrophil extracellular trap (NET)-mediated killing of pseudomonas aeruginosa: evidence of acquired resistance within the CF airway, independent of CFTR. *PLoS One.* 2011; 6(9): e23637. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023637>
62. Limoli D.H., Rockel A.B., Host K.M., Jha A., Kopp B.T., Hollis T., et al. Cationic antimicrobial peptides promote microbial mutagenesis and pathoadaptation in chronic infections. *PLoS Pathog.* 2014; 10(4): e1004083. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004083>
63. Feltner J.B., Wolter D.J., Pope C.E., Groleau M.C., Smalley N.E., Greenberg E.P., et al. LasR variant cystic fibrosis isolates reveal an adaptable quorum-sensing hierarchy in *Pseudomonas aeruginosa*. *mBio.* 2016; 7(5): e01513–6. <https://doi.org/10.1128/mBio.01513-16>
64. Hoffman L.R., Kulasekara H.D., Emerson J., Houston L.S., Burns J.L., Ramsey B.W., et al. *Pseudomonas aeruginosa* lasR mutants are associated with cystic fibrosis lung disease progression. *J. Cyst. Fibros.* 2009; 8(1): 66–70. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2008.09.006>
65. Thanabalasuriar A., Scott B.N.V., Peiseler M., Willson M.E., Zeng Z., Warren P., et al. Neutrophil extracellular traps confine pseudomonas aeruginosa ocular biofilms and restrict brain invasion. *Cell Host Microbe.* 2019; 25(4): 526–36. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.02.007>
66. Alhede M., Qvortrup K., Kragh K.N., Jensen P.Ø., Stewart P.S., Bjarnsholt T. The origin of extracellular DNA in bacterial biofilm infections *in vivo*. *Pathogens Dis.* 2020; 78(2): ftaa018. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftaa018>
67. Lew D.P., Waldvogel F.A. Osteomyelitis. *Lancet.* 2004; 364(9431): 369–79. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)16727-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)16727-5)
68. Brady R.A., Leid J.G., Calhoun J.H., Costerton J.W., Shirtliff M.E. Osteomyelitis and the role of biofilms in chronic infection. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2008; 52(1): 13–22. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2007.00357.x>
69. Ashong C.N., Raheem S.A., Hunter A.S., Mindru C., Barshes N.R. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in foot osteomyelitis. *Surg. Infect.* 2017; 18(2): 143–8. <https://doi.org/10.1089/sur.2016.165>
70. Ferrando A., Part J., Baeza J. Treatment of cavitary bone defects in chronic osteomyelitis: bioactive glass S53P4 vs. calcium sulphate antibiotic beads. *J. Bone Jt. Infect.* 2017; 2(4): 194–201. <https://doi.org/10.7150/jbji.20404>
71. de Vor L., Rooijackers S.H.M., van Strijp J.A.G. *Staphylococci* evade the innate immune response by disarming neutrophils and

- forming biofilms. *FEBS Lett.* 2020; 594(16): 2556–69. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13767>
72. Bhattacharya M., Berends E.T.M., Chan R., Schwab E., Roy S., Sen C.K., et al. *Staphylococcus aureus* biofilms release leukocidins to elicit extracellular trap formation and evade neutrophil-mediated killing. *PNAS.* 2018; 115(28): 7416–21. <https://doi.org/10.1073/pnas.1721949115>
73. Sultan A.R., Hoppenbrouwers T., Lemmens-den Toom N.A., Snijders S.V., van Neck J.W., Verbon A., et al. During the early stages of staphylococcus aureus biofilm formation, induced neutrophil extracellular traps (NETs) are degraded by autologous thermolysin. *Infect. Immun.* 2019; 87(12): e00605-19. <https://doi.org/10.1128/IAI.00605-19>
74. Montanaro L., Poggi A., Visai L., Ravaioli S., Campoccia D., Speziale P., et al. Extracellular DNA in biofilms. *Int. J. Artif. Organs.* 2011; 34(9): 824–31. <https://doi.org/10.5301/ijao.5000051>
75. Whitchurch C.B., Tolker-Nielsen T., Ragas P.C., Mattick J.S. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science.* 2002; 295(5559): 1487. <https://doi.org/10.1126/science.295.5559.1487>
76. Grande R., Nistico L., Sambanthamoorthy K., Longwell M., Iannitelli A., Cellini L., et al. Temporal expression of agrB, cidA, and alsS in the early development of *Staphylococcus aureus* UAMS-1 biofilm formation and the structural role of extracellular DNA and carbohydrates. *Pathog. Dis.* 2014; 70(3): 414–22. <https://doi.org/10.1111/2049-632x.12158>
77. Moormeier D.E., Bose J.L., Horswill A.R., Bayles K.W. Temporal and stochastic control of *Staphylococcus aureus* biofilm development. *mBio.* 2014; 5(5): e01341–14. <https://doi.org/10.1128/mBio.01341-14>
78. Johnson C.J., Cabezas-Olcoz J., Kernien J.F., Wang S.X., Beebe D.J., Huttenlocher A., et al. The extracellular matrix of candida albicans biofilms impairs formation of neutrophil extracellular traps. *PLoS Pathog.* 2016; 12(9): e1005884. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005884>
79. Kernien J.F., Johnson C.J., Nett J.E. Conserved inhibition of neutrophil extracellular trap release by clinical *Candida albicans* biofilms. *J. Fungi.* 2017; 3(3): 49. <https://doi.org/10.3390/jof3030049>
80. Hoyer A.R., Johnson C.J., Hoyer M.R., Kernien J.F., Nett J.E. Echinocandin treatment of *Candida albicans* biofilms enhances neutrophil extracellular trap formation. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2018; 62(9): e00797–18. <https://doi.org/10.1128/AAC.00797-18>
81. Branzk N., Lubojemska A., Hardison S.E., Wang Q., Gutierrez M.G., Brown G.D., et al. Neutrophils sense microbe size and selectively release neutrophil extracellular traps in response to large pathogens. *Nat. Immunol.* 2014; 15(11): 1017–25. <https://doi.org/10.1038/ni.2987>
82. Uppuluri P., Chaturvedi A.K., Srinivasan A., Banerjee M., Ramasubramaniam A.K., Köhler J.R., et al. Dispersion as an important step in the candida albicans biofilm developmental cycle. *PLoS Pathog.* 2010; 6(3): e1000828. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000828>
83. Hopke A., Nicke N., Hidu E.E., Degani G., Popolo L., Wheeler R.T. Neutrophil attack triggers extracellular trap-dependent candida cell wall remodeling and altered immune recognition. *PLoS Pathog.* 2016; 12(5): e1005644. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005644>
84. Katragkou A., Kruhlak M.J., Simitopoulou M., Chatzimochou A., Taparkou A., Cotten C.J., et al. Interactions between human phagocytes and *Candida albicans* biofilms alone and in combination with antifungal agents. *J. Infect. Dis.* 2010; 201(12): 1941–9. <https://doi.org/10.1086/652783>
85. Byrd A.S., O'Brien X.M., Johnson C.M., Lavigne L.M., Reichner J.S. An extracellular matrix-based mechanism of rapid neutrophil extracellular trap formation in response to *Candida albicans*. *J. Infect. Dis.* 2010; 201(12): 1941–49. <https://doi.org/10.1086/652783>
86. Shpakov A.O. Intra- and interspecies chemocommunication in fungi. *Mikologiya i fitopatologiya.* 2009; 43(6): 490–505. (in Russian)
87. Kenno S., Perito S., Mosci P., Vecchiarelli A., Monari C. Autophagy and reactive oxygen species are involved in neutrophil extracellular traps release induced by *C. albicans* morphotypes. *Front. Microbiol.* 2016; 7: 879. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00879>

Информация об авторах

Долгушин Илья Ильич — д.м.н., проф., президент, зав. каф. микробиологии, вирусологии, иммунологии и клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ВО ЮУГМУ, 454092, Челябинск, Россия.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-0901-8042>.

E-mail: dol-ii@mail.ru

Мезенцева Елена Анатольевна[✉] — к.м.н., доц. каф. микробиологии, вирусологии, иммунологии и клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ВО ЮУГМУ, 454092, Челябинск, Россия.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-9155-2334>.

E-mail: alena_mez_75@mail.ru

Участие авторов: все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Information about the authors

Ilya I. Dolgushin — D. Sci. (Med.), Prof., President, Head, Department of microbiology, virology, immunology and clinical laboratory diagnostics, South-Ural State Medical University, 454092, Chelyabinsk, Russia.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-0901-8042>.

E-mail: dol-ii@mail.ru

Elena A. Mezentseva[✉] — Cand. Sci. (Med.), Assoc. Prof., Department of microbiology, virology, immunology and clinical laboratory diagnostics, South-Ural State Medical University, 454092, Chelyabinsk, Russia.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-9155-2334>.

E-mail: alena_mez_75@mail.ru

Contribution: the authors contributed equally to this article.