

## ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ПИОЦИАНИНА НА ОКИСЛИТЕЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ

Аристова А.С.

г. Пермь, МАОУ НОЦ «Лицей № 2», 11 класс

Руководитель: Масленникова И.Л., к.б.н., с.н.с. ФГБУН Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской Академии наук, Пермь

Аристова А.С., г. Пермь, МАОУ НОЦ «Лицей № 2», учитель русского и литературы

Нейтрофилы – это тип лейкоцитов, которые составляют 50-80% всех клеток белых кровяных телец и участвуют в иммунных реакциях против инфекционных микроорганизмов. Нейтрофилы наряду с эозинофилами и базофилами составляют группу лейкоцитов, известных как гранулоциты. Костный мозг нормального взрослого человека ежедневно производит около 100 миллиардов нейтрофилов. Внутри организма нейтрофилы мигрируют в области инфекции или травмы тканей. Нейтрофилы активные фагоциты; они поглощают и уничтожают бактерий и микроскопические частицы. Кроме этого биологическое значение нейтрофилов заключается в том, что они доставляют в очаг воспаления большое количество разнообразных протеолитических ферментов, играющих важную роль в процессах рассасывания некротических тканей.

*Pseudomonas aeruginosa* распространена у пациентов с нарушенными механизмами защиты хозяев. Общеизвестно, что эти бактерии вызывают нозокомиальные инфекции, такие как пневмония, инфекции мочевых путей и бактериемия; инфекции, вызванные этими бактериями, могут усложняться и могут даже угрожать жизни. Дополнительные сложности создает способность синегнойной палочки к формированию устойчивых биопленок – прочных соединений бактериальных клеток друг с другом и с субстратом. Пиоцианин (от устар. *Bacillus ruosuaneus* синегнойная палочка) темно-синий водорастворимый пигмент, продуцируемый *Pseudomonas aeruginosa* (синегнойной палочкой), обладающий бактерицидным действием. Также благодаря своим редуцирующим свойствам пиоцианин генерирует оксидативный стресс у бактерий и клеток млекопитающих [29].

Поскольку нейтрофилы способны проходить через базальные мембраны между клетками и целенаправленно перемещаться по основному веществу соединительной ткани к микроорганизмам и очагам воспаления, то не исключено, что при инфекции экзопродукты синегной палочки, а именно

пиоцианин, могут оказывать воздействие на иммунные клетки.

**Цель работы: изучить влияние пиоцианина на внутриклеточную окислительную активность нейтрофилов.**

Задачи:

1. Определить влияние перекиси водорода на флуоресцентную активность 2',7'-дихлорфлуоресцеина
2. Определить влияние перекиси водорода на внутриклеточную окислительную активность нейтрофилов.

3. Определить влияние пиоцианина на окислительную активность нейтрофилов.

Объектом исследования является нейтрофилы крови человека.

Предметом исследования является реакция окислительной способности нейтрофилов при взаимодействии с пиоцианином.

Это работа интересна в практическом плане тем, что нейтрофилы крови человека являются одним из аспектов врожденного иммунитета человека

Результаты исследования могут быть использованы для определения способа уничтожения пиоцианина без лекарств, что является действительно значимым в иммунологии и имеет прикладное значение.

Работа была выполнена в лаборатории иммунорегуляции ФГБУН Института экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской Академии наук, Пермь.

### Глава 1. Обзор литературы

#### 1.1.1. Клетки крови и их функции

Кровь – жидкая ткань сердечнососудистой системы и человека. Состоит из плазмы, эритроцитов, лейкоцитов и тромбоцитов. Циркулирует по замкнутой системе сосудов под действием силы ритмически сокращающегося сердца и непосредственно с другими тканями тела не сообщается.

Кровь состоит из жидкой части плазмы и взвешенных в ней форменных элементов: эритроцитов, лейкоцитов и тромбоцитов. На долю форменных элементов в составе крови приходится 40 – 45%, на долю

плазмы – 55 – 60% от объема крови. Это соотношение состава крови получило название гематокритного соотношения, или гематокритного числа. Часто под гематокритным числом понимают только объем крови, приходящийся на долю форменных элементов [1].

### *Эритроциты*

Человеческие эритроциты – очень маленькие эластичные клетки дисковидной двояковогнутой формы диаметром от 7 до 10 мкм. Размер и эластичность способствуют им при движении по капиллярам, их форма повышает площадь поверхности и облегчает газообмен. В них отсутствует клеточное ядро и большинство органелл, что повышает содержание гемоглобина. Около 2,4 миллиона новых эритроцитов образуется в костном мозге каждую секунду [31]. Газообмен является основной функцией эритроцитов. Процесс, посредством которого организмы обменивают газы между их клетками организма и окружающей средой, называется дыханием. Кислород и углекислый газ транспортируются через организм через сердечно-сосудистую систему. Транспорт кислорода обеспечивается гемоглобином (Hb), на долю которого приходится ≈98 % массы белков цитоплазмы эритроцитов (в отсутствие других структурных компонентов)[5].

Вследствие накопления в цитоплазме ионов бикарбоната возникает градиент концентрации, однако ионы бикарбоната могут покинуть клетку только при условии сохранения равновесного распределения зарядов между внутренней и внешней средой, разделенных цитоплазматической мембраной, то есть выход из эритроцита иона бикарбоната должен сопровождаться либо выходом катиона, либо входом аниона. Мембрана эритроцита практически непроницаема для катионов, но содержит хлоридные ионные каналы, в результате выход бикарбоната из эритроцита сопровождается входом в него хлорид-аниона (хлоридный сдвиг)[32].

Лейкоциты (от др.-греч. λευκός – белый и κύτος – вместилище, тело) – белые кровяные клетки; неоднородная группа различных по внешнему виду и функциям клеток крови человека или животных, выделенная по признакам наличия ядра и отсутствия самостоятельной окраски.

Главная сфера действия лейкоцитов – защита. Они играют главную роль в специфической и неспецифической защите организма от внешних и внутренних патогенных агентов, а также в реализации типичных патологических процессов. Все виды лейкоцитов способны к активному движению

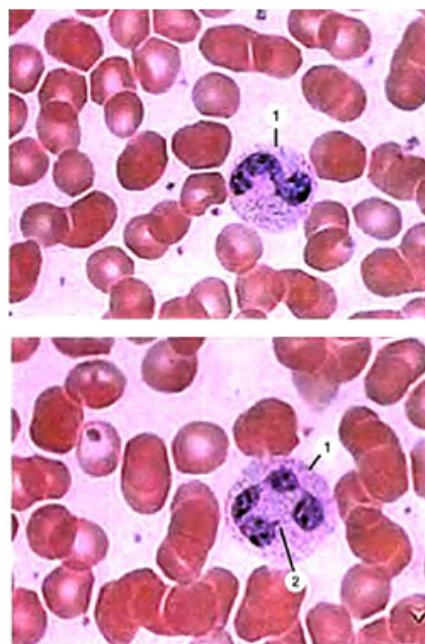
и могут переходить через стенку капилляров и проникать в межклеточное пространство, где они поглощают и переваривают чужеродные частицы. Этот процесс называется фагоцитоз, а клетки, его осуществляющие, – фагоциты. Вещества, вызывающие реакцию воспаления, привлекают новые лейкоциты к месту внедрения чужеродных тел. Уничтожая чужеродные тела и поврежденные клетки, лейкоциты гибнут в больших количествах. Гной, который образуется в тканях при воспалении, – это скопление погибших лейкоцитов [8].

### **1. 1. 2. Нейтрофилы человека и их строение**

Нейтрофилы – крупные клетки диаметром 15 мкм с резко обрисованным темным ядром. При окрашивании по Романовскому-Гимза они имеют слегка розоватого цвета цитоплазму, наполненную мелкими зернышками розовато-фиолетового цвета.

Сегментоядерные нейтрофилы имеют ядро в виде 2–5 сегментов, связанных друг с другом тонкими нитями.

Молодые формы нейтрофильных лейкоцитов – палочкоядерные нейтрофилы – имеют ядро в виде палочки или подковы, не разделенное на отдельные участки.



*Рис.1. Палочкоядерные нейтрофилы и Сегментоядерные нейтрофил (препарат – мазок крови: нейтрофилы в мазке. Окраска по Романовскому)[11]*

Нейтрофилы и другие фагоциты уникально снабжены ферментом NADPH-оксидазы, который при активации активирует перенос электронов на молекулярный

кислород для получения супероксидного аниона, высокорекреационноспособного свободного радикала с мощными антимикробными свойствами. Этот процесс, называемый респираторным всплеском, происходит в ответ на растворимые воспалительные факторы или после фагоцитоза. Свободные радикалы могут выделяться вне клетки или внутри клетки в фагосоме, интернализированное отделение, содержащее проглоченный материал. Другие виды реакционноспособного кислорода легко образуются после высвобождения супероксида. В фагосоме супероксид быстро реагирует с образованием перекиси водорода, еще одного мощного окислителя с антимикробными эффектами. Другие реакционноспособные кислородные метаболиты, такие как оксид азота и пероксинитрит, также могут образовываться в зависимости от наличия субстратов и / или гашения антиоксидантной нагрузки в воспалительной среде. Важность респираторного всплеска для микробицидных эффектов нейтрофилов подкрепляется клиническими особенностями хронического гранулематозного заболевания (CGD), которое вызвано редкой, унаследованной мутацией в одной из субъединиц фермента NADPH-оксидазы, которая делает клетку недееспособной продуцирующего супероксида [12].

Так же они способны к активному амёбодному движению, к экстравазации (эмиграции за пределы кровеносных сосудов), и к хемотаксису (преимущественному движению в направлении мест воспаления или повреждения тканей).

Важнейшей функцией нейтрофилов является защита организма от инфекций [13]. Этот процесс включает фагоцитоз, выработку ряда ферментов, оказывающих бактерицидное действие и хемотаксис – способность проходить через базальные мембраны между клетками и целенаправленно перемещаться по основному веществу соединительной ткани к микроорганизмам и очагам воспаления.

Биологическое значение нейтрофилов заключается в том, что они доставляют в очаг воспаления большое количество разнообразных протеолитических ферментов, играющих важную роль в процессах рассасывания некротических тканей.

Нейтрофилы являются наиболее изменчивой группой лейкоцитов. Повышение числа нейтрофилов (нейтрофилия) наблюдается при общем повышении числа лейкоцитов [15].

Процесс разрушения завершается апоптозом нейтрофила.

**Апоптоз** (др. греч  $\alpha\lambda\upsilon\tau\omega\varsigma$  – листопад) – регулируемый процесс програм-

мируемой клеточной гибели, в результате которого клетка распадается на отдельные апоптотические тельца, ограниченные плазматической мембраной.

Нейтрофильный апоптоз, процесс запрограммированной гибели клеток, который предотвращает высвобождение гистотоксического содержимого нейтрофилов, жестко регулируется и ограничивает разрушающую способность нейтрофильных продуктов окружающим тканям. Последующее распознавание и фагоцитоз апоптотических клеток фагоцитарными клетками, такими как макрофаги, имеет центральное значение для успешного разрешения воспалительного ответа, и все более очевидно, что сам умирающий нейтрофил оказывает противовоспалительное действие посредством модуляции окружающих клеточных реакций [19].

Апоптоз может задерживаться, индуцироваться или усиливаться микроорганизмами, зависящими от их стратегий иммунного уклонения и здоровья хозяина, с которым они сталкиваются [18].

## 1.2. Пиоцианин – экзометаболический продукт синегнойной палочки

*Pseudomonas aeruginosa* – грамотрицательная палочка (при микроскопических исследованиях микроорганизмов часто применяется окраска по Граму, это позволяет дифференцировать – отличать – бактерии друг от друга; микроорганизмы, которые по Граму окрашиваются в сине-фиолетовый цвет, называются грамположительными, те же, что принимают красную окраску – грамотрицательные) [20].

Занимает особое место среди возбудителей инфекций мочевыводящих путей, так как ее возбудитель – *Pseudomonas aeruginosa* – характеризуется значительной природной устойчивостью к большинству антимикробных препаратов, применяемых в клиниках, что обуславливает появление тяжелых осложнений после инфицирования мочеполовой системы. Характерный биологический признак *Pseudomonas aeruginosa* – способность синтезировать водорастворимый феназиновый пигмент – пиоцианин, окрашивающий питательную среду в синезеленый цвет. Это значительно упрощает идентификацию 70–80% штаммов синегнойной палочки [21].

Эта бактерия продуцирует бактериоцины – пиоцины, способность к синтезу и чувствительность к которым широко варьирует у различных штаммов псевдомонад. На этом основано пиоцинотипирование псевдомонад, применяемое для внутривидовой дифференциальной диагностики чистых

культур этого микроорганизма. Кроме продукции пиоцинов синегнойная палочка может образовывать пигменты – характерный и имеющий важное диагностическое значение признак [21].

Пиоцианин (от устар. *Bacillus pyocyaneus* синегнойная палочка) темно-синий водорастворимый пигмент, продуцируемый синегнойной палочкой, обладающий бактерицидным действием [24].

Синтез пиоцианина в основном зависит от содержания источников углерода и азота в питательной среде [26]. Однако наличие некоторых ионов может существенно снизить или повысить выход пигмента. В литературных источниках нет единого мнения о влиянии тех или иных элементов на накопление биомассы бактерии *P. aeruginosa* на биосинтез пиоцианина [27].

## 2. Материалы и методы исследования

### 2.1. Общая характеристика объектов

#### 2.1.1. Нейтрофилы крови человека

В работе использовали фракционированные нейтрофилы периферической крови. Клетки выделяли из гепаринизированной (25 МЕ/мл) венозной крови путем центрифугирования (1600 об/мин, 200 г) в двойном градиенте плотности фиколла-урографина ( $\rho=1,077$  и  $1,112$  г/мл) («Pharmacia», Швеция). Полученную суспензию клеток ( $1 \times 10^6$  клеток) дважды отмывали раствором Хэнкса и затем использовали в экспериментах.

#### 2.2. Общая характеристика материалов исследования.

##### 2.2.1. Пиоцианин.

В работе использовали пиоцианин («SIGMA»; Israel; P0046-SMG; Pyocyanin from *Pseudomonas aeruginosa*;  $\geq 98\%$ ; HPLC) в концентрациях 20 и 80  $\mu\text{M}$ .

Приготовление раствора пиоцианина (80  $\mu\text{M}$ ): 20  $\mu\text{л}$  пиоцианина (5 мМ)

Разводили в 1,2 мл RPMI. Приготовление раствора пиоцианина (20  $\mu\text{M}$ ): к 0,3 мл пиоцианина (80  $\mu\text{M}$ ) добавляли 0,9 мл RPMI.

##### 2.2. 2',7'-дихлорфлуоресцеин.

В работе использовали 2',7'-дихлорфлуоресцеин (Biotium; США) в концентрации 100  $\mu\text{M}$ . Так как нейтрофилы имеют слабую способность к флуоресценции, то для обнаружения их окислительной активности в работе использовали раствор DCF (2',7'-дихлорфлуоресцеин), способный проникать внутрь нейтрофилов.

### 2.3. Методика оценки окислительной активности нейтрофилов

К нейтрофилам ( $1 \times 10^6$  клеток) добавляли 250  $\mu\text{л}$  2',7'-дихлорфлуоресцеина (100  $\mu\text{M}$ ) и инкубировали в темноте 30 мин при 37°C. За это время флуоресцеин проникал внутрь нейтрофилов. Затем нейтрофилы отмывали от оставшегося красителя в растворе Хэнкса: центрифугирование 5 минут при 500 g на центрифуге ELM1 CM – 6MT, удаление надосадочной жидкости, ресуспендирование в RPMI (2 раза).

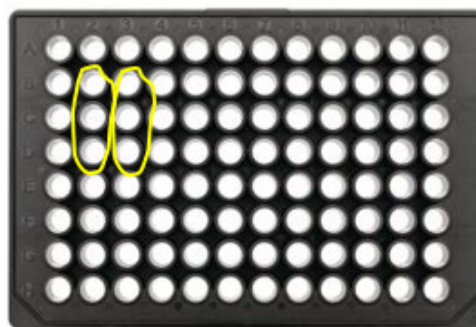
Затем в черный 96-луночный планшет добавляли по 50  $\mu\text{л}$  суспензии окрашенных нейтрофилов (или просто флуоресцеин в 1 опыте) и по 50  $\mu\text{л}$  исследуемых веществ в 3 повторях. Варианты опытов.

Варианты опыта 1 (без нейтрофилов):

1. 2',7'-дихлорфлуоресцеин +  $\text{H}_2\text{O}$  (контроль)

2. 2',7'-дихлорфлуоресцеин + 1  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$

1 2



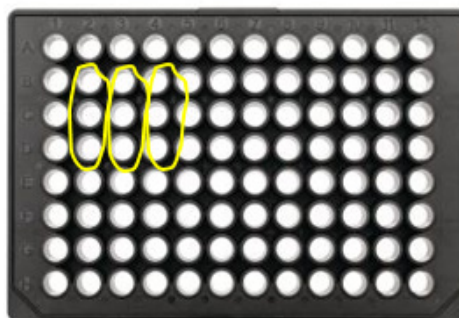
Варианты опыта 2:

1. Окрашенные нейтрофилы + RPMI (контроль)

2. Окрашенные нейтрофилы + 1  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$

3. Окрашенные нейтрофилы + 10  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$

1 2 3

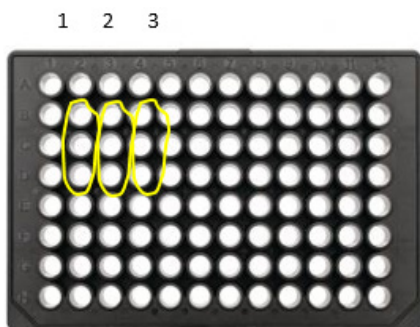


Варианты опыта 3:

1. Окрашенные нейтрофилы + RPMI (контроль)

2. Окрашенные нейтрофилы + 20  $\mu\text{M}$  пиоцианина

3. Окрашенные нейтрофилы + 80  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  пиоцианина



Продукцию внутриклеточных активных форм кислорода нейтрофилов оценивали с использованием 2',7'-дихлорфлуоресцеина в течении 60 минут. Измерение флуоресценции производилось каждые 5 минут на мультипланшетном ридере Synergy H1 («BioТес», США). Результаты представлены в относительных флуоресцентных единицах (FLU). Оценка флуоресцентного

вещества проводилась при спектре возбуждения/поглощения 480/530 нм.

Статистическая обработка данных проведена с помощью расчета средней арифметической по результатам 3 повторов.

### Глава 3. Результаты и обсуждение

#### 3.1. Влияние перекиси водорода на флуоресцентную активность 2',7'-дихлорфлуоресцеина

На Рис. 3.1. представлены результаты флуоресценции 2',7'-дихлорфлуоресцеина при действии перекиси водорода в концентрации 1  $\mu\text{M}$ . Как мы видим, показатели FLU в течении первых 5-ти минут резко увеличивались при концентрации перекиси водорода 1  $\mu\text{M}$ . Таким образом, по оценке свечения флуоресцеина можно оценивать действие веществ с супероксидными радикалами.

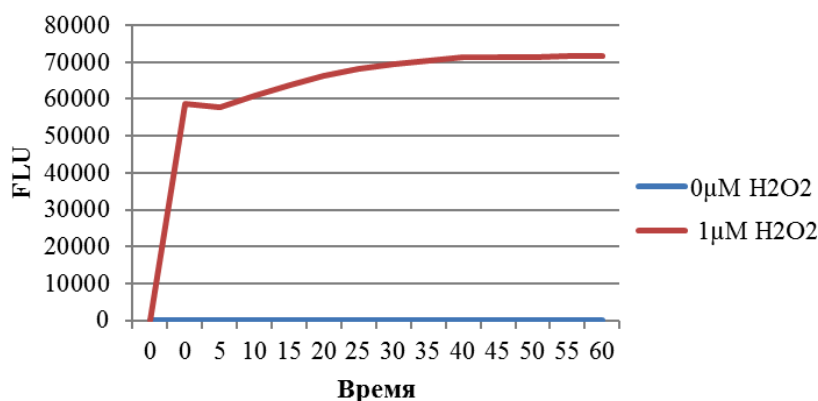


Рис. 3.1. Влияние перекиси водорода на флуоресцентную активность 2',7'-дихлорфлуоресцеина

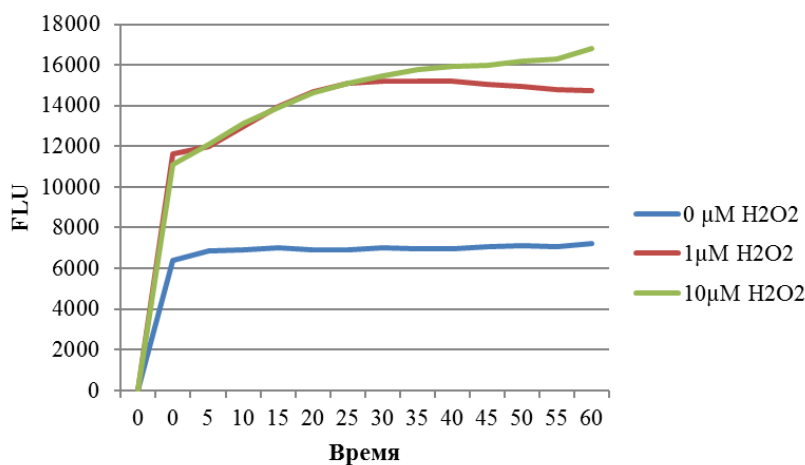


Рис. 3.2. Влияние перекиси водорода на внутриклеточную окислительную активность нейтрофилов

### 3.2. Влияние перекиси водорода на внутриклеточную окислительную активность нейтрофилов

На Рис. 3.2. представлены результаты оценки окислительной активности нейтрофилов при действии перекиси водорода в концентрациях 1 и 10  $\mu\text{M}$ . Оценка сделана на основе свечения флуоресцеина, который находится внутри нейтрофилов. Если сравнивать флуоресценцию нейтрофилов после действия перекиси водорода, то мы видим, что при добавлении в раствор нейтрофилов 10  $\mu\text{M}$  концентрации, их окислительная активность возросла сильнее, чем при добавлении 1  $\mu\text{M}$ .

При концентрации 1  $\mu\text{M}$  перекиси водорода максимальная окислительная активность нейтрофилов наблюдалась после 20 минут эксперимента, а затем уменьшалась с 25 минуты. При действии 10  $\mu\text{M}$  перекиси водорода окислительная активность нейтрофилов возрастала непрерывно.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что перекись водорода стимулирует образование перекисных радикалов внутри нейтрофила, увеличивая их окислительную активность.

### 3.3. Влияние пиоцианина на внутриклеточную активность нейтрофилов

На Рис. 3.3. представлены результаты оценки окислительной активности нейтрофилов при действии пиоцианина в концентрациях 20 и 80  $\mu\text{M}$ . Оценка сделана на основе свечения флуоресцеина, который находится внутри нейтрофилов. Если сравнивать флуоресценцию нейтрофилов после действия пиоцианина, то мы видим, что при добавлении в раствор нейтрофилов 20  $\mu\text{M}$  концентрации, их окислительная активность не увеличилась по сравнению с контролем.

При концентрации 80  $\mu\text{M}$  нейтрофилов максимальная окислительная активность нейтрофилов наблюдалась после 45 минут эксперимента. При действии 80  $\mu\text{M}$  пиоцианина окислительная активность нейтрофилов возрастала непрерывно.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что при большей концентрации, пиоцианин стимулирует образование перекисных радикалов внутри нейтрофила.

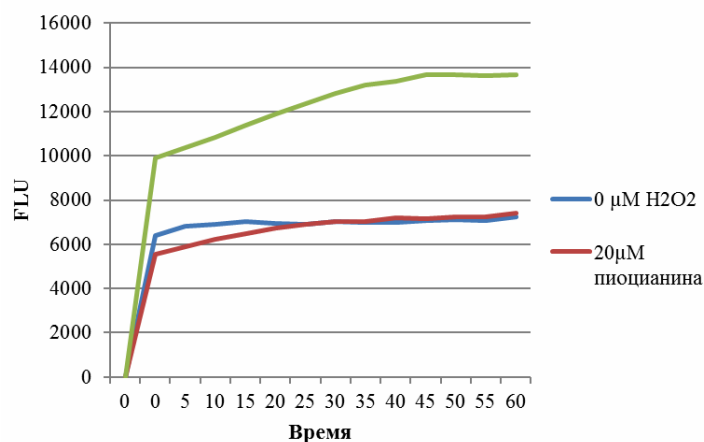


Рис. 3.3. Влияние пиоцианина на внутриклеточную активность нейтрофилов

### Выводы

В заключение проделанной работы можно сформулировать следующие выводы:

1. По оценке свечения флуоресцеина можно оценивать действие веществ с супероксидными радикалами.

2. Перекись водорода стимулирует образование перекисных радикалов внутри нейтрофила, увеличивая их окислительную активность

3. Пиоцианин в концентрации 80  $\mu\text{M}$  увеличивает внутриклеточную окислитель-

ную активность нейтрофилов. Образование перекиси водорода внутри нейтрофила стимулирует гибель нейтрофилов (апоптоз, запрограммированная смерть). Таким образом, синегнойная палочка с помощью пиоцианина способна подавлять иммунный ответ в месте воспаления.

### Список литературы

1. Афанасьев Ю. И. Гистология, цитология и эмбриология / Е. А. Шубикова. – 5-е издание. – Москва: «Медицина», 2002. – 744 с. – ISBN 5-225-04523-5.]
2. Белые кровяные тельца // Малый энциклопедический словарь Брокгауза и Ефрона : в 4 т. – СПб., 1907—1909.

3. Горячковский, А.М. Справочное пособие по клинической биохимии. – Одесса, ОКФА, 1994. – 416 с.
4. Кровь / А. И. Воробьев, А. Н. Смирнов // Большая Российская энциклопедия / Председатель Науч.-ред. совета Ю. С. Осипов. Отв. ред. С. Л. Кравец. – М.: Большая Российская энциклопедия, 2010. – Т. 16 : Крещение Господне – Ласточкивые. – С. 86–88. – 60 000 экз.
5. Кровь // Большая медицинская энциклопедия / гл. ред. Б. В. Петровский. – 3-е изд. – М.: Советская энциклопедия, 1980. – Т. 12 : Кривохирургия – Ленегр. – С. 93–132. – 150 300 экз.
6. Малая медицинская энциклопедия. – М.: Медицинская энциклопедия. 1991–96 гг. 2. Первая медицинская помощь. – М.: Большая Российская Энциклопедия. 1994 г. 3. Энциклопедический словарь медицинских терминов. – М.: Советская энциклопедия. – 1982–1984 гг.
7. Медицинская микробиология. / Под ред. В.И.Покровского, О.К.Поздеева. – М.: ГОЭТАР МЕДИЦИНА, 1998, – с. 183
8. Митрохин С.Д. Значение синегнойной палочки в инфекционной патологии человека. // Инфекция и антимикробная терапия. – 2004. – №3. – Том 6.
9. Ройт А. Клетки, осуществляющие иммунный ответ // Иммунология = Immunology / Ройт А.; пер. с англ. В. И. Кандрора, Л. А. Певницкого. – 5-е изд. – М.: Мир, 2000. – С. 38. – 592 с. – ISBN 5-03-003305-X.
10. Сербин М. Е., Щербак Е. В. Апоптоз и его молекулярные эффекторы // Актуальные проблемы биологии, медицины и экологии : Сборник / под редакцией проф., д. м. н. Н. Н. Ильинских. – Томск: Сибирский государственный медицинский университет, 2004. – Вып. 1.
11. Стимулирование продукции процианина бактерией *Pseudomonas Aeruginosa* Д.Н. Токарева статья, 235с.
12. Физиология / Под ред. Судаков К.В. М., 2010.
13. Яковлев В.И. Технология микробиологического синтеза. – Л.: Химия, 1987. – 272 с.
14. Alberts B. et al. Molecular biology of the cell. – 5th edition. – Garland science, 2008. – 1601 p. – ISBN 978-0-8153-4105.
15. Ansell, A. D.; N. Balakrishnan Nair (1968). «Occurrence of Haemocoelic Erythrocytes containing Haemoglobin in a Wood Boring Mollusc». *Nature* 217 (5126): 357-357.
16. Brinkmann V., Reichard U., Goosmann C., Fauler B., Uhlemann Y., Weiss D. S., Weinrauch Y., Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. (англ.) // *Science* (New York, N.Y.). – 2004. – Vol. 303, no. 5663. – P. 1532–1535. – DOI:10.1126/science.1092385. – PMID 15001782.
17. Erich Sackmann. Biological Membranes Architecture and Function: Handbook of Biological Physics / ed. R. Lipowsky and E. Sackmann. – Elsevier, 1995. – Т. 1.
18. <http://erj.ersjournals.com/content/28/6/1163>.
19. <https://ppt-online.org/78700>.
20. Leitch AE, Duffin R, Haslett C, Rossi AG. Relevance of granulocyte apoptosis to resolution of inflammation at the respiratory mucosa. *Mucosal Immunol.* 2008;5:350–363.
21. Leitermann F., Biotechnologische Herstellung mikrobieller Rhamnolipide.
22. McLaren CE, Brittenham GM, Hasselblad V (April 1987). «Statistical and graphical evaluation of erythrocyte volume distributions». *Am. J. Physiol.* 252 (4 Pt 2): H857–66.
23. Michel-Briand Y., Baysse C., 2002.
24. Pyocyanin und Bakterienatmung. *Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten. Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten*, no. 116, pp 209-224.
25. Sarah Fox, Andrew E. Leitch, Neutrophil Apoptosis: Relevance to the Innate Immune Response and Inflammatory Disease, 2010, 112 с.