

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ



УДК 571.27

Особенности образования нейтрофильных внеклеточных ловушек у кроликов породы шиншилла

Н.В. Воробьева^{1, *} , М.С. Мунтян² ¹*Кафедра иммунологии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;*²*НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 40***e-mail: nvvorobjeva@mail.ru*

Нейтрофильные внеклеточные ловушки (NET, Neutrophil Extracellular Traps) представляют собой деконденсированный ядерный хроматин, «декорированный» бактерицидными белками различных органелл клетки и выполняющий эффекторную функцию, направленную на борьбу с патогенами в очаге воспаления. Вместе с тем, NET играют важную роль в патогенезе многих аутоиммунных и воспалительных заболеваний, а также злокачественных новообразований. Кролики являются одним из наиболее часто используемых видов лабораторных животных в медицинских и биологических исследованиях. На кроликах разработано большое количество моделей различных заболеваний сердечно-сосудистой, иммунной и других систем человека. Однако в научной литературе отсутствуют сведения о способности нейтрофилов кролика подвергаться NETозу (программируемой гибели клеток в процессе образования NET) в ответ на известные фармакологические стимулы. Целью представленной работы было изучение в системе *in vitro* способности нейтрофилов кролика породы Советская шиншилла образовывать NET в ответ на миметик диацилглицерола форбол-12-миристан-13-ацетат (ФМА) и кальциевый ионофор A23187. Для выделения нейтрофилов кролика использовали метод центрифугирования в одноступенчатом градиенте плотности Ficoll-Нугауе с модификациями. Окислительный взрыв оценивали методом регистрации люминол-зависимой хемилюминесценции, а образование NET — с помощью иммунофлуоресцентного анализа. В работе впервые показано, что нейтрофилы кролика Советская шиншилла не образуют NET в ответ на ФМА, но формируют ловушки в ответ на A23187, а также обладают низким уровнем окислительного взрыва в ответ на ФМА, A23187 и хемоаттрактант N-формил-метионил-лейцил-фенилаланин.

Ключевые слова: нейтрофилы кролика, нейтрофильные внеклеточные ловушки, NET, окислительный взрыв, форбол-12-миристан-13-ацетат, A23187

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-79-1-7

Открытие Артуро Циклински [1] в 2004 г. нейтрофильных внеклеточных ловушек (NET, Neutrophil Extracellular Traps) привлекло внимание большого числа исследователей и стимулировало огромное количество научных публикаций. Подавляющее большинство этих работ было проведено на нейтрофилах человека или грызунов (мышей и крыс). Показано, что NET состоят из остова хроматина, деконденсированного до нуклеосомного уровня упаковки ДНК и «декорированного» несколькими десятками типов белков гранул (миелопероксидаза, МПО; эластаза), ядра (гистоны) и цитоплазмы [2]. Индукторами образования NET являются разнообразные физиологические стимулы, такие как бактерии, грибы, виру-

сы и простейшие [1], а также химические стимулы, антитела, иммунные комплексы, хемокины, цитокины и хемоаттрактанты. Наиболее широко используемыми фармакологическими стимулами образования NET являются форбол-12-миристан-13-ацетат (ФМА) и кальциевые ионофоры (иономицин, A23187). Высвобождение хроматина было постулировано как новая эффекторная функция нейтрофилов для борьбы с патогенами, дополняющая фагоцитоз, дегрануляцию и генерацию активных форм кислорода (АФК). Впоследствии выяснилось, что хроматин могут выделять и другие гранулоциты, например, эозинофилы, базофилы и тучные клетки, а также моноциты, макрофаги и В-лимфоциты [3]. Вскоре

стало ясно, что нейтрофилы многих млекопитающих, включая кошек, собак, крупный рогатый скот, овец, коз и свиней, выделяют хроматин для защиты хозяина от патогенов [4]. Сообщалось, что специфические клетки птиц и рыб [4], некоторых представителей беспозвоночных [5] и растений [6] также способны высвобождать ядерный хроматин. Таким образом, выделение хроматина, направленное на защиту хозяина от патогенов, является эволюционно консервативным механизмом.

Однако впоследствии оказалось, что, помимо защитной функции, NET играют важную роль в патогенезе таких аутоиммунных и воспалительных заболеваний, как системная красная волчанка, ревматоидный артрит, васкулит мелких сосудов и псориаз [7–11], а также злокачественных новообразований [12]. Таким образом, существует тонкий баланс между высвобождением NET и их своевременным устранением, что обеспечивает защитные или повреждающие последствия их образования.

Кролики являются одним из наиболее часто используемых видов лабораторных животных в медицинских и биологических исследованиях. На них разработано большое количество моделей различных болезней человека, в частности, заболеваний сердечно-сосудистой и иммунной систем. Поскольку кролики имеют больше общих офтальмологических характеристик с людьми по сравнению с мелкими грызунами, это делает их удобной моделью для исследований в области офтальмологии и изучения таких заболеваний человека, как синдром сухого глаза, глаукома, катаракта и увеит [13–15]. Хотя в научной литературе отсутствуют данные о способности нейтрофилов кроликов развивать NETоз в ответ на фармакологические стимулы в системе *in vitro*, образование NET недавно было обнаружено в легких и печени кроликов, инфицированных возбудителем туляремии *Francisella tularensis* [16].

Ввиду широкого использования кроликов для разработки моделей ряда заболеваний человека, важно также учитывать способность их нейтрофилов образовывать NET как фактор патогенеза воспалительных и аутоиммунных процессов. В связи с этой целью работы было изучение способности нейтрофилов кроликов породы Советская шиншилла образовывать NET в ответ на классические активаторы NETоза, ФМА и A23187, в системе *in vitro*.

Материалы и методы

Реагенты. ФМА, A23187, *N*-формил-метионил-лейцил-фенилаланин (fMLP, *N*-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine), диметилсульфоксид, Тритон X-100 были приобретены в компании Sigma-Aldrich (США). SYBR Green, DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole), смола ProLong Gold и моноклональные FITC-меченные антитела к МПО были заку-

плены в Thermo Fisher Scientific (Invitrogen, США), декстран Т-500 – в Pharmacosmos (Дания).

Выделение первичных нейтрофилов из крови кроликов породы Советская шиншилла. Все исследования с кровью проводились в соответствии с биоэтическими нормами Европейского Союза и РФ. Нейтрофилы кролика выделяли с использованием одноступенчатого градиента Ficoll-Нураque, ранее разработанного для выделения нейтрофилов человека [17], однако с небольшими модификациями. Периферическую кровь кроликов отбирали из ушной вены в полипропиленовые пробирки с гепарином ($20 \text{ ME} \times \text{мл}^{-1}$ крови). Цельную кровь разводили средой 199 в соотношении 1:1 и наслаивали на Ficoll-Нураque с плотностью $1,077 \text{ г/см}^3$. Центрифугирование проводили при 478 g в течение 30 мин и комнатной температуре. Эритроцитарную массу доводили до первоначального объема крови, добавляли декстран Т-500 (конечная концентрация – 1%) и оставляли на 15 мин для осаждения основной массы эритроцитов. Верхний прозрачный слой отбирали, доводили средой 199 до 10 мл и проводили центрифугирование при 400 g в течение 10 мин. Оставшиеся эритроциты лизировали в гипотоническом растворе хлорида натрия (0,2%-ный NaCl) в течение 30 с и далее восстанавливали изотоничность путем добавления гипертонического раствора хлорида натрия (1,6%-ный NaCl). Осаждали клетки при 400 g в течение 10 мин и разводили осадок в полной культуральной среде, содержащей RPMI 1640, 10 mM HEPES, 2 mM L-глутамин и 1%-ную инактивированную эмбриональную телячью сыворотку, для последующего исследования NETоза. Для исследования окислительного взрыва осадок суспендировали в фосфатном буфере Кребса-Рингера (120 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,7 mM KH_2PO_4 , 8,3 mM Na_2HPO_4 , 10 mM глюкоза, 1 mM CaCl_2 , 1,5 mM MgCl_2 , pH – 7,3). Полученные клетки были представлены на 92% нейтрофилами, а их жизнеспособность составляла не менее 99%, что определяли по исключению 0,1%-ного трипанового синего. Изменение условий центрифугирования в градиенте плотности позволило выделять нейтрофилы кролика в количестве $1,5\text{--}2,0 \times 10^6$ на 1 мл цельной крови, что коррелирует с данными литературы [18]. Нейтрофилы инкубировали в течение 1 ч при 4°C перед экспериментом для достижения состояния покоя.

Оценка люминол-зависимой хемилюминесценции (ЛЗХЛ). ЛЗХЛ использовали для оценки суммарных АФК (внутри- и внеклеточных), как описано ранее [17]. В лунки 96-луночного планшета добавляли нейтрофилы кролика в количестве $2,5 \times 10^5$ клеток в фосфатном буфере Кребса-Рингера, люминол (80 мкМ – конечная концентрация) и один из активаторов окислительного взрыва – A23187 (2,5 мкМ), ФМА (35 нМ) или fMLP (800 нМ). Планшет немедленно помещали в хемилюмино-

метр Lucy 1 (Anthos Labtec, Австрия) для регистрации ЛЗХЛ. По окончании ЛЗХЛ оценивали площадь, занимаемую кривыми хемилюминесценции (суммарная эмиссия света), и степень окислительного взрыва выражали в виде гистограмм.

Индукция и иммунофлуоресцентное окрашивание NET. Свежевыделенные нейтрофилы кролика (2×10^5 кл/мл в 500 мкл полной культуральной среды), адгезированные на круглых покровных стеклах, находящихся в лунках 24-луночного планшета, стимулировали ФМА (35, 50, 100 нМ) или 2,5 мкМ A23187 в течение 3 ч и 4 ч соответственно. После стимуляции NETоза клетки фиксировали в лунках в 200 мкл 4%-ного раствора параформальдегида в течение 15 мин. Препараты окрашивали проникающим через мембраны клеток красителем SYBR Green, разведенным в фосфатно-солевом буфере (PBS, phosphate-buffered

saline) в соотношении 1:10000 в соответствии с рекомендацией производителя, в течение 7 мин в темноте. Для иммунофлуоресцентного окрашивания фиксированные нейтрофилы промывали в PBS и пермеабилizировали с Тритоном X-100 в течение 1 мин при комнатной температуре. Неспецифическое связывание уменьшали путем инкубации клеток в блокирующем буфере (иммуноглобулины человека) в течение 20 мин. Иммунофлуоресцентное окрашивание проводили с использованием FITC-меченных моноклональных антител против МПО. Хроматин окрашивали флуоресцентным красителем DAPI в течение 10 мин. Стекла промывали 2 раза в PBS и 1 раз в дистиллированной воде, далее погружали в смолу ProLong Gold. Клетки анализировали с использованием флуоресцентного микроскопа Leica DM LB (Leica Microsystems, Германия), а фотографии

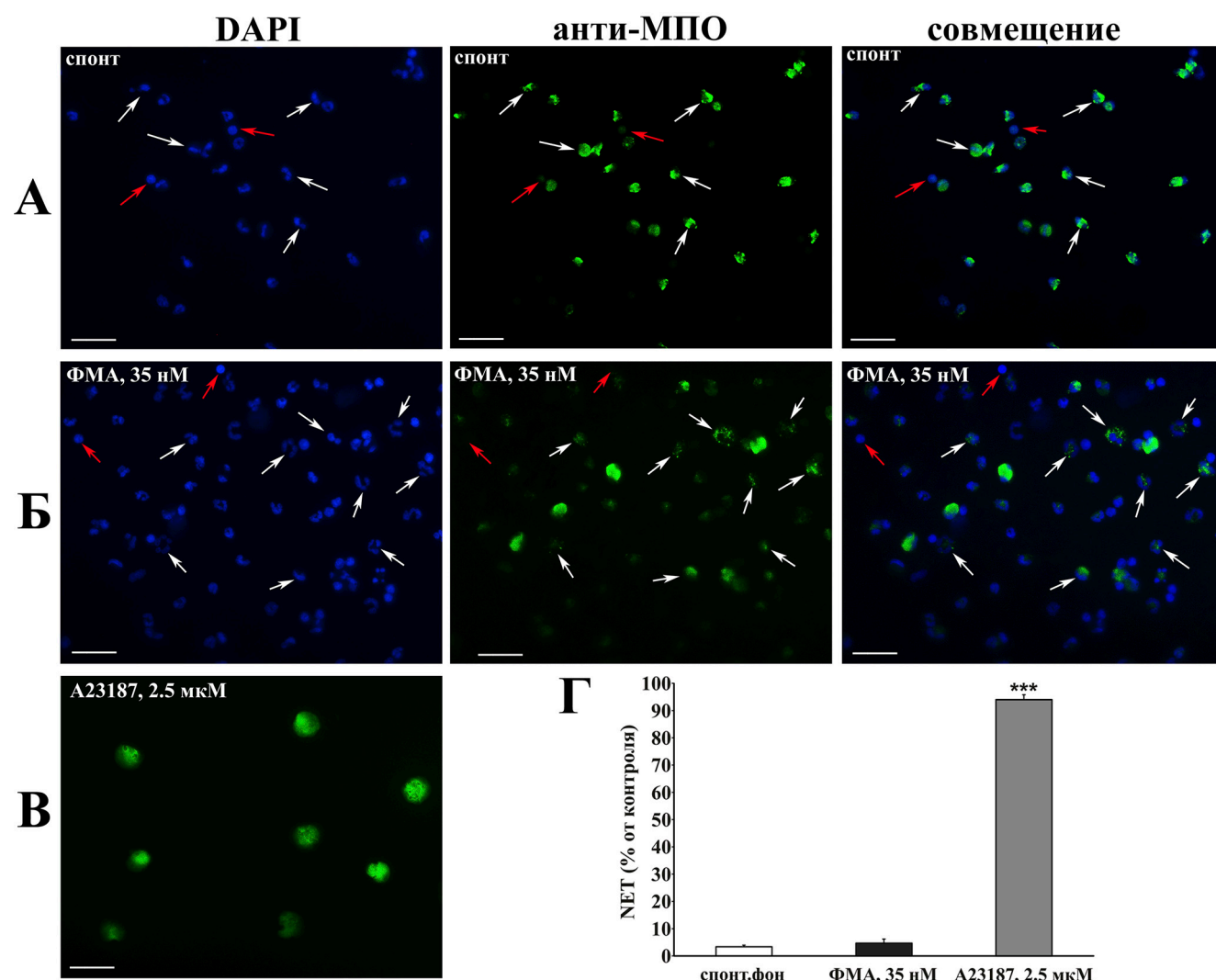


Рис. 1. Оценка NETоза, индуцированного в нейтрофилах кролика породы Советская шиншилла ФМА и A23187. Свежевыделенные нейтрофилы кролика, адгезированные на покровных стеклах, инкубировали в присутствии растворителя (А), ФМА (35 нМ) (Б) или A23187 (2,5 мкМ) (В) в течение 3 ч (ФМА) или 4 ч (A23187). Клетки фиксировали в 4%-ном параформальдегиде и окрашивали флуоресцентными красителями. (А) Для оценки чистоты выделения нейтрофилы кролика окрашивали DAPI (тест на хроматин, голубое свечение) и меченными FITC моноклональными антителами против МПО (зеленое свечение). Белые стрелки указывают на нейтрофилы, красные — на мононуклеары. Для оценки NETоза нейтрофилы кролика окрашивали меченными FITC моноклональными антителами против МПО и DAPI (Б) или SYBR Green (В). Масштаб — 25 мкм. (Г) Гистограмма, отражающая процент NETоза, индуцированного различными стимулами, $n = 5$, *** $p < 0,001$

рование проводили с помощью камеры Leica DC300F (Leica Microsystems, Германия). Подсчитывали общее количество клеток и количество нетотических клеток в каждом поле зрения, оценивали процент NETоза в нескольких полях зрения (не менее 500 клеток).

Статистическая обработка. Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы GraphPad InStat 3.06 (GraphPad Software, США). Данные в тексте и на рисунках представлены как среднее \pm стандартная ошибка среднего. Статистический анализ осуществляли с использованием параметрических методов, статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Использование метода одноступенчатого градиента плотности Ficoll-Нураque, ранее разработанного для выделения нейтрофилов человека [17], не позволило получить чистую фракцию нейтрофилов кролика – по-видимому, из-за плотностных особенностей этих клеток. В связи с этим в работе пришлось изменить ряд параметров выделения, что позволило нам получить чистую фракцию нейтрофилов. Чистоту выделения нейтрофилов оценивали в предварительных экспериментах с использованием меченных FITC моноклональных антител против МПО. МПО является компонентом азурофильных гранул нейтрофилов, которые отсутствуют в мононуклеарных клетках (моноциты, лимфоциты). В покое нейтрофилах, как правило, можно наблюдать характерное распределение МПО в составе гранул, заполняющих цитозоль клетки, тогда как в нетотических нейтрофилах МПО колокализует с деконденсированным хроматином. На рис. 1А можно видеть неактивированные нейтрофилы кролика, маркированные зеленой меткой (МПО, белые стрелки), в то время как отдельные мононуклеары такой маркировкой не обладают (красные стрелки).

Поскольку в научной литературе практически отсутствует информация о способности нейтрофилов кролика к NETозу [16], нам было интересно выяснить, будут ли эти клетки образовывать NET в ответ на классические активаторы этого процесса, ФМА и кальциевый ионофор A23187 в системе *in vitro*. Для этого клетки инкубировали в присутствии ФМА в возрастающих концентрациях (от 35 нМ до 100 нМ) или 2,5 мкМ A23187 в течение 3 ч и 4 ч соответственно. Результаты показали (рис. 1, Б и Г), что стимуляция нейтрофилов ФМА не приводит к заметной деконденсации хроматина, характерной для NETоза человека, хотя ядерные сегменты слегка увеличивались в размерах. Увеличение дозы ФМА до 100 нМ не способствовало каким-либо изменениям в сторону NETоза. В то же время инкубация нейтрофилов с A23187 в течение 4 ч приводила к практически 100%-ной деконденсации ядерного хроматина (рис. 1, В и Г).

Поскольку ФМА является миметиком диацилглицерола, который при активации связывается с протеинкиназой C, отсутствие ответа на ФМА можно было бы объяснить недостатком этого фермента или особенностями клеточной мембраны нейтрофилов кроликов, препятствующими свободному проникновению ФМА в клетки. Другим возможным объяснением может быть низкий уровень активации НАДФН-оксидазы и связанный с этим дефицит АФК, которые необходимы для индукции ФМА-индуцированного NETоза. Для проверки этой гипотезы мы провели оценку люминол-амплифицированного окислительного взрыва, индуцированного ФМА, A23187 и fMLP. На рис. 2 можно видеть, что все три классических активатора окислительного взрыва вызывали крайне низкую стимуляцию образования АФК у нейтрофилов кролика по сравнению с нейтрофилами человека, что может объяснить отсутствие у них NETоза в ответ на ФМА. Как нами было обнаружено ранее, NETоз в ответ на кальциевые ио-

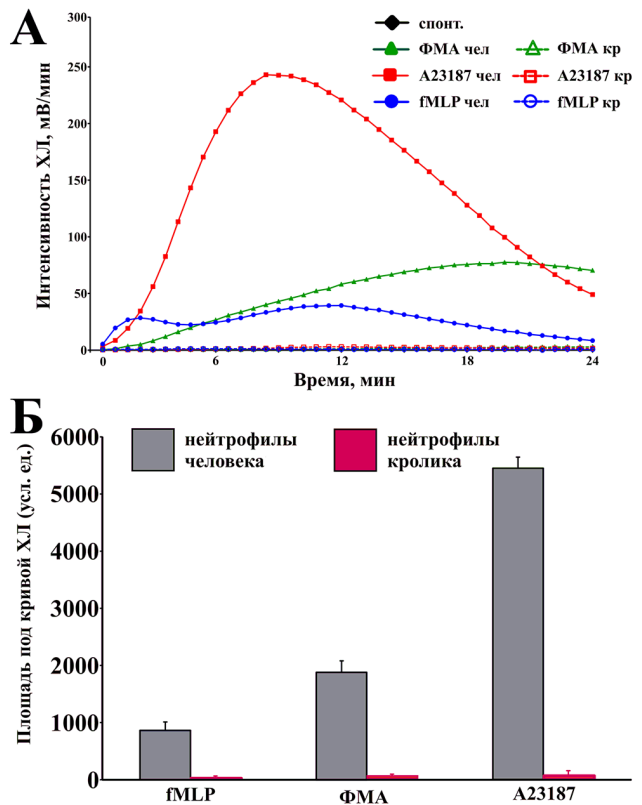


Рис. 2. Оценка окислительного взрыва нейтрофилов кролика, индуцированного различными стимулами. Нейтрофилы кролика стимулировали ФМА (35 нМ), A23187 (2,5 мкМ) или fMLP (800 нМ) в присутствии 80 мкМ люминола. Люминол-зависимую хемилюминесценцию (ЛЗХЛ) оценивали сразу после добавления стимулов в планшетном хемилюминометре Лусу 1. (А) Представлены типичные кинетические кривые ЛЗХЛ, индуцированной в нейтрофилах кролика активаторами окислительного взрыва. Для сравнения приведены типичные кинетические кривые ЛЗХЛ, полученные для нейтрофилов человека [17]. По оси абсцисс: время, мин. По оси ординат: интенсивность хемилюминесценции, мВ/мин. (Б) Представлена эмиссия света, индуцированная активаторами окислительного взрыва и выраженная в виде площади под кривыми ЛЗХЛ, $n = 5$.

нофоры может происходить и без стимуляции НАДФН-оксидазы и в основном зависит от митохондриальных АФК [19]. В этой связи, низкий уровень окислительного взрыва под влиянием A23187 не играет существенной роли в этом процессе. Что касается fMLP, то этот хемоаттрактант не является активатором образования NET [19].

В научной базе данных PubMed практически отсутствуют публикации, касающиеся способности нейтрофилов кроликов осуществлять NETоз. Только в единственной статье Пулавендран и соавт. [16] было показано в системе *in vivo*, что нейтрофилы кроликов выбрасывают NET в тканях легких и печени после инфицирования животных возбудителем туляремии. При этом NET не оказывали защитного действия от патогена. Отсутствие информации о NETозе у кроликов может быть связано, по нашему мнению, с превалированием у нейтрофилов этих животных иных эффекторных функций, например, фагоцитоза и деградации. Вместе с тем, в связи с широким использованием кроликов в качестве лабораторных животных и тестированием на них большого

количества химических препаратов, необходимо учитывать возможную активацию NETоза и его цитопатологическое действие на органы и ткани, а также его роль в патогенезе многих аутоиммунных и воспалительных заболеваний.

Таким образом, в представленной работе показано, что нейтрофилы кроликов породы Советская шиншилла не образуют NET в ответ на ФМА в широком диапазоне концентраций, однако с высокой интенсивностью выбрасывают NET в ответ кальциевый ионофор A23187. Отсутствие ответа на ФМА может быть обусловлено низким уровнем образования АФК как важного медиатора этого процесса.

Работа выполнена в рамках проекта «Молекулярные и клеточные основы иммунитета» (проект 21-1-21, номер ЦИТИС 121042600047-9). Образцы крови кроликов получали в компании «НПО Петровакс Фарм». Эксперименты проведены с соблюдением этических норм работы с животными и одобрены Комиссией по биоэтике «НПО Петровакс Фарм» (протокол 204092022, от 27 сентября 2022 г.). Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Brinkmann V., Reichard U., Goosmann C., Fauler B., Uhlemann Y., Weiss D.S., Weinrauch Y., Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*. 2004;303(5663):1532–1535.
2. Urban C.F., Ermert D., Schmid M., Abu-Abed U., Goosmann C., Nacken W., Brinkmann V., Jungblut P.R., Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. *PLoS Pathog.* 2009;5(10):e1000639.
3. Vorobjeva N.V., Chelombitko M.A., Sud'ina G.F., Zinovkin R.A., Chernyak B.V. Role of mitochondria in the regulation of effector functions of granulocytes. *Cells*. 2023;12(18):2210.
4. Neumann A., Brogden G., von Köckritz-Blickwede M. Extracellular traps: an ancient weapon of multiple kingdoms. *Biology (Basel)*. 2020;9(2):34.
5. Zhang X., Zhuchenko O., Kuspa A., Soldati T. Social amoebae trap and kill bacteria by casting DNA nets. *Nat. Commun.* 2016;7:10938.
6. Hawes M., Allen C., Turgeon B.G., Curlango-Rivera G., Minh Tran T., Huskey D.A., Xiong Z. Root border cells and their role in plant defense. *Annu. Rev. Phytopathol.* 2016;54:143–161.
7. Vorobjeva N.V., Pinegin B.V. Neutrophil extracellular traps: mechanisms of formation and role in health and disease. *Biochemistry (Mosc.)*. 2014;79(12):1286–1296.
8. Pinegin B., Vorobjeva N., Pinegin V. Neutrophil extracellular traps and their role in the development of chronic inflammation and autoimmunity. *Autoimmun. Rev.* 2015;14(7):633–640.
9. Vorobjeva N.V., Chernyak B.V. NETosis: molecular mechanisms, role in physiology and pathology. *Biochemistry (Mosc.)*. 2020;85(10):1178–1190.
10. Vorobjeva N.V. Neutrophil extracellular traps: new aspects. *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2020;75(4):173–188.
11. Papayannopoulos V. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 2018;18(2):134–147.
12. Cools-Lartigue J., Spicer J., Najmeh S., Ferri L. Neutrophil extracellular traps in cancer progression. *Cell. Mol. Life Sci.* 2014;71(21):4179–4194.
13. Baksheeva V.E., Tiulina V.V., Iomdina E.N., et al. Tear nanoDSF denaturation profile is predictive of glaucoma. *Int. J. Mol. Sci.* 2023;24(8):7132.
14. Chistyakov D.V., Gancharova O.S., Baksheeva V.E., Tiulina V.V., Goriainov S.V., Azbukina N.V., Tsarkova M.S., Zamyatnin A.A., Jr., Philippov P.P., Sergeeva M.G., Senin I.I., Zernii E.Y. Inflammation in dry eye syndrome: identification and targeting of oxylipin-mediated mechanisms. *Biomedicines*. 2020;8(9):344.
15. Livingston E.T., Mursalin M.H., Callegan M.C. A Pyrrhic victory: the PMN response to ocular bacterial infections. *Microorganisms*. 2019;7(11):537.
16. Pulavendran S., Prasanthi M., Ramachandran A., Grant R., Snider T.A., Chow V.T.K., Malayer J.R., Teluguakula N. Production of neutrophil extracellular traps contributes to the pathogenesis of *Francisella tularemia*. *Front. Immunol.* 2020;11:679.
17. Vorobjeva N., Dagil Y., Pashenkov M., Pinegin B., Chernyak B. Protein kinase C isoforms mediate the formation of neutrophil extracellular traps. *Int. Immunopharmacol.* 2023;114:109448.
18. Kouh F., Gressier B., Luyckx M., Brunet C., Dine T., Ballester L., Cazin M., Cazin J.C. A simple method for isolating human and rabbit polymorphonuclear neutrophils (PMNs). *Biol. Pharm. Bull.* 2000;23(11):1382–1383.
19. Vorobjeva N., Galkin I., Pletjushkina O., Golyshev S., Zinovkin R., Prihodko A., Pinegin V., Kondratenko I., Pinegin B., Chernyak B. Mitochondrial permeability transition pore is involved in oxidative burst and NETosis of human neutrophils. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* 2020;1866(5):165664.

Поступила в редакцию 10.12.2023

После доработки 05.04.2024

Принята в печать 16.04.2024

RESEARCH ARTICLE

Peculiarities of neutrophil extracellular traps formation in chinchilla rabbits

N.V. Vorobjeva^{1, *} , M.S. Muntyan² 

¹Department of Immunology, Biology Faculty, Lomonosov Moscow State University, 1–12 Leninskie Gory, Moscow, 119234, Russia;

²Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University,
1–40 Leninskie Gory, Moscow, 119234, Russia

*e-mail: nvvorobjeva@mail.ru

Neutrophil extracellular traps (NETs) are decondensed nuclear chromatin, decorated with bactericidal proteins of various cell organelles and performing an effector function aimed to combat pathogens at the site of inflammation. At the same time, NETs play an important role in the pathogenesis of many autoimmune and inflammatory diseases as well as malignancies. Rabbits are one of the most commonly used species of laboratory animals in medical and biological research. A large number of models of various diseases of the cardiovascular, immune and other human systems have been developed in rabbits. However, there is no information in the scientific literature about the ability of rabbit neutrophils to undergo NETosis in response to well-known pharmacological stimuli. The purpose of the present work was to study in *in vitro* system the ability of neutrophils of Soviet chinchilla rabbit to form NETs in response to mimetic of diacylglycerol phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) and calcium ionophore A23187. To isolate rabbit neutrophils, the one-step density gradient centrifugation on Ficoll-Hypaque method with modifications was used. Oxidative burst was assessed with luminol-amplified chemiluminescence method, and NET formation was assessed with immunofluorescence analysis. The work shows for the first time that neutrophils of Soviet chinchilla rabbit do not form NETs in response to PMA, but form traps in response to A23187, as well as have a low level of oxidative burst in response to PMA, A23187 and chemoattractant *N*-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine.

Keywords: rabbit neutrophils, neutrophil extracellular traps, NETs, oxidative burst, phorbol 12-myristate 13-acetate, A23187

Funding: The research was carried out within the framework of the Scientific Project of the State Order of the Government of Russian Federation to Lomonosov Moscow State University (project No. 121042600047-9) and Interdisciplinary Scientific and Educational School of Lomonosov Moscow State University “Molecular Technologies of the Living Systems and Synthetic Biology.”

Сведения об авторе

Воробьева Нина Викторовна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры иммунологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-46-46; e-mail: nvvorobjeva@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5233-9338>

Мунтян Мария Сергеевна — канд. биол. наук, вед. науч. сотр. отдела биоэнергетики Научно-исследовательского института физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова. Тел.: 8-495-939-53-60; e-mail: muntyan@genebee.msu.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2332-5644>