

УДК: 616.155.348:577.15]-022.7:616-002.1

Участь гідролітичних ензимів нейтрофілів у модифікації циркулюючих імунних комплексів за умов експериментального сепсису

Тетяна Думич, Соломія Парижак, Ростислав Білий

Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, Львів, Україна

Вступ. Нейтрофіли задіяні у неспецифічному імунному захисті. Патрулюючи організм, вони виявляють патогени та знищують їх за рахунок фагоцитозу, дегрануляції або ж утворення нейтрофільних позаклітинних пасток (НПП). Цей процес супроводжується вивільненням хроматину разом із ензимами гранул, зокрема нейтрофільною еластазою та іншими, здатними розщеплювати не лише компоненти патогенів, а й організму-господаря.

Мета. Ми оцінили вплив НПП на модифікацію імунних комплексів IgG-IgM при гострій формі запалення на прикладі експериментального сепсису лабораторних мишей.

Методи дослідження. У роботі використовували модель сепсису лабораторних тварин. Вміст циркулюючих IgG та IgM, а також IgG-IgM-вмісних імунних комплексів у сироватці тварин оцінювали за допомогою імуноферментного аналізу. Сироватка до індукування сепсису слугувала негативним контролем. Активність еластази, вивільненої з азурофільних гранул нейтрофілів, у досліджуваних зразках визначали після додавання флуорогенного субстрату нейтрофільної еластази. Для дослідження НПП їх забарвлювали пропідій йодидом і виявляли свічення за допомогою флуоресцентного мікроскопа.

Результати. З'ясовано, що за таких умов рівень циркулюючих IgG не зазнає суттєвих змін. Вміст тотальних IgM починає зростати одразу після індукції септичного стану та досягає максимуму на сьомий день, високий вміст IgM зберігався до закінчення експерименту (16 днів). На відміну від тотальних IgG та IgM, IgG-IgM-вмісні імунні комплекси формувались на 3 день, їхній рівень досягав максимального значення на 7-9 день від початку індукції сепсису, а після цього починав знижуватись. Зниження вмісту циркулюючих IgG-IgM-вмісних імунних комплексів супроводжувалось одночасним зростанням активності еластази (маркеру утворення НПП), вивільненої з азурофільних гранул нейтрофілів.

Висновки. Отже, поява змінених, нетипових для здорового організму комплексів імуноглобулінів за умов гострого запалення може бути ініційована НПП і вивільненими гідролітичними ензимами нейтрофільних гранул.

Ключові слова: нейтрофільні позаклітинні пастки, гостре запалення, IgG-IgM-вмісний імунний комплекс, нейтрофільна еластаза.

OPEN ACCESS

DOI: 10.25040/ntsh2019.01.03

Для листування:

м. Львів, вул. Пекарська, 69, 79010
Е-пошта: r.bilyy@gmail.com

Стаття надійшла: 05.04.2019

Прийнята до друку: 17.04.2019

Опублікована онлайн: 26.06.2019



© Тетяна Думич,
Соломія Парижак,
Ростислав Білий, 2019

ORCID IDs

Tetiana Dumych:

<https://orcid.org/0000-0002-8489-5600>

Solomiya Paryzhak:

<https://orcid.org/0000-0002-1491-3711>

Rostyslav Bilyy:

<https://orcid.org/0000-0002-2344-1349>

Конфлікт інтересів: Дослідження проводили за відсутності будь-яких комерційних або фінансових відносин, які могли б розглядатися як потенційний конфлікт інтересів.

ВНЕСОК АВТОРІВ.

Ідея дослідження: Р. Білий;

Виконання досліджень: Р. Білий,

Т. Думич, С. Парижак;

Написання і підготовка статті:

Р. Білий, Т. Думич.

Фінансування. Робота виконана за підтримки проекту Volkswagen Stiftung Grant No90361 «Sugar coated killers – how immunoglobulin glycosylation modifies immunity and autoimmunity» та проекту МОЗ України «Використання позаклітинних нейтрофільних пасток для модулювання запальних процесів», 0119U101338.

OPEN ACCESS

DOI: 10.25040/ntsh2019.01.03

For correspondence:
69, Pekarska St., Lviv, 79010
E-пошта: r.bilyy@gmail.com

Received: Apr 05, 2019

Accepted: Apr 17, 2019

Published online: June 26, 2019



© Tetiana Dumych,
Solomiya Paryzhak,
Rostyslav Bilyy, 2019

ORCID IDs

Tetiana Dumych:
<https://orcid.org/0000-0002-8489-5600>
Solomiya Paryzhak:
<https://orcid.org/0000-0002-1491-3711>
Rostyslav Bilyy:
<https://orcid.org/0000-0002-2344-1349>

Disclosures. No conflicts of interest, financial or otherwise, are declared by the author

Author Contributions:

Conceptualization:

R. Bilyy.

Investigation:

T. Dumych, S. Paryzhak, R. Bilyy.

Writing - original draft:

T. Dumych, S. Paryzhak.

Writing - review & editing: R. Bilyy.

Funding. This work was supported by the Volkswagen Stiftung Grant No90361 «Sugar coated killers - how immunoglobulin glycosylation modifies immunity and autoimmunity » and the Ministry of Health of Ukraine project «Using of extracellular neutrophils traps for modulating the inflammatory processes», 0119U101338.

Involvement of neutrophil hydrolytic enzymes in the modification of circulating immune complexes under the circumstances of experimental sepsis

Dumych T., Paryzhak S., Bilyy R.

Danylo Halytsky Lviv National Medical University, Lviv, Ukraine

Introduction. Neutrophils play an important role in the innate immune response. While patrolling the body, they find pathogens and destroy them by means of phagocytosis, degranulation, or formation of neutrophil extracellular traps (NETs). The latter process is accompanied by the release of chromatin along with granular enzymes, such as neutrophil elastase. Neutrophil-released enzymes are capable of breaking not only pathogens but also components of the host organism.

Objectives. In the current work, we investigated the NETs effect on the composition of circulating IgG-IgM immune complexes at different stages of experimental sepsis-induced in laboratory mice.

Research methods. In our study, we used an animal model of induced sepsis. The levels of circulating IgG and IgM, as well as IgG-IgM-containing immune complexes in sera were evaluated by using an enzyme-linked immunosorbent assay. Sera collected before induction of sepsis served as a negative control. Neutrophil elastase activity in serum samples was measured after adding fluorogenic neutrophil elastase substrate. NET formation was studied by staining with propidium

iodide and was detected using a fluorescence microscope.

Results. It was demonstrated that under septic conditions, the level of circulating IgG does not change significantly. The content of total IgM increased rapidly immediately after sepsis induction and reached its maximum 7 days later, remaining at high levels till the end of the experiment (16 days). Unlike total IgG and IgM, IgG-IgM-containing immune complexes were formed 3 days after sepsis induction, their maximum was observed on 7-9th day and then dropped. The decrease in the amount of circulating IgG-IgM-containing immune complexes was accompanied by the enhanced level of neutrophil elastase activity (a marker of NETs formation).

Conclusions. Thus, the appearance of modified immunoglobulin complexes that are non-specific for the healthy organism in the process of acute inflammation can be initiated by NETs and released hydrolytic enzymes of neutrophil granules.

Key words: Neutrophil extracellular traps; acute inflammation; IgG-IgM-containing immune complex; neutrophil elastase.

ВСТУП

Нейтрофіли або поліморфноядерні лейкоцити є найбільшою популяцією ядерних клітин крові. Щодня у кістковому мозку виробляється $\sim 10^{11}$ нових клітин. Нейтрофіли є ефекторними клітинами неспецифічного імунного захисту (Lekstrom-Himes and Gallin 2000; Nathan 2006; Mayadas, Cullere, and Lowell 2014). Вони постійно патрулюють організм і, виявивши патоген, швидко знищують його за рахунок фагоцитозу, деградуляції (Nauseef 2007) або ж вивільнення нейтрофільних позаклітинних пасток (НПП) (Brinkmann et al. 2004). НПП складаються з деконденсованого хроматину (рис. 1) і антимікробних факторів, враховуючи еластазу та мієлопероксидазу (Brinkmann et al. 2004) азурофільних гранул нейтрофілів.

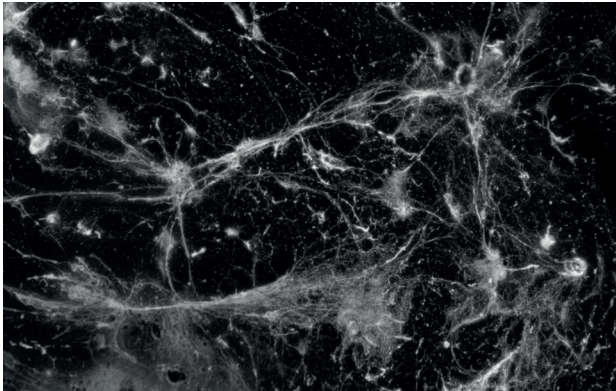


Рис. 1. Утворені нейтрофільні позаклітинні пастки складаються з ниток деконденсованої ДНК з приєднаними до неї нейтрофільними гранулами та їхнім вивільненим вмістом, що володіють потенційною протеазною активністю. Візуалізація за допомогою флуоресцентної мікроскопії та фарбування пропідій йодидом, об'єктив 40x, 0.75NA

З одного боку, формування НПП корисне, бо цей процес забезпечує антимікробну функцію шляхом вловлювання і знищення позаклітинних патогенів у кровотоці та тканинах (McDonald et al. 2012; Brinkmann et al. 2004), чи обмеження ураженої ділянки запалення (Bilyu et al. 2016). З іншого боку, вивільнені під час цього процесу ензими здатні пошкоджувати епітеліальні та ендотеліальні клітини *in vitro* (Saffarzadeh et al. 2012). Крім того, утворення НПП може призводити до оклюзії судин (Jiménez-Alcázar et al. 2017) та наступної відмови органа. НПП також беруть участь в аутоімунних хворобах (хронічне запалення) (Papaioannopoulos

and Zychlinsky 2009; Podolska et al. 2018) та сепсисі (гостре запалення) (Clark et al. 2007; Shen et al. 2017). Останні дані щодо ролі НПП у забезпеченні захисної реакції та модулюванні патологічних процесів підсумовано в оглядах (Boeltz et al. 2019; Podolska et al. 2018). Активація нейтрофілів супроводжується вивільненням протеаз, які можуть взаємодіяти з іншими молекулами (Futamata et al. 2018). Імуноглобулін G (IgG) – найбільш поширений тип антитіл у крові людини і відіграє вирішальну роль в імунній відповіді (Flaherty 2012; Lux et al. 2010). Імуноглобулін M (IgM) з'являється при первинній імунній відповіді на раніше невідомі антигени і слугує маркером гострої фази запального процесу (Ehrenstein and Notley 2010). Запальні захворювання супроводжуються появою у сироватці хворих змінених антитіл, яких немає у здорових людей (Magorivska et al. 2018; Knopf et al. 2018), та появою у сироватці імунних комплексів (Tachovsky et al. 1976; Poskitt and Poskitt 1985; Huber et al. 1989; Marcello et al. 2009). До складу таких комплексів входять імуноглобуліни різних класів та інші компоненти (Huber et al. 1989; Sjöwall et al. 2015; Poskitt and Poskitt 1985). Ми з'ясували, що за умов хронічного запалення, а саме при розсіяному склерозі (Paryzhak et al. 2018), вивільнені нейтрофілами ензими здатні впливати на циркулюючі у сироватці імунні комплекси.

Оскільки нейтрофіли задіяні при хронічному та при гострому запаленні, то метою нашої праці було оцінити вплив утворення НПП на модифікацію IgG-IgM-вмісних імунних комплексів при гострому запаленні на прикладі сепсису лабораторних тварин. Оцінку утворення НПП виконували за допомогою маркерного ензиму – еластази, вивільненої з азурофільних гранул нейтрофілів.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Усі маніпуляції з тваринами проводили відповідно до рішення біоетичної комісії ЛНМУ імені Данила Галицького (протокол № 8/2017-09-18) та згідно з положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986), та Закону України 2006 р. «Про захист тварин від жорстокого поводження».

Для ініціювання септичного стану лабораторним мишам лінії C57BL/6N індукували перитоніт шляхом внутрішньочеревного введення фекальної суспензії, як описано (Nowak et al. 2012). Після цього у тварин розвивався полімікробний сепсис (Stortz et al. 2017). У фекаліях мишей містяться бактерії Clostridiales, Bacteroidales, Actinobacteria, Lactobacillus та інші, які можуть змінюватись залежно від раціону харчування, штаму та віку тварин. Серед Clostridiales та Bacteroidales переважають Lachnospiraceae та Porphyomonadaceae (Nozu, Ueno, and Hayashimoto 2016; Parker et al. 2018). Фекальний матеріал дорослих мишей збирали безпосередньо перед експериментом, зважували та суспендували у стерильній воді до кінцевої концентрації 80 мг/мл. Отриману суспензію вводили в очеревину мишей у дозі 1,5 мг/г маси тварини. Кров (не більше як 100 мкл) забирали із хвостової вени мишей перед експериментом (0 день), 1-3, 7-9 та 14-16 день від моменту індукування сепсису. Для попередження крововтрати та передчасної загибелі мишей поділили на три групи (у кожній $n = 4$), тому забір крові однієї когорти відбувався не частіше як через 6 днів.

Для визначення вмісту циркулюючих IgG та IgM, а також IgG-IgM-вмісних імунних комплексів проводили імуноферментний аналіз. Відповідний антиген у 0,1 М карбонатному/бікарбонатному буфері рН 9,6, насорбовували на імунологічні планшети NUNC MaxiSorp (ThermoFischer Scientific, США). Відмивали забуференим фізіологічним розчином (ЗФР) з додаванням 0,5% Tween-20 (ЗФР-Т). Вільні сайти зв'язування блокували (2 год, 37 °C) 3 % розчином бичачого сироваткового альбуміну (Sigma-Aldrich, США) у ЗФР-Т. Після відмивання додавали сироватку у відповідному розведенні, інкубували 1 год за кімнатної температури та відмивали. Мічені пероксидазою хрому антитіла проти мишачих IgG чи IgM (Jackson ImmunoResearch, ВБ) додавали у розведенні 1:20 000 та інкубували 1 год. Планшети відмивали та вносили субстрат 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (Sigma-Aldrich, США). Реакцію зупиняли 10 % сульфатною кислотою та вимірювали поглинання при 450 нм, використовуючи мікропланшетний аналізатор PerkinElmer HTS 7000 (Perkin Elmer, США).

Вимірювання активності еластази, вивільненої з азурофільних гранул нейтрофілів, у зразках сироватки мишей проводили як описано (Paryzhak et al. 2018). Коротко, у лунку чорного планшета (ThermoFischer Scientific, США) вносили 10 мкл сироватки і 89 мкл ЗФР та додавали 1 мкл 15 мМ флуорогенного субстрату нейтральної еластази N-метоксисукцилін-Ala-Ala-Pro-Val-7-амідо-4-метилкумарину (MeOSUC-AAPV-AMC) (Santa Cruz Biotechnology, США). Через 4 год вимірювали показники флуоресценції, використовуючи мікропланшетний аналізатор PerkinElmer HTS 7000 з набором фільтрів збудження 365 нм та поглинання 460 нм. Фермент еластазу (Sigma-Aldrich, США) використовували як позитивний контроль активності.

Для дослідження флуоресценції використовували мікроскоп Olympus bx51 (Olympus, Японія). НПП забарвлювали пропідій йодидом (довжина хвилі збудження 536 нм, емісії 617 нм), свічення ідентифікували за допомогою високоапартурного об'єктива 40x, 0.75NA та камери LUMC-B11/Sony (Labtron, ВБ).

Результати представлені як середнє значення \pm середнє квадратичне відхилення щонайменше трьох незалежних вимірів. Статистичний аналіз даних проводили з використанням критерію Стьюдента для визначення достовірної різниці досліджуваних параметрів на програмному забезпеченні Microsoft Excel (Microsoft, США) та GraphPad Prism 7.0 (GraphPad, США). Значення $P < 0,05$ вважалися статистично значущими.

РЕЗУЛЬТАТИ

Вплив вільної еластази азурофільних гранул нейтрофілів на модифікацію IgG-IgM-вмісних імунних комплексів при гострому запаленні вивчали на прикладі сепсису лабораторних тварин, викликаного перитонітом.

За допомогою імуноферментного аналізу визначали вміст тотальних імуноглобулінів класів IgG, IgM та IgG-IgM-вмісних імунних комплексів у сироватках мишей (рис. 2). Статистично достовірних змін для IgG не було відмічено, їхній рівень залишався на сталому рівні як до, так і після індукції

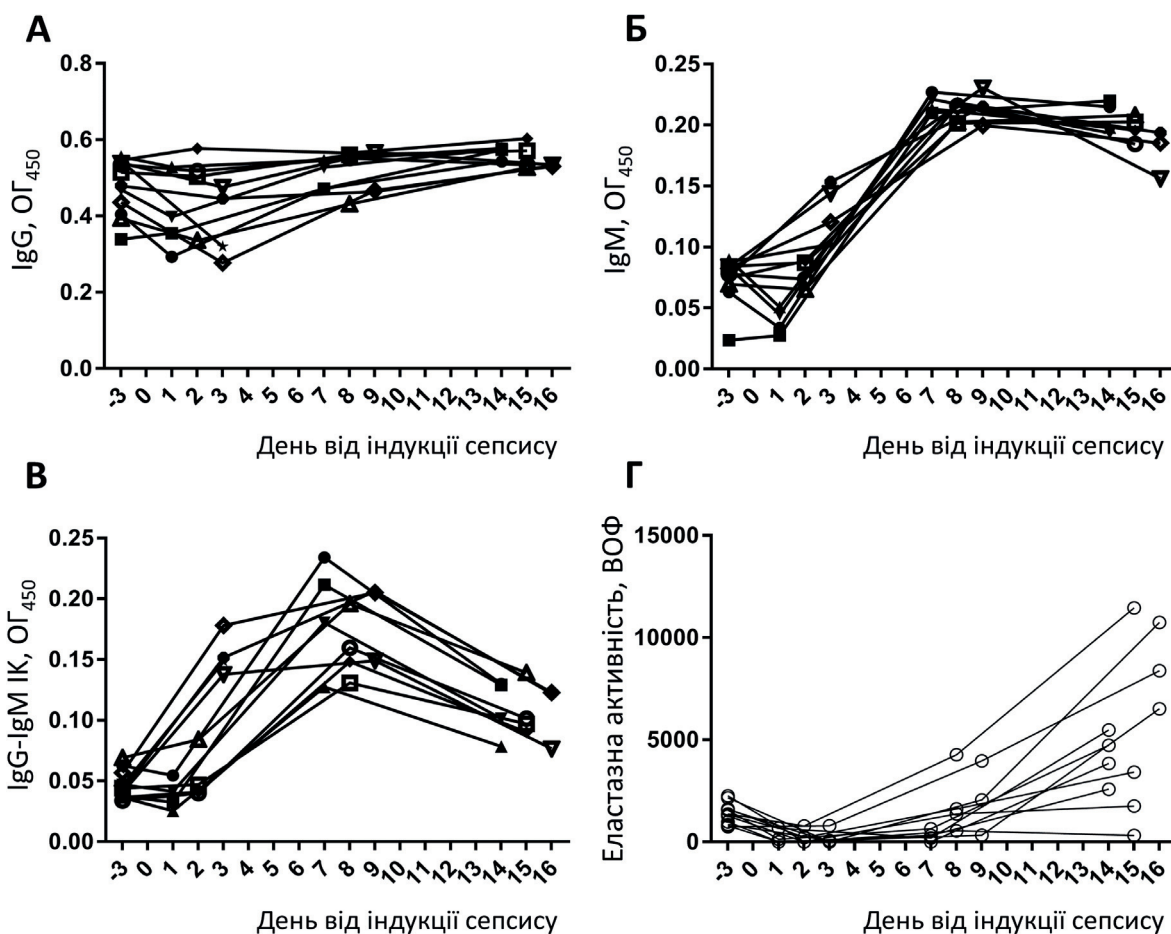


Рис. 2. Вміст тотальних імуноглобулінів класів IgG (А), IgM (Б), IgG-IgM імунних комплексів (В) та еластазна активність (Г) у сироватці лабораторних мишей до та після індукування у них сепсису. Лінії з'єднують показники окремих тварин, точками позначено дні забору крові. Індукцію сепсису проводили в день «0». IgG-IgM ІК – IgG-IgM-вмісні імунні комплекси; ОГ – оптична густина; БОФ – відносні одиниці флуоресценції

септичного запалення черевної порожнини мишей (рис. 2, А).

Циркулюючі IgM задіяні в опсонізації та подальшому швидкому усуненні мікроорганізмів (Racine and Winslow 2009). Отримані під час виконання роботи дані засвідчили, що вміст тотальних IgM при викликаному перитонітом сепсису, починав зростати відразу після індукції запального процесу, досягав максимального значення на сьомий день та зберігався на такому рівні до закінчення експерименту (16 день) (рис. 2, Б).

На відміну від тотальних IgG та IgM, IgG-IgM-вмісні імунні комплекси формувались на 3 день, їхній рівень досягав максимального значення на 7-9 день від початку індукції сепсису, а після цього починав

знижуватись (рис. 2, В). Зниження вмісту IgG-IgM-вмісних циркулюючих імунних комплексів супроводжувалось одночасним зростанням активності вільної еластази (рис. 2, Г) азурофільних гранул нейтрофілів. Таке руйнування цілком ймовірно може бути захисною реакцією організму у відповідь на гостре запалення. Адже імунні комплекси мають здатність до осідання та накопичення у тканинах, що призводить до виникнення запалення у цих місцях, як це показано для хронічного аутоімунного захворювання (Toong, Adelstein, and Phan 2011). Взаємозв'язок процесів руйнування IgG-IgM-вмісних імунних комплексів та зростання еластазної активності узагальнено на рис. 3.

ОБГОВОРЕННЯ. Сепсис – гетерогенне порушення, зумовлене нерегульованою ре-

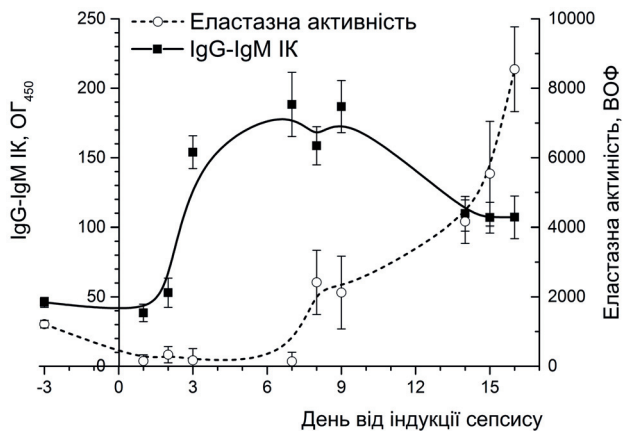


Рис. 3. Визначення вмісту IgG-IgM імунних комплексів і вільної еластазної активності у сироватках мишей після індукування сепсису. IgG-IgM ІК – IgG-IgM-вмісні імунні комплекси; ОГ – оптична густина; ВОФ – відносні одиниці флуоресценції

акцією організму господаря на інфекцію (Vincent et al. 2013; Singer et al. 2016), і є складною взаємодією прозапальних та протизапальних процесів. Традиційно, сепсис супроводжується початковою гіперзапальною фазою, що триває кілька днів і характеризується синдромом системної запальної відповіді, а згодом змінюється більш тривалою імуносупресивною фазою (Hotchkiss, Monneret, and Payen 2013), яка зазвичай характеризується дисфункцією органів, і називається компенсаторним синдромом протизапальної відповіді (Rello et al. 2017).

Нейтрофільні гранулоцити є першою ланкою імунного захисту та задіяні у боротьбі з бактерійним вторгненням (Fink and Warren 2014). Інгібування специфічних молекул адгезії, таких як CD11a, CD44 і CD162, не тільки пригнічує залучення нейтрофілів, але також захищає від септичного ушкодження легень (Asaduzzaman et al. 2009; Hasan et al. 2011; Asaduzzaman et al. 2008). У відповідь на стимуляцію, нейтрофіли здатні формувати НПП (Boeltz et al. 2019). За таких умов, крім деконденсованого хроматину, вивільняються ензими нейтрофільних гранул, зокрема еластаза. Еластаза азурофільних гранул нейтрофілів після виходу з клітин може перебувати у вільному стані або бути зв'язаною з НПП та ДНК. Разом з іншими протеазами, відіграє роль у деградації патогенів і забезпечує

найбільш ранній імунний захист організму. Крім того, за умов хронічного запалення, а саме при розсіяному склерозі, вивільнена еластаза азурофільних гранул нейтрофілів впливає на циркулюючі у сироватці імунні комплекси та зміну глікозилювання імуноглобулінів (Paryzhak et al. 2018). У цьому випадку спостерігається поява сіалованих імуноглобулінів. Глікани імуноглобуліну обернені один до одного та несуть негативний заряд через наявність термінальних залишків сілової кислоти. Таке взаємне розташування здатне змінювати Fc ділянку імуноглобулінів (Scanlan, Burton, and Dwek 2008) та впливати на спорідненість із про- та антизапальними Fc γ R рецепторами. Отож, імуноглобуліни, які розпізнають однакові антигени, але містять у своєму складі відмінні глікани володіють різною афінністю до Fc γ R рецепторів (Kaneko, Nimmerjahn, and Ravetch 2006) і можуть стимулювати розвиток про- чи антизапальної відповіді (Biermann et al. 2016). Зв'язування еластаз з ДНК та білками (Dubois et al. 2012; Kummarapurugu et al. 2018) спричиняє локалізацію її потенційно шкідливої активності до ділянок утворення, наприклад, локусів подагри (Schauer et al. 2014). Часу інгібування активності має бути достатньо, щоб макрофагальна система поглинула індуктори НПП та їхні залишки. Останні дані свідчать, що при великому антигенному навантаженні, як це є при сепсисі, вивільнені НПП переважають здатність фагоцитарної систем організму до їхнього усунення, що стає причиною багатьох патологій (Podolska et al. 2018). Очевидно, що такий ефект є і щодо впливу на циркулюючі IgG-IgM-вмісні імунні комплекси, які виникають внаслідок протеолітичної дії вивільнених ензимів.

Отже, ми з'ясували, що за умов гострого запалення, зокрема сепсису, відбувається руйнування IgG-IgM-вмісних імунних комплексів за рахунок зростання активності вільної еластази, вивільненої з азурофільних гранул нейтрофілів. Вона вивільняється під час активації нейтрофілів у відповідь на подразнюючі чинники.

Література

1. Asaduzzaman M., Rahman M., Jeppsson B., Thorlacius H. P-selectin glycoprotein-ligand-1 regulates pulmonary recruitment of neutrophils in a platelet-independent manner in abdominal sepsis. *Br J Pharmacol.* 2009;156(2):307–15. doi:10.1111/j.1476-5381.2008.00021.x.
2. Asaduzzaman M., Zhang S., Lavasani S., Wang Y., Thorlacius H. LFA-1 and MAC-1 mediate pulmonary recruitment of neutrophils and tissue damage in abdominal sepsis. *Shock.* 2008;30(3):254-9. doi:10.1097/shk.0b013e318162c567.
3. Biermann MHC, Griffante G., Podolska M.J., Boeltz S., Stürmer J., Muñoz L.E., Bilyy R., Herrmann M. Sweet but dangerous – the role of immunoglobulin G glycosylation in autoimmunity and inflammation. *Lupus.* 2016;25(8):934-42. doi:10.1177/0961203316640368.
4. Bilyy R., Fedorov V., Vovk V., Leppkes M., Dumych T., Chopyak V., Schett П., Herrmann M. Neutrophil Extracellular Traps Form a Barrier between Necrotic and Viable Areas in Acute Abdominal Inflammation. *Front Immunol.* 2016;7:424. doi:10.3389/fimmu.2016.00424.
5. Boeltz S., Amini P., Anders H.J., Andrade F., Bilyy R., Chatfield S., Cichon I., Clancy D.M., Desai J., Dumych T., Dwivedi N., Gordon R.A., Hahn J., Hidalgo A., Hoffmann M.H., Kaplan M.J., Knight J.S., Kolaczowska E., Kubes P., Leppkes M., Manfredi A.A., Martin S.J., Maueröder C., Maugeri N., Mitroulis I., Munoz L.E., Nakazawa D., Neeli I., Nizet V., Pieterse E., Radic M.Z., Reinwald C., Ritis K., Rovere-Querini P, Santocki M, Schauer C, Schett G, Shlomchik MJ, Simon HU, Skendros P, Stojkov D, Vandenabeele P, Berghe TV, van der Vlag J, Vitkov L, von Köckritz-Blickwede M, Yousefi S, Zarbock A, Herrmann M. To NET or not to NET: current opinions and state of the science regarding the formation of neutrophil extracellular traps. *Cell Death Differ.* 2019;26(3):395–408. doi:10.1038/s41418-018-0261-x.
6. 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):1532–5. doi:10.1126/science.1092385.
7. Clark S.R., Ma AC, Tavener SA, McDonald B, Goodarzi Z, Kelly MM, Patel KD, Chakrabarti S, McAvoey E, Sinclair GD, Keys EM, Allen-Vercoe E, Devlin R, Doig CJ, Green FH, Kubes P. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat Med.* 2007;13(4):463–9. doi:10.1038/nm1565.
8. Dubois A. V., Gauthier A., Bréa D, Varaigne F, Diot P, Gauthier F, Attucci S. Influence of DNA on the Activities and Inhibition of Neutrophil Serine Proteases in Cystic Fibrosis Sputum. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2012;47(1):80–6. doi:10.1165/rcmb.2011-0380OC.
9. Ehrenstein M.R., Notley CA. The importance of natural IgM: scavenger, protector and regulator. *Nat Rev Immunol.* 2010;10(11):778–86. doi:10.1038/nri2849.
10. Fink M.P., Warren H.S. Strategies to improve drug development for sepsis. *Nat Rev Drug Discov.* 2014;13(10):741–58. doi:10.1038/nrd4368.
11. Flaherty D.K. Antibodies. In: *Immunology for Pharmacy.* Elsevier; 2012. p. 70-8. doi:10.1016/B978-0-323-06947-2.10009-4.
12. Futamata E., Masuda S., Nishibata Y., Tanaka S., Tomaru U., Ishizu A. Vanishing Immunoglobulins: The Formation of Pauci-Immune Lesions in Myeloperoxidase-Antineutrophil Cytoplasmic Antibody-Associated Vasculitis. *Nephron.* 2018;138(4):328–30. doi:10.1159/000485902.
13. Hasan Z., Palani K., Rahman M., Thorlacius H. Targeting CD44 expressed on neutrophils inhibits lung damage in abdominal sepsis. *Shock.* 2011;35(6):567–72. doi:10.1097/SHK.0b013e3182144935.
14. Hotchkiss R.S., Monneret G., Payen D. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nat Rev Immunol.* 2013;13(12):862–74. doi:10.1038/nri3552.
15. Huber C., Rüter A, Herrmann M, Krapf F, Kalden JR. C3-containing serum immune complexes in patients with systemic lupus erythematosus: correlation to disease activity and comparison with other rheumatic diseases. *Rheumatol Int.* 1989;9(2):59–64. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2814209>.
16. Jiménez-Alcázar M., Rangaswamy C., Panda R., Bitterling J., Simsek Y.J., Long AT, Bilyy R, Krenn V, Renné C, Renné T, Kluge S, Panzer U, Mizuta R, Mannherz HG, Kitamura D, Herrmann M, Napirei M, Fuchs TA. Host DNases prevent vascular occlusion by neutrophil extracellular traps. *Science.* 2017;358(6367):1202-6. doi:10.1126/science.aam8897.
17. Kaneko Y., Nimmerjahn F, Ravetch J V. Anti-inflammatory activity of immunoglobulin G resulting from Fc sialylation. *Science.* 2006;313(5787):670-3. doi:10.1126/science.1129594.
18. Knopf J., Magorivska I., Maler J.M., Spitzer P., Bilyy R., Biermann MHC, Hychka K, Bondt A, Wührer M, Toes REM, Schett G, Herrmann M, Muñoz LE. Low amounts of bisecting glycans characterize cerebrospinal fluid-borne IgG. *J Neuroimmunol.* 2018;320:19–24. doi:10.1016/j.jneuroim.2018.04.010.
19. Kummarapurugu AB, Afosah DK, Sankaranarayanan NV, Navaz Gangji R, Zheng S, Kennedy T, Rubin BK, Voynow JA, Desai UR. Molecular principles for heparin oligosaccharide-based inhibition of neutrophil elastase in cystic fibrosis. *J Biol Chem.* 2018;293(32):12480–90. doi:10.1074/jbc.RA118.002644.

20. Lekstrom-Himes JA, Gallin JI. Immunodeficiency diseases caused by defects in phagocytes. *N Engl J Med.* 2000;343(23):1703–14. doi:10.1056/NEJM200012073432307.
21. Lux A, Aschermann S, Biburger M, Nimmerjahn F. The pro and anti-inflammatory activities of immunoglobulin G. *Ann Rheum Dis.* 2010;69 Suppl 1:i92-96. doi:10.1136/ard.2009.117101.
22. Magorivska I, Dönczö B, Dumych T, Karmash A, Boichuk M, Hychka K, Mihalj M, Szabó M, Csánky E, Rech J, Guttman A, Vari SG, Bilyy R. Glycosylation of random IgG distinguishes seropositive and seronegative rheumatoid arthritis. *Autoimmunity.* 2018;51(3):111–7. doi:10.1080/08916934.2018.1468886.
23. Marcello A., Wirths O, Schneider-Axmann T, Degerman-Gunnarsson M, Lannfelt L, Bayer TA. Circulating immune complexes of Abeta and IgM in plasma of patients with Alzheimer's disease. *J Neural Transm.* 2009;116(7):913–20. doi:10.1007/s00702-009-0224-y.
24. Mayadas TN, Cullere X, Lowell CA. The multifaceted functions of neutrophils. *Annu Rev Pathol.* 2014;9:181–218. doi:10.1146/annurev-pathol-020712-164023.
25. McDonald B, Urrutia R, Yipp BG, Jenne CN, Kubes P. Intravascular neutrophil extracellular traps capture bacteria from the bloodstream during sepsis. *Cell Host Microbe.* 2012;12(3):324–33. doi:10.1016/j.chom.2012.06.011.
26. Nathan C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol.* 2006;6(3):173–82. doi:10.1038/nri1785.
27. Nauseef WM. How human neutrophils kill and degrade microbes: an integrated view. *Immunol Rev.* 2007;219:88–102. doi:10.1111/j.1600-065X.2007.00550.x.
28. Nowak J.E., Harmon K., Caldwell CC, Wong HR. Prophylactic zinc supplementation reduces bacterial load and improves survival in a murine model of sepsis. *Pediatr Crit Care Med.* 2012;13(5):e323-9. doi:10.1097/PCC.0b013e31824fbd90.
29. Nozu, R., Ueno, M., Hayashimoto, N. Composition of fecal microbiota of laboratory mice derived from Japanese commercial breeders using 16S rRNA gene clone libraries. *The Journal of Veterinary Medical Science.* 2016;78(6):1045–50. doi:10.1292/jvms.15-0454.
30. Papayannopoulos V., Zychlinsky A. NETs: a new strategy for using old weapons. *Trends Immunol.* 2009;30(11):513–21. doi:10.1016/j.it.2009.07.011.
31. Parker K.D., Albeke SE, Gigley JP, Goldstein AM, Ward NL. Microbiome Composition in Both Wild-Type and Disease Model Mice Is Heavily Influenced by Mouse Facility. *Front Microbiol.* 2018;9. doi:10.3389/fmicb.2018.01598.
32. Paryzhak S., Dumych T., Mahorivska I., Boichuk M., Bila G., Peshkova S., Nehrych T., Bilyy R. Neutrophil-released enzymes can influence composition of circulating immune complexes in multiple sclerosis. *Autoimmunity.* 2018;1–7. doi:10.1080/08916934.2018.1514390.
33. Podolska M.J., Mahajan A., Knopf J., Hahn J., Boeltz S., Munoz L, Bilyy R, Herrmann M. Autoimmune, rheumatic, chronic inflammatory diseases: Neutrophil extracellular traps on parade. *Autoimmunity.* 2018;51(6):281–7. doi:10.1080/08916934.2018.1519804.
34. Poskitt R.R., Poskitt P.K. Thrombocytopenia of sepsis. The role of circulating IgG-containing immune complexes. *Arch Intern Med.* 1985;145(5):891–4. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3158292>.
35. Racine R., Winslow G.M. IgM in microbial infections: taken for granted? *Immunol Lett.* 2009;125(2):79–85. doi:10.1016/j.imlet.2009.06.003.
36. Rello J, Valenzuela-Sánchez F, Ruiz-Rodriguez M, Moyano S. Sepsis: A Review of Advances in Management. *Adv Ther.* 2017;34(11):2393–411. doi:10.1007/s12325-017-0622-8.
37. Saffarzadeh M, Juenemann C, Queisser MA, Lochnit G, Barreto G, Galuska SP, Lohmeyer J, Preissner KT. Neutrophil extracellular traps directly induce epithelial and endothelial cell death: a predominant role of histones. *PLoS One.* 2012;7(2):e32366. doi:10.1371/journal.pone.0032366.
38. Scanlan CN, Burton DR, Dwek RA. Making autoantibodies safe. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008/03/18. 2008;105(11):4081–2. doi: 10.1073/pnas.0801192105.
39. Schauer C, Janko C, Munoz LE, Zhao Y, Kienhöfer D, Frey B, Lell M, Manger B, Rech J, Naschberger E, Holmdahl R, Krenn V, Harrer T, Jeremic I, Bilyy R, Schett G, Hoffmann M, Herrmann M. Aggregated neutrophil extracellular traps limit inflammation by degrading cytokines and chemokines. *Nat Med.* 2014;20(5):511–7. doi:10.1038/nm.3547.
40. Shen X-F, Cao K, Jiang J-P, Guan W-X, Du J-F. Neutrophil dysregulation during sepsis: an overview and update. *J Cell Mol Med.* 2017;21(9):1687–97. doi:10.1111/jcmm.13112.
41. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, Bellomo R, Bernard GR, Chiche J-D, Cooper-Smith CM, Hotchkiss RS, Levy MM, Marshall JC, Martin GS, Opal SM, Rubenfeld GD, van der Poll T, Vincent J-L, Angus DC. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA.* 2016;315(8):801–10. doi:10.1001/jama.2016.0287.
42. Sjöwall C, Zapf J, von Löhneysen S, Magorivska I, Biermann M, Janko C, Winkler S, Bilyy R, Schett G, Herrmann M, Muñoz LE. Altered glycosylation of complexed native IgG molecules is associated with disease activity of systemic lupus erythematosus. *Lupus.* 2015;24(6):569–81. doi:10.1177/0961203314558861.

43. Stortz, J. A., Raymond, S. L., Mira, J. C., Moldawer, L. L., Mohr, A. M., Efron, P. A. Murine Models of Sepsis and Trauma: Can We Bridge the Gap? *ILAR Journal*. 2017;58(1): 90–105. doi: 10.1093/ilar/ilx007.
44. Tachovsky T.G., Koprowski H., Lisak R.P., Theofilopoulos AN, Dixon FJ. Circulating immune complexes in multiple sclerosis and other neurological diseases. *Lancet*. 1976;308(7993):997–9. doi:10.1016/S0140-6736(76)90835-7.
45. Toong C, Adelstein S, Phan TG. Clearing the complexity: immune complexes and their treatment in lupus nephritis. *Int J Nephrol Renovasc Dis*. 2011;4:17–28. doi:10.2147/IJNRD.S10233.
46. Vincent J-L, Opal SM, Marshall JC, Tracey KJ. Sepsis definitions: time for change. *Lancet (London, England)*. 2013;381(9868):774–5. doi:10.1016/S0140-6736(12)61815-7.