

**Федеральное государственное автономное образовательное учреждение  
высшего образования "Балтийский федеральный университет имени  
Иммануила Канта"**

На правах рукописи

**Малашенко Владимир Владимирович**  
**«ГРАНУЛОЦИТАРНЫЙ КОЛОНИЕСТИМУЛИРУЮЩИЙ ФАКТОР**  
**В МОДУЛЯЦИИ АДАПТИВНОГО ИММУНОГЕНЕЗА»**

03.03.01 - физиология

Диссертация  
на соискание ученой степени кандидата  
биологических наук

Научный руководитель:  
доктор медицинских наук, профессор  
В.И. Селедцов

Калининград - 2020

## ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ</b> .....	4
<b>ВВЕДЕНИЕ</b> .....	6
<b>ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b> .....	12
1.1. Врожденные и адаптивные механизмы иммунной системы.....	12
1.1.1. Клеточная и гуморальная системы врожденного иммунитета.....	12
1.1.2. Клеточное и гуморальное звенья адаптивной системы иммунитета и их взаимодействие с системой врождённого иммунитета.....	17
1.2. Роль гранулоцитарного колониестимулирующего фактора в организме.....	19
1.2.1. Структурные и функциональные характеристики гранулоцитарного колониестимулирующего фактора и его рецептора.....	20
1.2.2. Роль гранулоцитарного колониестимулирующего фактора в регуляции иммунных процессов.....	31
<b>ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ</b> .....	33
2.1. Методы исследования.....	33
2.1.1. Выделение мононуклеарных лейкоцитов из периферической крови.....	36
2.1.2. Выделение CD14 <sup>+</sup> моноцитов/макрофагов и CD3 <sup>+</sup> Т-лимфоцитов из мононуклеарных клеток.....	36
2.1.3. Культивирование моноцитов/макрофагов и Т-клеток.....	37
2.1.4. Проточная цитофлуориметрия клеток.....	39
2.1.5. Определение концентраций цитокинов в культуральных супернатантах...	40
2.1.6. Статистический анализ.....	40
<b>ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ</b> .....	41
3.1. Чистота и жизнеспособность выделенных CD14 <sup>+</sup> и CD3 <sup>+</sup> клеток.....	41
3.2. Влияние G-CSF на поверхностные и цитокин-продуцирующие свойства моноцитов/макрофагов.....	43
3.2.1. Оценка прямых эффектов G-CSF на число CD16 <sup>+</sup> , CD119 <sup>+</sup> , CD124 <sup>+</sup> , CD197 <sup>+</sup> моноцит/макрофагов.....	43
3.2.2. Влияние G-CSF на макрофагальную секрецию TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 и IL-10.....	46

3.3. Влияние G-CSF на Т-клеточный иммуногенез.....	49
3.3.1. Влияние клеточной активации и G-CSF на число G-CSFR (CD114) <sup>+</sup> лимфоцитов в Т-клеточных субпопуляциях.....	49
3.3.2. Влияние G-CSF на субпопуляционный состав Т-лимфоцитов.....	52
3.3.3. Прямое влияние G-CSF на число CD25 <sup>+</sup> и CD38 <sup>+</sup> клеток в Т-клеточных субпопуляциях.....	58
3.3.4. Влияние G-CSF на продукцию Т-лимфоцитами про- и противовоспалительных цитокинов.....	72
<b>ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ.....</b>	<b>76</b>
<b>ВЫВОДЫ.....</b>	<b>86</b>
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....</b>	<b>87</b>

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

- CD – кластердифференцировки (*cluster of differentiation*)
- CD45 – общелейкоцитарный рецептор
- CD45RA – высокомолекулярная изоформа рецептора CD45
- МНК – моноклеарные клетки
- АПК – антигенпрезентирующие клетки
- Мц/Мф – моноцит/макрофаги
- ДК – дендритные клетки
- ЛПС – липополисахарид
- МКАТ – моноклональные антитела
- Th – Т-хелперы
- CTL – цитотоксические Т-лимфоциты
- TCR – Т-клеточный рецептор (*T-cellreceptor*)
- PPR, PRRs – паттерн распознающие рецепторы (*pattern recognition receptors*)
- ПАМП, PAMP – патоген ассоциированные молекулярные паттерны (*pathogen-associated molecular pattern*)
- DAMP – damage-associated molecular pattern
- МНС – главный комплекс гистосовместимости (*majorhistocompatibilitycomplex*)
- IL – интерлейкин
- G-CSF – гранулоцитарный колониестимулирующий фактор
- G-CSFR – рецептор гранулоцитарного колониестимулирующего фактора
- FITC – флуоресцеинизотиоцианат
- PE – фикоэритрин
- APC – аллофикоцианин
- PerCP – перидинин хлорофилл
- CD14 – мембранный белок, экспрессированный на клетках миелоидного ряда
- CD16 – низкоаффинный Fc-рецептор (Fc-гаммаRIII)
- CD119 – рецептор 1 к интерферону гамма
- CD124 – рецептор к интерлейкину 4
- TNF- $\alpha$  – фактор некроза опухоли  $\alpha$  (*tumor necrosos factor  $\alpha$* )
- CD3 – корецептор Т-клеточного рецептора
- CD4<sup>+</sup> – популяция Т-клеток, несущие молекулу CD4 (CD4-позитивные)
- CD4<sup>-</sup> – популяция Т-клеток, не экспрессирующие молекулу CD4 (CD4-негативные)

CD25 –  $\alpha$ - цепь IL-2 рецептора

CD38 – рецептор-фермент, участвующий во внутриклеточном сигналинге и межклеточной коммуникации

Ig – иммуноглобулин (immunoglobulin)

naïve – наивные Т-лимфоциты с фенотипом  $CD3^+/CD45RA^+/CD197^+$

CM – центральные Т-лимфоциты памяти с фенотипом  $CD3^+/CD45RA^-/CD197^+$

EM – эффекторные Т-лимфоциты памяти с фенотипом  $CD3^+/CD45RA^-/CD197^-$

TEMRA – терминально-дифференцированные клетки эффекторы с фенотипом  $CD3^+/CD45RA^+/CD197^-$

## ВВЕДЕНИЕ

### **Актуальность исследования**

Основное назначение иммунной системы – поддержание антигенного гомеостаза организма и элиминация патогенов. Это достигается средствами сложно организованных механизмов взаимодействия врожденных и адаптивных компонентов иммунной системы, имеющих многочисленные уровни регуляции. Одними из ключевых типов клеток участвующих в иммунологических процессах являются с одной стороны, клетки миелоидного ряда, такие как гранулоциты и моноцит/макрофаги (Мц/Мф) и с другой, лимфоидные клетки, подразделяющиеся на Т- и В-лимфоциты (Gause K.T., et al., 2017). Ключевыми цитокинами участвующими в формировании и созревании различных иммунных клеток являются гемопоэтины, к которым относятся: эритропоэтин (EPO), гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (G-CSF) (также известный как CSF3), гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF) (также известный как CSF2), макрофагальный колониестимулирующий фактор (M-CSF) (также известный как CSF1). В последнее время показано, что гемопоэтины, как и многие другие цитокины обладают плеiotропным спектром эффектами. В частности, показано, что G-CSF, в дополнение к стимулирующему действию на гранулоцитопоэз, может оказывать иммуномодулирующее воздействие на макрофагальные и лимфоидные клетки (Hollmén M., et al., 2016; Bunse C.E., et al., 2016). Однако детали этого процесса остаются малоизученными. В настоящее время, G-CSF используется в практической медицине для стимуляции врожденного, противоинфекционного иммунитета. Очевидно, что G-CSF также воздействует на адаптивный иммунитет. Цель диссертационной работы – изучить эффекты G-CSF на функциональную активность клеток, участвующих в адаптивных иммунных реакциях, и, таким образом, расширить понимание роли G-CSF в формировании долговременной иммунологической защиты.

### **Степень разработанности темы.**

G-CSF относится к цитокинам 1 типа, в эту группу также входят EPO, IL-6, гормон роста и онкостатин (Brooks A.J., et al., 2016). Он кодируется геном,

расположенным в локусе q11.2-q12 17 хромосомы. G-CSF представляет собой 174-аминокислотный спиральный белок с 4 антипараллельными  $\alpha$ -спиралями, пересекающимися под углом  $\sim 18$  градусов соединёнными с помощью двух длинных и одной короткой петель (Hausberger A., et al., 2016). G-CSF является ключевым гемопоэтином в формировании колоний гранулоцитов. Он стимулирует пролиферацию поздних клеток предшественников (Bendall L.J., Bradstock K.F., 2014; Boettcher S., Manz M.G., 2017), а также регулирует функции зрелых нейтрофилов и способствует увеличению продолжительности жизни этих клеток (Vajrami B., et al., 2016; Liska M.G., dela Peña I., 2017; Marini O., et al., 2017). G-CSF продуцируется широким спектром клеток: стромальными клетками костного мозга, фибробластами, эндотелиальными клетками, астроцитами (Carr M.J., et al., 2017; Katakura F., et al., 2019), Мц/Мф и лимфоцитами (Horiguchi H., Oguma E., 2016; Pedersen C.C., et al., 2016). Продукция G-CSF в большинстве случаев является индуцибельной, то есть зависимой от клеточного микроокружения (Horiguchi H., Oguma E., 2016). Эффекты G-CSF обусловлены его высоко специфическим взаимодействием со своим рецептором G-CSFR (CD114) (Liang W., Ferrara N., 2016). Рецептор G-CSF относится к семейству цитокиновых рецепторов I-го типа. Это единичный трансмембранный белок, не обладающий собственной киназной активностью. Он состоит из цитокинового, рецепторного, иммуноглобулин (Ig)-подобного, трех фибронектин III (FNIII)-подобных доменов и консервативной цитоплазматической последовательности (Liang W., Ferrara N., 2016; Bakherad H., et al., 2017). Как уже было упомянуто, гемопоэтические клетки предшественники и нейтрофилы не единственные клетки мишени для G-CSF, его рецептор обнаружен на широком спектре клеток, включая Мц/Мф (Christopher M.J., et al., 2011; Campbell I.K., et al., 2016; Hollmén M., et al., 2016) и лимфоциты (Touw I.P., van de Geijn G.J., 2007; MacDonald K.P., et al., 2014; Bunse C.E., et al., 2016; Peng W., 2017) G-CSF способствует клеточной миграции, пролиферации и дифференцировке посредством мультимеризации лиганд-рецепторных комплексов с последующей активацией внутриклеточных Jak/Stat/SOCS, Rac/Raf/Erk и PI3/Akt путей (Maxson J.E., et al., 2016; Zhao S., et al., 2017). Эти реакции регулируют активность различных транскрипционных факторов, тем самым оказывая влияние на белковый синтез.

G-CSF играет ключевую роль в поддержании врожденного иммунитета. Мы предполагаем, что G-CSF так же напрямую вовлечен в регуляцию адаптивного

иммуногенеза на различных стадиях его развития, и эта регуляция может в значительной степени базироваться на его непосредственном влиянии на функциональную активность Мф и лимфоидных клеток. Для определения активационного статуса и функциональной активности макрофагальных клеток мы анализировали экспрессию поверхностных молекул CD16 (низкоаффинный Fc-рецептор), CD119 (рецептор IFN- $\gamma$ ), CD124 (рецептор IL-4), CD197 (С-С-рецептор хемокина 7), а также продукцию цитокинов IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, и TNF- $\alpha$ . Идентификацию Т-клеточных субпопуляций осуществляли по экспрессии молекул CD4, CD45RA и CD197. Активационный статус Т-клеток оценивали по экспрессии молекул CD25 ( $\alpha$ -цепь рецептора IL-2) и CD38 (циклическая ADP рибозогидролаза) и продукции цитокинов: IL-2, IL-4, IL-10 и IFN- $\gamma$ .

**Цель исследования:** изучить эффекты G-CSF на функциональную активность клеток, участвующих в адаптивных иммунных реакциях.

В рамках указанной цели ставились следующие **задачи**:

1. Охарактеризовать прямые эффекты G-CSF на Мц/Мф по количеству клеток экспрессирующих молекулы: CD16, CD119, CD124, CD197.
2. Оценить влияние G-CSF на макрофагальную продукцию иммунорегуляторных цитокинов (TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-6 и IL-1 $\beta$ ).
3. Оценить влияние активационных процессов и G-CSF на мембранную экспрессию G-CSFR (CD114<sup>+</sup>) среди Т-лимфоцитов.
4. Охарактеризовать прямые эффекты G-CSF на активацию основных Т-клеточных субпопуляций (CD4-позитивных/CD4-негативных наивных Т-лимфоцитов, Т-лимфоцитов центральной и эффектроной памяти и терминально дифференцированных Т-клеточных эффекторов) по числу CD25<sup>+</sup> и CD38<sup>+</sup> клеток.
5. Оценить влияние G-CSF на продукцию Т-лимфоцитами провоспалительных (IL-2, IFN- $\gamma$ ) и противовоспалительных (IL-4, IL-10) цитокинов.

### **Научная новизна**

Впервые показано, что G-CSF способен снижать число CD119-позитивных, а также количество CD197-позитивных клеток среди активированных Мф, Представленные данные свидетельствуют о непосредственном вовлечении G-CSF в регуляцию

воспалительной и миграционной активности Мц/Мф. В диссертационной работе также впервые показана способность G-CSF прямо влиять на активацию Т-лимфоцитов. Установлено, что G-CSF может снижать продукцию IFN- $\gamma$  и усиливать продукцию IL-4 активированными Т-лимфоцитами.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Впервые продемонстрирована значимость G-CSF в непосредственной регуляции адаптивного иммуногенеза. Показано, что G-CSF способен прямо влиять на функциональную активность как Мц/Мф, так и Т-лимфоцитов. Эти данные открывают новые перспективы использования G-CSF как иммуномодулирующего препарата. Результаты диссертационной работы используются в учебном процессе в Центре медицинских биотехнологий БФУ им. И.Канта.

### **Методология и методы исследования**

В работе использовались современные высокоинформативные методы, позволяющие детально оценить функциональное состояние иммунокомпетентных клеток. Объектом исследования выступали первичные культуры Мц/Мф и Т-лимфоцитов, выделенные из мононуклеарных клеток (МНК) венозной периферической крови условно здоровых доноров.

### **Основные методы исследования:**

1. Градиентное центрифугирование на фиколле для выделения МНК.
2. Позитивная колоночная магнитная сепарация (получение чистых CD14 и CD3 позитивных клеток).
3. Культуральные методы.
4. Определение мембранной экспрессии молекул (CD14, CD16, CD119, CD124, CD3, CD4, CD45RA, CD197, CD25 и CD38) методом проточной цитометрии.
5. Определение концентрации цитокинов (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10, IL-2, IFN- $\gamma$  и IL-4) в культуральных супернатантах иммуноферментным методом.
6. Методы статистического анализа результатов. Проверка гипотезы о нормальности распределения результатов по критерию Колмогорова-Смирнова. Средневыборочная характеристика: медиана (M), первый и третий квартили (Q1, Q3).

Оценка статистической достоверности выборок, не подчиняющихся закону о нормальном распределении – непараметрический критерий Вилкоксона для зависимых выборок.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. G-CSF играет значимую роль в аутокринной и паракринной регуляции функциональной активности Мц/Мф. Он препятствует развитию классической (M1) активации макрофагальных клеток.

2. G-CSF оказывает непосредственное влияние на активацию Т-лимфоцитов и способен усиливать их противовоспалительную активность.

3. G-CSF сдерживает провоспалительные макрофагальные реакции и способствует развитию иммунных процессов, опосредуемых Th 2 типа.

### **Степень достоверности и апробация результатов**

Достаточный объем экспериментального материала, использование современного высокотехнологичного оборудования и высокоинформативных методов исследования в сочетании с адекватными критериями статистической обработки результатов позволяют говорить о высокой степени достоверности полученных результатов.

Основные положения диссертации докладывались и обсуждались на Всероссийской научно-практической школе-конференции «Аллергология и клиническая иммунология (иммунодиагностика, иммунопрофилактика и иммунотерапия)» (г. Ялта, 2015 г.); I-м Калининградском научном иммунологическом форуме (г. Калининград, 2016 г.); Всероссийской научно-практической школе-конференции «Аллергология и клиническая иммунология» (г. Сочи, 2019 г.).

### **Публикации**

По материалам диссертации опубликовано 8 научных работ, из них в ведущих рецензируемых журналах и изданиях, определенных ВАК РФ – 6 полнотекстовых статей; в материалах конференций и симпозиумов – 2 статьи и тезиса.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертация изложена на 106 страницах машинописного текста и состоит из введения, четырех глав, выводов и списка использованной литературы. Работа иллюстрирована 60 рисунками и 1 таблицей. Библиографический указатель включает 203 источника (8 отечественных и 195 иностранных).

### **Личный вклад автора**

Автор принимал непосредственное участие, на всех этапах создания диссертации начиная с разработки дизайна и планирования исследования и заканчивая получением, анализом и обобщением результатов, представленных в выводах.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1 Врожденные и адаптивные механизмы иммунной системы

Основная функция иммунной системы – поддержание целостности и гомеостатического баланса внутри организма по средствам элиминации источников антигенов как чужеродной, так и модифицированной аутологичной природы, что реализуется по средствам неспецифического (врожденного) и адаптивного (приобретенного) компонентов иммунитета. (Janeway С.А., Medzhitov R., 2002; Ярилин А.А., 2010; Хайтов Р.М., 2016).

#### 1.1.1. Клеточная и гуморальная системы врожденного иммунитета

Врожденный (естественный) иммунитет представляет собой систему клеток и молекул, взаимодействие которых обеспечивает неспецифическое распознавание и относительно быструю элиминацию агентов, несущих чужеродную антигенную структуру, а также поддерживает целостность тканей и органов организма (Ярилин А.А., 2010; Хайтов Р.М., 2016).

Врожденные механизмы неспецифического распознавания чужеродных агентов основаны на распознавании универсальных консервативных молекулярных последовательностей, характерных для широкого спектра потенциально патогенных организмов. Такие последовательности называются патоген-ассоциированными молекулярными образцами (ПАМП, PAMP - pathogen-associated molecular pattern), а группа рецепторов, распознающих эти молекулы, называется паттерн распознающими рецепторами (PPR, PRR-pattern recognition receptor) (Меджитов Р., Джаневей Ч., 2004; Crowl J.T., et al. 2017). К ПАМП относятся пептидогликаны, бактериальные липополисахариды, глюканы, маннаны, бактериальная и вирусная ДНК, одно- и двух-цепочечные молекулы РНК и др. (Меджитов Р., Джаневей Ч., 2004;). Обычно это эволюционно консервативные молекулы, которые присутствуют в разных микроорганизмах (Janeway С.А., 1992; Amarante-Mendes G.P., et al., 2018). Их распознает относительно небольшая группа PPR, обладающая различной групповой

специфичностью, благодаря чему иммунная система может по-разному реагировать на патогены разнообразной природы (Меджитов Р., Джаневей Ч., 2004). ПРР экспрессируются на всех клетках иммунной системы (Меджитов Р., Джаневей Ч., 2004; Crowl J.T., et al. 2017). Среди них можно выделить группу сигнальных ПРР, основной особенностью которых является запуск передачи сигналов, которые стимулируют эффекторные функции клеток, а также синтез клетками различных межклеточных сигнальных молекул (цитокинов, хемокинов и др.). К этой группе относятся Toll-подобные (TLR), NOD-подобные, RIG-подобные рецепторы. В человеческом организме функционирует 10 типов TLR. Их условно можно разделить на 2 группы в зависимости от локализации. Это TLR расположенные на клеточной мембране (TLR 1, 2, 4, 5, 6), отвечающие за распознавание внеклеточных патогенов, и эндосомальные (TLR 3, 7, 8, 9) – распознающие вирусные нуклеиновые кислоты. В широком смысле активация TLR приводит к запуску NF-κB сигнального пути, что в итоге приводит к секреции различных цитокинов и костимуляторных молекул, которые вовлечены, в том числе, и в процессы адаптивного иммунитета (Amarante-Mendes G.P., et al., 2018). У человека известно 23 типа NOD-подобных рецепторов. Они локализованы преимущественно в цитоплазме и взаимодействуют с консервативными бактериальными компонентами или целыми патогенами, которые попадают в клетку с помощью фагоцитоза либо в результате нарушения целостности мембраны (Mahla R.S., et al., 2013). RIG-подобные рецепторы участвуют во внутриклеточном распознавании вирусов (Mahla R.S., et al., 2013; Devarkar S.C., et al., 2018).

Помимо распознавания ПАМП, клетки врождённого иммунитета так же реагируют и на ряд эндогенных молекул (DAMP - damage-associated molecular pattern), ассоциированных с повреждением клеток и тканей (Yatim N., et al., 2017)

Одним из вариантов борьбы с патогенами является синтез иммунокомпетентными клетками растворимых (гуморальных) молекул, распознающих общие образы патогенности. К таким молекулам относятся некоторые молекулы системы комплимента, маннозосвязывающий лектин, С-реактивный белок, лизоцим и др. (Noris M., Remuzzi G., 2013; Serna M. et al., 2016; Johnston R.B., 2017; Van Kempen G., et al., 2017). Связывания таких молекул с патогеном может приводить к следующим результатам: во-первых – непосредственная гибель патогена посредством разрушения компонентов бактериальной клеточной стенки и нарушения целостности

плазматической мембраны; во-вторых – усиление фагоцитоза опсонизированных микроорганизмов. Фагоцитоз – это процесс поглощения клетками относительно больших частиц ( $\geq 0,5$  мкм) микроорганизмов, остатков клеток и клеточного мусора (Gordon S., 2016). Во время фагоцитоза клетка поглощает частицы вместе с плазматической мембраной с последующим формированием фагосомы, заполненной протеолитическими ферментами (Dalia A.V., Weiser J.N., 2011). В результате фагоцитоза происходит элиминация патогенов, апоптотических клеток и тканевого мусора, что является необходимым условием для формирования нормального тканевого гомеостаза и запуска процессов репарации. На клеточной поверхности фагоцитов находятся эндоцитозные ПРР. Они участвуют в процессах связывания с ПАМП, способствуя поглощению патогена с последующей его доставкой в лизосому. По окончании процессов разрушения, наступает фаза процессинга патогенных белков, затем полученные пептиды презентуются в комплексе с молекулами главного комплекса гистосовместимости (МНС) на поверхности антиген презентующих клеток (АПК). К ПРР, вовлеченным в фагоцитоз, относится, в частности, маннозный рецептор (Van Kempen G., et al., 2017).

В целом, распознавание ПАМП мембрано-ассоциированными и растворимыми ПРР может приводить к следующим результатам:

- прямой лизис патогена
- опсонизация с последующим фагоцитозом
- прямой фагоцитоз посредством связанных с клеткой ПРР
- усиление функциональной активности фагоцитарных клеток
- синтез противомикробных белков
- синтез цитокинов и хемокинов
- дифференцировка и активация иммунорегуляторных и эффекторных клеток

Реализация механизмов врождённого иммунитета зависит от деятельности многих типов клеток. Однако ключевую роль играют клетки миелоидного происхождения. Благодаря их мобилизации из кровотока и экстренной реактивности в условиях воспаления, а также благодаря постоянной активности резидентных клеток на периферии, обеспечивается врожденная иммунологическая защита организма (Черешнев А.А., 2001). Одновременно, АПК (дендритные клетки (ДК) и Мф) выполняют другую важную роль – создают необходимые условия для запуска

адаптивного иммунитета в случае, если врожденный иммунитет не справится с патогеном (Ярилин А.А., 2010).

Макрофагальные клетки, представлены во всех органах и тканях, циркулирующая форма этих клеток называется моноцитом, а резидентная – макрофагом. В отличие от короткоживущих гранулоцитов, Мф – это относительно долгоживущие клетки, они сами вовлекаются в фагоцитоз и презентацию антигенов Т-лимфоцитам, а также способны дифференцироваться в ДК, которые незаменимы при запуске первичных иммунных ответов (Pinheiro C. S. et al., 2017).

Мф — это неоднородная группа клеток, которая вариативна по поверхностным маркерам и по своей функциональной активности. Существует несколько классификаций Мц/Мф. Иммунофенотипическая классификация основана на различиях в уровне экспрессии молекул CD14 и CD16 на поверхности клеток. В рамках этой классификации выделяют три большие группы: классические Мц/Мф (CD14<sub>high</sub>CD16<sup>-</sup>), переходные (CD14<sub>high</sub>CD16<sub>low</sub>) и не классические (CD14<sub>low</sub>CD16<sub>high</sub>) (Ziegler-Heitbrock L., et al., 2010; Haller D., et al., 2002; Cros J., et al., 2010; Ingersoll M.A., et al., 2011; Yang J., et al., 2014; Ziegler-Heitbrock L., 2015). В некоторых случаях переходные и не классические Мц/Мф объединяют в группу (CD14<sub>low</sub>CD16<sub>low</sub>) (Ziegler-Heitbrock L., et al., 2010). Между этими группами существуют функциональные отличия. Классические Мц/Мф (CD14<sub>high</sub>CD16<sup>-</sup>) обладают выраженной фагоцитарной активностью (Jakubzick C.V., et al., 2017), тогда как неклассические Мц/Мф обладают провоспалительными свойствами (Cros J., et al., 2010). Среди Мц/Мф выделяют также субпопуляции по экспрессии FcγR1 (CD64). Это CD64<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> клетки, сочетающие в себе как свойства Мц/Мф, так и ДК, и CD64<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup> клетки, обладающие высоким уровнем экспрессии молекулы МНС II и выраженной антиген презентующей функцией (Weber C., et al., 2016; Kapellos T.S., et al., 2019).

Согласно другой классификации, выделяют резидентные и воспалительные Мф (Ziegler-Heitbrock L., et al., 2010). Резидентные Мф – более дифференцированные клетки, которые заметно отличаются в зависимости от тканевой локализации. Существует несколько гипотез касательно их происхождения. По одной из них, это клетки развиваются параллельно с развитием тканей, начиная с этапа эмбриогенеза. По другой, это спонтанно мигрирующие в ткани из кровеносного русла Мц/Мф, приобретающие специфический фенотип под действием тканевого микроокружения.

Наиболее вероятен третий объединённый вариант, согласно которому основу резидентных клеток составляют Мц/Мф, развивавшиеся параллельно с развитием ткани, но регулярно пополняющиеся за счет спонтанной миграции клеток из кровеносного русла. Основной функцией резидентных Мф является поддержание тканевого гомеостаза и элиминация старых и апоптотических клеток (Ярилин А.А., 2010). Группа воспалительных Мф формируется в результате миграции Мц из кровеносного русла в сторону очага воспаления, где они приобретают характерные свойства под действием хемокинов и других молекул межклеточной коммуникации. Для этих клеток характерна высокая фагоцитарная активность, а также повышенный синтез различных провоспалительных цитокинов (IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-23, IL-27, IL-6, IL-12) и активных форм кислорода. В тоже время, при определенных условиях эти клетки могут являться продуцентами иммуносупрессорных цитокинов, таких как TGF- $\beta$  и IL-10 (Симбирцев А.С., 2004).

Одной из наиболее широко используемых является классификация, основанная на особенностях функциональной активации макрофагальных клеток. Согласно этой классификации, выделяют непрерывный спектр типов Мц/Мф, крайними элементами которого являются классические и альтернативно активированные Мф (Wynn T.A., Vannella K.M., 2016). Классическую активацию Мф запускают IFN- $\gamma$  и белки семейства TNF (CD40L), а также некоторые TLR-лиганды, и, в частности, ЛПС. Он запускает MyD88-сигналинг, что приводит к продукции TNF. Помимо MyD88-сигналинга ЛПС может посредством TIR-домен содержащих адаптерных белков активировать TRIF-зависимый сигнальный каскад и по средствам IRF3 активировать продукцию IFN- $\beta$  (Irragunta S.K., et al., 2018). Этот эндогенный IFN- $\beta$  может участвовать в аутокринной классической активации Мф и заменять, таким образом, IFN- $\gamma$ . Классически активированные Мф так же известны как M1-Мф. Они характеризуются высокой провоспалительной активностью и повышенным уровнем продукции провоспалительных цитокинов (TNF- $\alpha$ , IL-1 и др.), iNOS и ROS (Murray P.J., Wynn T.A., 2011; Wynn T.A., Vannella K.M., 2016). Некоторые провоспалительные цитокины, в частности IL-1, IL-6 и IL-23 способствуют увеличению численности популяции Th17-клеток (Kuwabara T., et al., 2017), которые могут способствовать развитию воспалительных аутоиммунных патологий. Альтернативная активация Мц/Мф развивается под влиянием глюкокортикоидов и противовоспалительных цитокинов (IL-

4 и IL-13), продуцируемых базофилами, тучными клетками и Т-хелперами 2 типа (Muraille E., et al., 2014). IL-4 способствует быстрому превращению резидентных Мф в клетки, запрограммированные на стимуляцию аргиназной активности, способствующей заживлению ран. Они превращают аргинин в орнитин – предшественник полиаминов и коллагена, и, тем самым, способствуют формированию внеклеточного матрикса (Rivera A. et al., 2016). Альтернативно активированные Мф обозначают как М2-Мф или репаративные Мф. Такие Мф участвуют в процессах противогельминтной защиты и последующих регенеративных процессах ремоделирования тканей. Избыточная альтернативная активация Мц/Мф может способствовать развитию патологических процессов, в частности при хроническом шистосомозе формируется фиброз тканей, за счет неконтролируемой активности репаративных Мф (Rodriguez P.C., et al., 2017). М2-Мф характеризуются повышенным уровнем продукции противовоспалительных цитокинов, таких как TRF-β и IL-10 (Seledtsov V.I., Seledtsova G.V., 2012).

Молекула TLR-4 функционально связана с молекулой CD14, которая является одним из основных маркеров Мц/Мф. CD14 способствует связыванию ЛПС и активации TLR-4-опосредуемого сигнального пути. В тоже время на Мц/Мф широко представлены Fc-рецепторы. Это рецепторы способные распознавать и связываться с Fc-фрагментами иммуноглобулинов. Они способствуют фагоцитозу патогенов опсонизированных антителами, а также вносят свой вклад в активацию Мц/Мф. Мц способны экспрессировать полный набор Fcγ-рецепторов — FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) и FcγRIII (CD16). Как уже было замечено выше, ведущую роль в регуляции функциональной активности Мф играют рецепторы цитокинов. В частности, молекулы CD119 (IFNγRI и IFNγRII) и CD124 (IL-4R) по средствам взаимодействия со своими лигандами направляют развитие функциональной поляризации макрофагальных клеток.

### **1.1.2. Клеточное и гуморальное звенья адаптивной системы иммунитета и их взаимодействие с системой врождённого иммунитета**

Адаптивная система иммунитета отвечает за реакции, основанные на специфическом распознавании патогенов. Этот процесс опосредуется лимфоцитами, которые разделяются на две большие группы: Т-лимфоциты (Т-клетки) и В-лимфоциты (В-клетки). Т- и В-клетки обладают двумя основными характеристиками

приобретенного иммунного ответа – обе группы обладают высокой антигенной специфичностью и формируют иммунную память. Благодаря формированию иммунной памяти адаптивный иммунный ответ при повторном контакте с антигеном является более выраженным и эффективным. Т-клетки формируются в тимусе и выполняют следующие функции: обеспечивают помощь другим иммунокомпетентным клеткам в формировании иммунного ответа (Т-хелперы, Th-клетки), ограничивают чрезмерные или нежелательные иммунные реакции (Т-регуляторные клетки, T-reg клетки) и уничтожают клетки, инфицированные патогенами (цитотоксические Т-клетки, CTL). В-клетки формируются в основном в костном мозге, после контакта с антигенами дифференцируются в плазматические клетки, продуцирующие антитела.

Ключевым моментом запуска адаптивного иммунитета является формирование иммунного синапса между АПК и Т-клеткой. Основными АПК, запускающими первичный иммунный ответ, являются ДК. Выделяют две основные группы ДК – миелоидные и плазмоцитоидные (Förster R., et al., 2012). CD14<sup>+</sup> ДК продуцируют ряд цитокинов, способных напрямую взаимодействовать с В-клетками. К ним относятся IL-6, IL-12, IL-10 и TGF- $\beta$  (Alcántara-Hernández M., et al., 2017; Blazar B.R., et al., 2018; Bouteau A., et al., 2019). После контакта с антигеном ДК посредством CCR7 зависимой миграции отправляются в Т-зависимую зону лимфатических узлов, где они контактируют с наивными Т-лимфоцитами (Kranz L. M. et al., 2016; Aschenbrenner D., et al., 2018). Наряду с презентацией антигена в контексте МНС I и II класса, ДК также обеспечивают мембранную и цитокиновую ко-стимуляцию Т-клеток. Под наивными Т-клетками подразумеваются зрелые циркулирующие Т-лимфоциты, не контактировавшие ранее со своим специфическим антигеном. После контакта такой клетки с соответствующим антигенным пептидом, представленным в комплексе с молекулой МНС, инициируется ее пролиферация и дифференцировка (Koch U., Radtke F., 2011). Это процесс называется клональной экспансией. В результате этого процесса формируются эффекторные Т-клетки, нацеленные на элиминацию патогена, а также Т-клетки памяти, обеспечивающие ускоренную и более эффективную защиту в случае повторного контакта организма с патогеном (Ярилин А.А., 2010; Sun J.C., et al., 2014; Rangarajan S., Mariuzza R.A., 2014). Т-клетки экспрессируют корецепторы CD4 или CD8, повышающие аффинность взаимодействия TCR с молекулами МНС II и I класса, соответственно. Молекулы CD4 экспрессируются на Т-хелперах, тогда как CD8 – на

цитотоксических лимфоцитах. Дифференцировка наивных Т-лимфоцитов приводит к формированию разных по своему функциональному предназначению Т-клеточных субпопуляций. Помимо наивных Т-клеток с фенотипом CD45RA<sup>+</sup> CD197<sup>+</sup> выделяют CD45RA<sup>-</sup> CD197<sup>+</sup> Т-клетки центральной иммунной памяти, CD45RA<sup>-</sup> CD197<sup>-</sup> Т-клетки эффекторной иммунной памяти и CD45RA<sup>+</sup> CD197<sup>-</sup> терминально дифференцированные Т-клеточные эффекторы. Наивные Т-лимфоциты – это клетки прошедшие антигеннезависимую дифференцировку в тимусе, но еще не мигрировавшие во вторичные лимфоидные органы. Они являются активными продуцентами IL-2. Т-клетки центральной иммунной памяти в отличие от наивных клеток прошли антигензависимую дифференцировку во вторичных лимфоидных органах. Однако эти клетки сохраняют на своей поверхности молекулу CD197 (CCR7) и, соответственно, способность мигрировать в лимфатические узлы. Эти клетки высокочувствительны к антигенным и костимулирующим воздействиям и в активированном состоянии продуцируют IL-2 (Nielsen B.R. et al, 2017). Т-клетки эффекторной иммунной памяти – основные клетки продуценты IFN- $\gamma$  и IL-4 (Tomra A., et al., 2018). Эти клетки активно мигрируют в очаг воспаления и характеризуются высоким уровнем экспрессии рецепторов хемокинов CCR5, CCR6, CXCR3 и молекул адгезии CD11a, CD11c, CD18, CD29. Т-клетки эффекторной иммунной памяти живут значительно меньше, чем Т-клетки центральной иммунной памяти (Tian Y., et al., 2017; Tomra A., et al., 2018). Терминально дифференцированные Т-клеточные эффекторы – Т-клетки, в основном, выполняющие эффекторные функции. Их функциональная активность резко повышается под влиянием цитокинов (IL-6, IL-8, IL-12, IL-18), продуцируемых Мц/Мф (Larkin B., et al., 2017).

## **1.2. Роль гранулоцитарного колониестимулирующего фактора в организме**

Гемопоз – процесс образования, дифференцировки и созревания клеток крови. Важные особенности этого процесса: клеточная дифференцировка и развитие зрелых высокоспециализированных клеток из клеток предшественников, регулируются специализированными цитокинами – гемопозтинами. Основными гемопозтинами являются: EPO, G-CSF, GM-CSF, M-CSF и др. G-CSF, GM-CSF и M-CSF являются факторами роста миелоидных клеток. Они стимулируют пролиферацию, дифференцировку, созревание и выживание гранулоцитов и Мф.

Колонiestимулирующие факторы действует через специфические рецепторы. Рецептор G-CSF (G-CSFR) является членом семейства рецепторов цитокинов 1 типа. Особенностью рецептора GM-CSF является наличие уникальной  $\alpha$ -цепи и общей  $\beta$ -цепи, через которую происходит сигналинг. Рецептор c-Mpl, специфическим лигандом которого является тромбопоэтин (TPO), контролирует формирование мегакариоцитов. В отличие от всех других клеток крови, тромбоциты формируются за счет фрагментации зрелых мегакариоцитов. Важно отметить, что TPO, не влияет на сформированные тромбоциты, поэтому его действия медленнее, действия G-CSF. G-CSF, GM-CSF, TPO и EPO активно используются в медицине для коррекции гемопоэза и иммунопоэза. Однако существует озабоченность из-за потенциальной нецелевой стимуляции злокачественных образований при использовании гемопоэтинов. Остается много вопросов, касающихся их эффектов на адаптивный иммуногенез, в том числе и противоопухолевый (Metcalf D., 2010; Mondello P., et al., 2017). Все это приводит к сужению терапевтического окна для применения гемопоэтических препаратов.

### **1.2.1. Структурные и функциональные характеристики гранулоцитарного колониестимулирующего фактора и его рецептора**

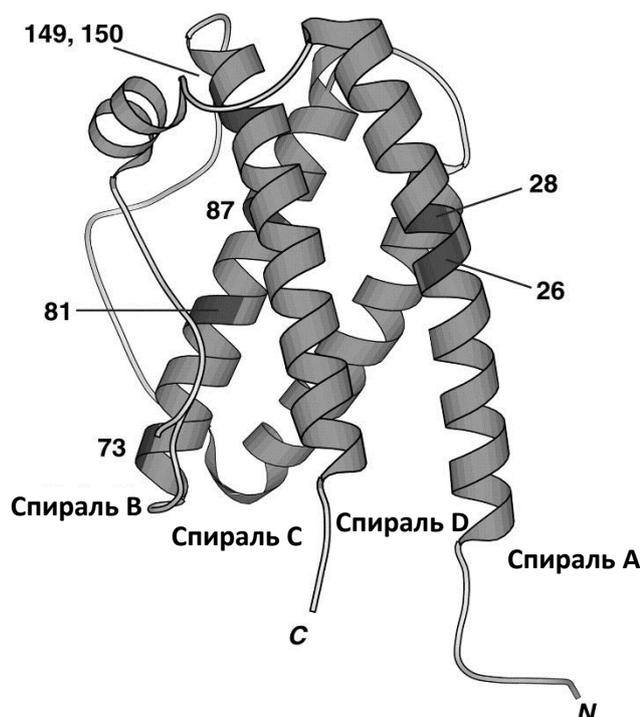
Одна из биологических функций G-CSF – индукция роста колоний нейтрофильных гранулоцитов. Он также способен оказывать влияние на функциональную активность зрелых нейтрофилов и, в частности, повышать уровень продукции хемотактического пептида N-формил-метионил-лейцил-фенилаланин (fMLP) (Boettcher S., Manz M.G., 2017; Liska M.G., dela Peña I., 2017). Дефицит эндогенного G-CSF приводит к развитию хронической нейтропении и критических нарушениям в механизмах мобилизации нейтрофилов (Robinson P.D., et al., 2016; Wang X.J., et al., 2017; Mouchemore K.A., et al., 2018). В настоящее время в качестве медицинского препарата используется рекомбинантная форма G-CSF. Показано, что естественная и рекомбинантная формы обладают одинаковой биологической, активностью (Kramer A., 2017). У человека G-CSF кодируется в локусе q11.2-q12 17 хромосомы в виде 204-аминокислотной последовательности, которая включает в себя сигнальную последовательность и зрелый 174-аминокислотный белок. Для G-CSF были выявлены ортологи у млекопитающих птиц и рыб (Jones S.A., Jenkins B.J., 2018). Анализ сходства

аминокислотных последовательностей в этих белках показал достаточно высокий уровень подобия между человеческим G-CSF и его животными аналогами: в частности, сходство с G-CSF шимпанзе - 99%, а с G-CSF опоссума - 59%. Меньшее сходство человеческий G-CSF имеет с куриным G-CSF (около 36%) и G-CSF рыб (около 15%). При сравнении сходства G-CSF с другими спиральными цитокинами, наиболее близкой оказалась p19 субъединица интерлейкина-23 (IL-23) – примерно 26% сходства (Wang T., et al., 2018; Leonard W.J., et al., 2019). Это может указывать на общее эволюционное происхождение этих цитокинов.

Методами ядерного магнитного резонанса (ЯМР) и кристаллографии была детально охарактеризована структура рекомбинантного G-CSF (Hausberger A., et al., 2016; Japelj B., et al., 2016; Brinson R.G., et al., 2017). Она представляет собой четыре  $\alpha$ -спирали: спираль А состоит из 29 аминокислот (остатки 11-39), спираль В состоит из 21 аминокислоты (остатки 71-91), спираль С состоит из 24 аминокислот (остатки 100-123), и спираль D состоит из 30 аминокислот (остатки 143-172). Область связывания расположена перед спиралью D и содержит 4-остатка  $3_{10}$ -спирали (остатки 44-47), и 6-остатков  $\alpha$ -спирали (остатки 48-53). Обе  $3_{10}$ - и  $\alpha$ -спирали – правозакрученные; однако в  $3_{10}$ -спирали на один оборот приходится три аминокислотных остатка, в то время как в  $\alpha$ -спирали ~4 (3,6) остатка (**рисунок 1**).

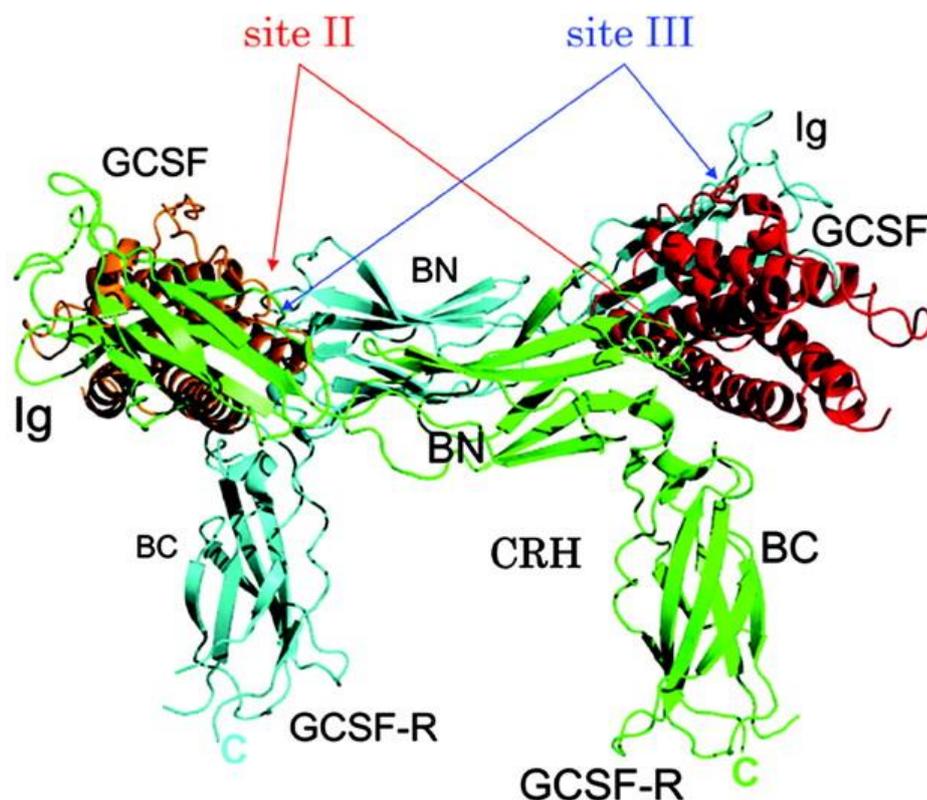
Структурные особенности G-CSF, позволяют отнести его к подсемейству цитокинов с длинной цепью. G-CSF имеет пять цистеиновых остатков. Четыре из них образуют дисульфидные мостики (Cys36-Cys42 и Cys64-Cys74), пятый цистеин находится в положении 17 и является свободным, но из-за труднодоступного положения, реакционная способность этого остатка ограничена (Alebouyeh M., et al., 2016). G-CSF не обладает N-связанными сайтами гликозилирования; однако, в его составе есть O-связанный гликан на остатке треонина-133 (Panopoulos A.D., Watowich S.S., 2008; Maity N., et al., 2016). Для биологической активности гемопоэтина не требуется гликозилирование (McDermott D.H., Murphy P.M., 2019). У человека G-CSF может существовать в 2-х формах: белок типа А, состоящий из 177 аминокислотных остатков и белок типа В, более активный и представляющий собой основную форму, состоящую из 174 остатков. Молекулярная масса G-CSF составляет 19,6 кД (Chopra M., et al., 2009). Белок типа А – минорный продукт альтернативного сплайсинга мРНК и отличается содержанием вставки из 3 аминокислотных остатков (Val-Ser-Glu) между

Leu35 и (Toghraie F.S., et al., 2019). Рекомбинантный G-CSF человека, полученный из *E.coli*, имеет ту же первичную структуру, что и человеческий типа В, но содержит дополнительный остаток метионина на N-конце и не гликозилирован.



**Рисунок 1.** Трехмерная структура G-CSF. Спирали A, B, C и D помечены в порядке от N - конца. Расположение спиральных глициновых остатков отмечено темно-серым цветом и указаны номера их остатков. (Адаптировано из Bishop B., et al., 2001)

В нескольких исследованиях анализа взаимодействия G-CSF с рецептором использовались две кристаллографические структуры. Обе структуры содержат комплекс 2:2 G-CSF:G-CSFR и два сайта связывания, но отличаются по расположению этих сайтов. Первая содержит G-CSF и CHR (домены D2 и D3) от G-CSFR мыши (Pоров А., et al., 2019). Вторая включает человеческий G-CSF и иммуноглобулиновый (Ig) домен (D1) и CHR (D2 и D3) от человеческого G-CSFR (Tamada T., et al., 2006). На основе этих моделей продемонстрировано принципиальное значение 2-го и 3-го сайтов связывания, а также показано перекрестное связывание G-CSF со своим гомодимерным рецептором (**рисунок 2**).



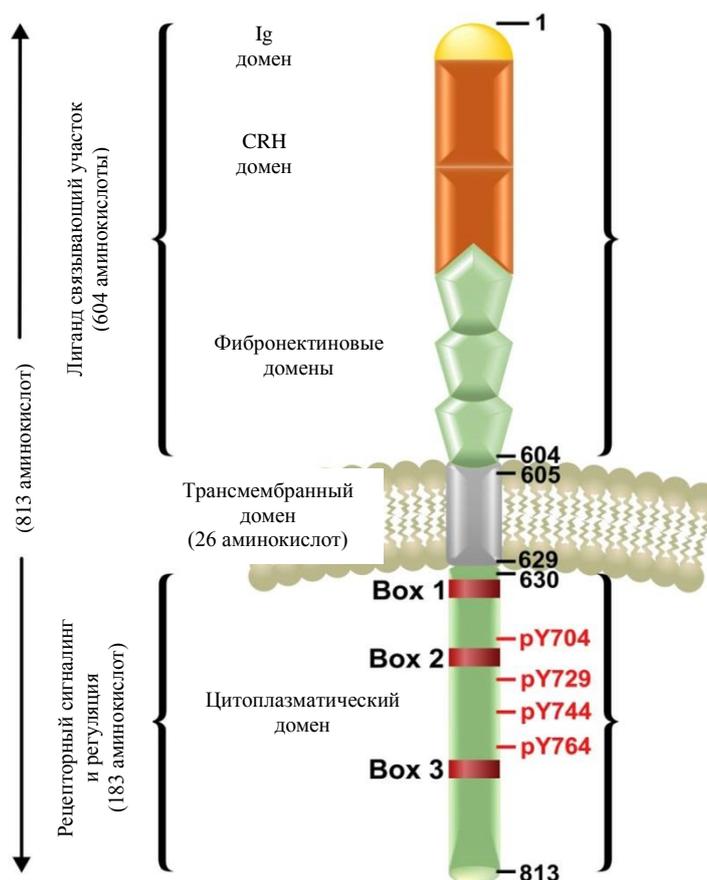
**Рисунок 2.** Общая структура 2:2 тетрамерного комплекса hGCSF и hGCSF-R. Ig – Ig домен, CRH – CRH домен). Site II, site III – сайты связывания. Молекулы GCSF окрашены в красный и оранжевый цвета, а молекулы GCSF-R окрашены в зеленый и голубой. (Адаптировано из Tamada T., et al., 2006)

Такое связывание показано и у других цитокинов из этой группы, в частности, это касается комплекса вирусного-IL-6/gp130. Вирусный IL-6 (vIL-6) это гомолог IL-6, ассоциированный с саркомой Капоши, и связанный с вирусом герпеса (HHV8) (Schillinger O., et al., 2017; Rose-John S., et al., 2018). Биохимические исследования показали, что vIL-6 формирует 2:2 комплекс с gp130, и это стехиометрически показано на кристаллической структуре vIL-6 с gp130 (Arvedson T.L., Giffin M.J., 2012; Espígol-Frigolé G., et al., 2016). Сравнение структуры комплексов vIL-6/gp130 и G-CSF/G-CSFR показывает ряд общих черт. В частности, связывание через сайты 2 и 3; сходные конформации, общий размер и симметрия двух комплексов.

На основании сходства gp130 и G-CSFR для моделирования G-CSF/G-CSFR сигнального комплекса, возможно использовать структуру gp130. Ряд gp130 содержащих комплексов охарактеризованы с помощью электронной микроскопии (Ferraio R., Lupardus P.J., 2017; Lokau J., Garbers C., 2019) и продемонстрирована C-образная структура комплексов, способствующая инициации сигналинга через C-терминальную, Jak-ассоциированную область gp130. Хотя молекулы Jak содержат около

1100 остатков в четырех глобулярных доменах предполагается, что расстояние 30-65 Å между С-концевыми доменами будет достаточно для трансактивации двух Jak молекул. (Xu Y., et al., 2010). Такая форма gp130 отчасти обусловлена резким изгибом между доменами D4 и D5. Эти домены проходят под углом ~80° по отношению друг к другу и взаимодействуют остатками Trp-311, Lys-330 и Trp-448 с аминокислотными остатками на сопряженной области. Все ключевые элементы, ответственные за это взаимодействие сохраняются в D4 и D5 G-CSFR, вероятно, что G-CSFR будет ориентирован аналогично. Конформационные подобия позволяют построить модель комплекса G-CSF/G-CSFR, с пресечением областей D5 и D6, что приводит к такому положению внеклеточных и внутриклеточных доменов, при котором возможна инициация сигнальной трансдукции.

G-CSFR относится к семейству цитокиновых рецепторов I-го типа. Это единственный трансмембранный белок, в состоянии покоя не обладающий собственной киназной активностью, и состоящий из внеклеточного гомологичного цитокин-рецепторного (CRH) домена и общих внутриклеточных элементов Box 1 и Box 2. CRH домен содержит четыре консервативных остатка цистеина, и Trp-Ser-X-Trp-Ser мотив (WSXWS, где X представляет собой неконсервативную аминокислоту). Рецептор также содержит иммуноглобулин (Ig)-подобный и три фибронектин III (FNIII)-подобных домена во внеклеточной части, и участок Box 3, содержащий цитоплазматическую консервативную последовательность (Liang W., Ferrara N., 2016; Keightley M.C., Lieschke G.J., 2018) (**рисунок 3**). С помощью рентгеновской кристаллографии лиганд-рецепторного комплекса продемонстрировано, что внеклеточные остатки цистеина вместе с WSXWS областью, играют важную роль в поддержании 3-х мерной структуры CRH-домена за счет формирования внутримолекулярных дисульфидных связей, кроме того, эти мотивы вместе с Ig-подобным доменом опосредуют межмолекулярные взаимодействия с G-CSF (Buettner F.F., et al., 2013).



**Рисунок 3.** Схема G-CSFR с изображением основных доменов и участков фосфорилирования (pY704, pY729, pY744 и pY764). (Адаптировано из Dwivedi P., Greis K.D. 2017)

G-CSFR при связывании лиганда образует гомодимеры аналогично рецептору эритропоэтина (EPO) и гормона роста (Li Q., Kang C.B., 2017; Bergan-Roller H.E., Sheridan M.A., 2018), однако, структура G-CSFR больше напоминает структуру gp130, который образует гетеродимерные комплексы с лиганд-специфичными  $\alpha$ -субъединицами, и выполняет роль сигнальной цепи для рецепторов интерлейкина-6 (IL-6), фактора ингибирования лейкемии (LIF), и онкостатина-M (OSM) (Liang W., Ferrara N., 2016; Morris R., et al., 2018). По составу аминокислотных последовательностей G-CSFR и gp130, гомологичны на 46,3%, gp130 так же содержит Ig-подобный домен, FNIII-подобные домены, и Box 3 (Otani K., et al., 2018). Существует вариативность молекулярной массы G-CSFR в пределах от 100 000 до 150 000 кДа, обусловленная посттрансляционной модификацией путем гликозилирования (Barreda D.R., et al., 2004; Bakherad H., et al., 2017). Высоко аффинное связывание лиганда ( $K_d \approx 700$  pM), инициирует и/или стабилизирует гомодимеризацию G-CSFR за счет взаимодействия между Ig-подобным доменом первой субъединицы и CRH доменом второй субъединицы

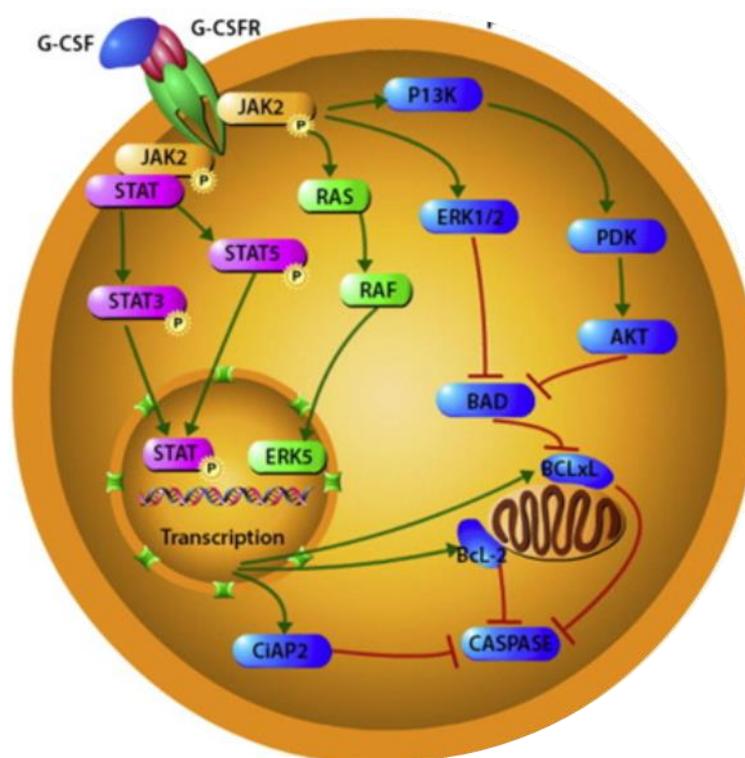
рецептора, с образованием 2:2 G-CSF:G-CSFR кроссоверного комплекса (Tamada T., et al., 2006; Liang W., Ferrara N., 2016). Подобно другим рецепторам цитокинов I типа, 3-мерная структура цитоплазматической области G-CSFR остается неясной.

Экспрессия мРНК и белков G-CSFR была обнаружена как в гемопоэтических, так и в негемопоэтических клетках. Ключевыми типами клеток, экспрессирующими не только зрелый G-CSFR, но и его мРНК являются гемопоэтические стволовые клетки (ГСК), общие миелоидные клетки предшественники, предшественники гранулоцитов/макрофагов, и клетки гранулоцитарного происхождения. При этом экспрессия G-CSFR возрастает в процессе гранулоцитарного созревания (Campbell I.K., et al., 2016; Mojtabehi M., et al., 2016; Notta F., et al., 2016). Анализ G-CSFR-дефицитных мышей, показал, что G-CSFR-сигналинг опосредует пролиферацию, дифференцировку, выживание, и мобилизацию как нейтрофилов, так и гранулоцитарных клеток-предшественников (Pazhakh V., et al., 2018). Вместе с тем, показано, что G-CSFR- и G-CSF-дефицитные мыши обладают остаточным производством нейтрофилов. Это говорит о наличии G-CSF-независимых механизмов генерации нейтрофилов в гомеостатических условиях, либо на наличие компенсаторной функции в регуляции гранулопоэза в отсутствие G-CSF сигналинга (Boettcher S., Manz M.G., 2017; Pazhakh V., et al., 2018). Экспрессия G-CSFR была обнаружена в Мц и лимфоцитах. Предполагается, что G-CSF ослабляет секрецию провоспалительных цитокинов иммунокомпетентными клетками (Bunse C.E., et al., 2016; Campbell I.K., et al., 2016; Hollmén M., et al., 2016), повышает агрегацию тромбоцитов в ответ на стимуляцию АДФ (Geçtura K., et al., 2019), усиливает продукцию фактора стромальных клеток (SDF-1), (CXCL12) остеобластами (Hatfield K.J., et al., 2017; Kohlstedt K., et al., 2018). В ряде работ показана продукция белка G-CSFR лейкозными клетками при острой миелоидной лейкемии (AML) (Nguyen-Jackson H.T., et al., 2012) и В-клеточном хроническом лимфолейкозе (B-CLL) (Touw I.P., van de Geijn G.J., 2007). Были сделаны попытки использовать G-CSF для активации дифференцировки лейкозных клеток; однако онкогенные мутации, вызывающие задержку дифференцировки, блокировали дифференцирующее действие G-CSF. С другой стороны, продемонстрирована возможность использования G-CSF для стимуляции вступления лейкозных стволовых клеток в клеточный цикл, с повышением их восприимчивости к цитотоксической терапии (например, химиотерапии) (Trumpp A., et al., 2010). Экспрессия мРНК, кодирующей G-CSFR, была обнаружена в клетках в

тканях плаценты и плода (Liang W., Ferrara N., 2016; Bakherad H., et al., 2017; Würfel W., 2019), и в клетках ЦНС, где G-CSFR сигналинг возможно содействует нейрогенезу (Calipari E.S., et al., 2018). Кардиомиоциты отвечают на G-CSF повышенной выживаемостью (Yamada Y., et al., 2019), а в эндотелиальных клетках происходит индукция пролиферации и миграции (Rüger B.M., et al., 2018).

Активация G-CSFR ассоциируется с фосфорилированием Janus тирозинкиназы, конститутивно связанной с внутриклеточным мембранно-проксимальным участком рецептора. Связывание с лигандом приводит к сближению субъединиц рецептора, в результате происходит трансфосфорилирование Jak-ассоциированных белков. Взаимодействие с G-CSF обычно активизирует Jak-1 киназу, но также может активировать и других членов Jak-семейства, например, Jak-2 и Тук-2 (Chang N., et al., 2017; D'Amario D., et al., 2018; Росса S., et al., 2018). Как показывают данные, полученные с использованием Jak-дефицитных клеточных линий, потеря единичного Jak-белка не исключает G-CSF-опосредованную активацию других Jak белков. В то же время, потеря Jak-1 приводит к снижению активации последующих сигнальных молекул каскада, что предполагает его лимитирующую роль в активационном процессе. Однако, данные, полученные от Jak-1- или Jak-2-дефицитных мышей, показывают, что G-CSFR-опосредованная активность в обоих случаях менялась не значительно, что свидетельствует об избыточной роли Jak-киназ в передаче сигналов от G-CSFR (Majoros A., et al., 2017; Shin D.S., et al., 2017). Функции внутриклеточного домена G-CSFR были выяснены благодаря использованию мутантных клеток с делециями в рецепторе. Мембранно-проксимальные 55-57 аминокислотные остатки в цитоплазматической области G-CSFR важны для стимулирования пролиферации клеток, в то же время аминокислоты в позициях 57-96 необходимы для максимальной пролиферации и экспрессии предшественников ростовых регуляторных генов (Qiu Y., et al., 2017; Zhang H., et al., 2018; Lance A., et al., 2019). Домены Box 1 и Box 2 мембрана-проксимальной области необходимы для G-CSF опосредованной пролиферации независимо от тирозиновых остатков G-CSFR (Hu N., et al., 2015). Так же известно, что в состав Box 1 входит богатая пролином последовательность необходимая для взаимодействия с Jak (Ferraio R., et al., 2016; Rohrabough S., et al., 2017). Предполагается, что мембранная дистальная часть G-CSFR, содержащая приблизительно 100 аминокислотных остатков, опосредует ингибирующее действие на рост миелоидных клеток и контролирует гены,

кодирующие поверхностные маркеры и молекулы (миелопероксидаза и эластаза), которые опосредуют эффекторные функции нейтрофилов. Во внутриклеточной части человеческого G-CSFR расположены четыре остатка тирозина (Y704, Y729, Y744, Y764) аналогичные остаткам (Y703, Y728, Y743, Y763) в рецепторе мыши, которые фосфорилируются Jak-белками, что ведет к рекрутированию внутриклеточных эффекторных молекул за счет взаимодействия фосфотирозин-связывающих доменов сигнальных белков с фосфорилированными тирозинами рецептора. Jak активация стимулирует рекрутирование белков сигнальной трансдукции и активации транскрипции (STAT) (Garcia-Diaz A. et al., 2017; Kurz J., et al., 2019) (**Рисунок 4**).



**Рисунок 4.** Схема G-CSFR опосредованного внутриклеточного сигналинга. G-CSF связывается с G-CSFR и инициирует сигнальный каскад путем фосфорилирования/активации Janus тирозинкиназы 2 (JAK-2). Затем активированная JAK-2 может запускать несколько сигнальных путей (здесь в сокращенной форме представлены 3 из них). Каждый путь стимулирует клеточную пролиферацию, дифференцировку или ингибирует апоптоз, (выделены розовым, зеленым и синим цветами, соответственно). Зеленые стрелки – стимуляция, а красные – ингибирование. (STAT – сигнальный трансдуктор и активатор транскрипции; STAT5 – транскрипционный фактор 5B; STAT3 – транскрипционный фактор 3; P – указывает на необходимость фосфорилирования; RAS – сигнальный трансдуктор; RAF – внеклеточная сигнальная киназа-5; P13K – фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат-3-киназа; BAD – Bcl-2 ассоциированный промотор смерти; BCLxL – антиапоптотический трансмембранный митохондриальный белок; CASPASE (каспазы) – цистеин-аспарагиновые протеазы/цистеин-зависимые аспартат-направленные протеазы; PDK – пируватдегидрогеназная киназа; АКТ – протеинкиназа-B, серин/треонин-специфическая протеинкиназа; Bcl-2 – антиапоптотический

белок; СiAP2 – многофункциональный белок, который регулирует активность каспаз, апоптоз, модулирует воспалительный сигналинг, иммунный, митогенкиназный сигналинг и пролиферацию клеток, а также инвазию клеток и метастазирование. (Адаптировано из Singh V.K., et al., 2015).

STAT белки локализованы преимущественно в цитоплазме, после образования лиганд-рецепторного комплекса и Jak активации, они взаимодействуют с фосфотирозинами на G-CSFR через STAT SH2-домен, сближаясь с G-CSFR-Jak комплексом. Между STAT белками и G-CSFR-Jak комплексом образуется тесная связь, приводящая к Jak-зависимому фосфорилированию С-концевого тирозина в STAT белках. Это необходимо для освобождения STAT от рецептора и последующей STAT-димеризации. Более высокая аффинность STATSH2 доменов по сравнению с фосфотирозинами рецепторов цитокинов обеспечивает диссоциацию STAT белков от рецептора и способствует преимущественному их связыванию с другими близко расположенными тирозин-фосфорилированными членами STAT-семейства. Накапливающиеся в ядре гомо- или гетеро- димеризованные STAT белки регулируют цитокин-зависимую транскрипцию. В различных клеточных линиях G-CSFR-сигналинг стимулирует фосфорилирование STAT1, STAT3, STAT5. Активация STAT1 и STAT5 может происходить независимо от тирозинов рецептора через мембранно-проксимальный участок цитоплазматического домена. G-CSFR тирозин-зависимая активация STAT3 происходит через Y704 и Y744 остатки G-CSFR при низких дозах G-CSF, в то время как при пороговых дозах, активация STAT3 может протекать через тирозин-независимые механизмы (Szelaq M., et al., 2016; Yan Z., et al., 2018; Herrera S.C., Bach E.A., et al., 2019). Максимальная активация STAT3 происходит через остатки 96-183 внутриклеточного домена G-CSFR; но потеря 96 аминокислот из трансмембранного домена не является критичной, сохраняется Y704. STAT3-активацию в культурах миелоидных клеток, запускается нейтрофильная дифференцировка за счет индукции генов нейтрофильных маркеров и соответствующих морфологических изменений, связанных с их созреванием. Вместе с тем, STAT3 не влияет на экспрессию миелопероксидазы (Hillmer E.J., et al., 2016; Schwartz D.M., et al., 2017). Совокупность полученных данных подчеркивает важность STAT3 в качестве медиатора передачи сигналов G-CSFR.

Показано, что G-CSFR сигналинг стимулирует несколько членов митоген-активируемого протеинкиназного (MAPK) пути. Фосфорилирование ERK1/2 требует

мембранно-проксимального 57 аминокислотного цитоплазматического домена G-CSFR, что указывает на G-CSFR-Jak путь активации MAPK с последующей регуляцией клеточной пролиферации (Rohrbaugh S., et al., 2017). G-CSFR стимулирует p21Ras, GTPфазу, связанную с ERK1/2. Активация p21Ras ассоциирована с Y764 в G-CSFR и может влиять на пролиферацию. (Rossetti S., et al., 2017). Адаптерные белки SHP-2, Grb2 и Shc фосфорилируются при связывании с G-CSFR и могут опосредовать активацию p21Ras и ERK1/2. Grb2 может непосредственно взаимодействовать с Y764 в G-CSFR, а SHP-2 может быть ассоциирован с Y704. Для активации SHP-2 и Shc необходим Y764 остаток G-CSFR, который связывает их с Grb2, и через него обеспечивает p21Ras сигнализацию (Rossetti S., et al., 2017; Wright C. R., et al., 2017; Hibbs M.L., et al., 2018). SHP-2, Grb2 и Shc ранее описаны как факторы, связанные с клеточной пролиферацией и дифференцировкой. Весьма вероятно, они осуществляют трансдукцию сигнала через G-CSFR, участвуя в регуляции гранулопоэза. Таким образом, MAPK-путь, и, в частности, ERK1/2-путь, может быть по-разному активирован через G-CSFR. В культурах клеток активность Src-семейства киназ опосредуется 55 аминокислотным мембранно-проксимальным цитоплазматическим доменом G-CSFR и отрицательно регулируется C-терминальной 98 аминокислотной последовательностью (Hashemzaei M., et al., 2016). В то же время, Lyn стимулирует G-CSF-зависимую пролиферацию (Maxson J.E., et al., 2016), Hck – участвует в запуске дифференцировочных сигналов и регуляции функций зрелых гранулоцитов (Craig M., et al., 2016). Src-киназы могут активировать Akt серин/треонин киназы, необходимые для контроля Jak-независимых сигналов выживаемости клеток (Hashemzaei M., et al., 2016). Исследования *in vivo* показывают, что члены Src-семейства киназ могут функционировать как отрицательные регуляторы гранулопоэза, по средствам Lyn ингибирования производства миелоидных предшественников и Hck подавлением пролиферации предшественников гранулоцитов (Azcutia V., et al., 2018). С другой стороны, и Syk активация может происходить через объединение с Lyn или за счет прямого связывания с G-CSFR (Maxson J.E., et al., 2016). В целом роль Syk в гранулопоэзе остается не совсем ясной.

G-CSFR играет ключевую роль в регуляции как нормальных, так и патологических вариантов гранулоцитопоэза. Экспрессии G-CSFR на негемопоэтических клетках предполагает новые цели клинического применения G-CSF. Так, G-CSFR, экспрессированный в центральной нервной системе и в кардиомиоцитах,

опосредует посттравматический антиапоптотический сигналинг, что указывает на возможность использования G-CSF в восстановительной медицине. Исследования мутации в G-CSFR показывают, что для поддержания нормального гемопоза необходим точный контроль G-CSFR активации. Поэтому, понимание молекулярных аспектов передачи сигнала G-CSFR, его трансдукции и реализации важны для создания новых методов лечения заболеваний человека.

### **1.2.2. Роль гранулоцитарного колониестимулирующего фактора в регуляции иммунных процессов**

G-CSF играет центральную роль в развитии противoinфекционных ответов и обладает иммуномодулирующей и антибиотической функциями (Cruciani M., 2013). Его рецептор представлен на различных иммунокомпетентных клетках: гранулоцитах, моноцитах, Т- и В-лимфоцитах что подчеркивает его важность в процессах регуляции иммуногенеза. Как уже было замечено ранее, G-CSF способен модулировать воспалительные реакции у человека. При стимуляции ЛПС *ex vivo* клеток крови, полученных от здоровых доноров, принимавших G-CSF, показано снижение продукции лейкоцитами провоспалительных цитокинов TNF- $\alpha$ , GM-CSF и IFN- $\gamma$  (Bauhofer A., et al., 2006; Weise G., et al., 2017). Это прямо указывает на то, что G-CSF действует не только на нейтрофилы и их предшественники, но и влияет на функциональную активность Мц/Мф и лимфоцитов (Bauhofer A., et al., 2006; Hollmén M., et al., 2016).

Вопрос о влиянии G-CSF на Т-клетки остается слабоизученным. Рецептор G-CSF обнаружен в митоген активированных Т-клетках (Bunse C.E., et al., 2016), в нестимулированных Т-клетках обнаружена его мРНК (Xie Y., et al., 2017). В других исследованиях была показана экспрессия G-CSFR в субпопуляциях CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток, подвергшихся воздействию G-CSF *in vivo* или *in vitro* (Franzke A., et al., 2003). В литературе имеются данные о влиянии G-CSF на функциональную активность Т-лимфоцитов через модуляцию функциональных свойств Мц/Мф и ДК (Gutiérrez-Hoya A., et al., 2017; Yu H., et al., 2018; Wen Q., et al., 2019). Было показано, что G-CSF способен снижать пролиферативный ответ Т-клеток на аллогенные/митогенные стимулы (Moretta F., et al., 2016; Salem M.L., et al., 2016; Peng W., et al., 2017; Gary R., et al., 2018; Wen Q., et al., 2019); а также цитотоксическую клеточную активность (Safari

М., et al., 2016). Под воздействием G-CSF была продемонстрирована стимуляция Th-2 дифференцировки Т-лимфоцитов (Bunse С.Е., et al., 2016; Salem M.L., et al., 2016; Kast R.E., et al., 2017; Xie Y., et al., 2017; Jeannin P., et al., 2018), ингибирование активности Т-хелперов 1-го типа (Franzke A., et al., 2003; Hollmén M., et al., 2016; Xie Y., et al., 2017); усиление продукции IL-10/TGF- $\beta$  Т-клетками (Rutella S., et al., 2002); стимуляция гомеостатического трафика Т-регуляторных лимфоцитов (Maj T., Zou W., 2019). Однако, ключевые детали этих процессов остаются не ясными.

### **Заключение**

Не вызывает сомнений ключевая роль G-CSF в формировании врожденной противоинфекционной защиты. Имеются лишь отрывочные данные, предполагающие значимость G-CSF в регуляции адаптивного иммунитета. Вместе с тем, инициация адаптивных иммунных процессов, развивающихся в ответ на инфекцию, повреждения тканей и/или кровопотерю происходит, как правило, на фоне высоких уровней этого цитокина в крови. Это означает, что G-CSF может воздействовать на начальную, самую чувствительную к действию регуляторных факторов, фазу адаптивного иммуногенеза. Очевидно, что основное влияние G-CSF на иммуногенез, связано с его прямыми эффектами на миграционные и функциональные свойства макрофагальных клеток и Т-лимфоцитов, экспрессирующих G-CSFR. Данная работа направлена на подтверждение (или опровержение) высказанного предположения.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Материалы, послужившие основой для данной работы, получены в результате исследования 42 условно здоровых доноров в возрасте от 21 до 40 лет, мужского и женского пола.

*Критериями исключения* из исследуемой группы были: период обострения хронических заболеваний, наличие онкологических, аутоиммунных, аллергических, психических, инфекционных и наследственных заболеваний; наличие наркотической или алкогольной зависимости. Исследование было одобрено локальным этическим комитетом (решение № 7 от 10 марта 2015 года) и проводилось под руководством доктора медицинских наук, профессора Селедцова В.И. на базе Центра медицинских биотехнологий БФУ им. И. Канта.

### 2.1. Методы исследования

В работе были использованы две исследовательские модели. Мц/Мф модель (**Рисунок 5**) позволяла оценивать прямые эффекты G-CSF на поверхностные и цитокин-продуцирующие свойства Мц/Мф.

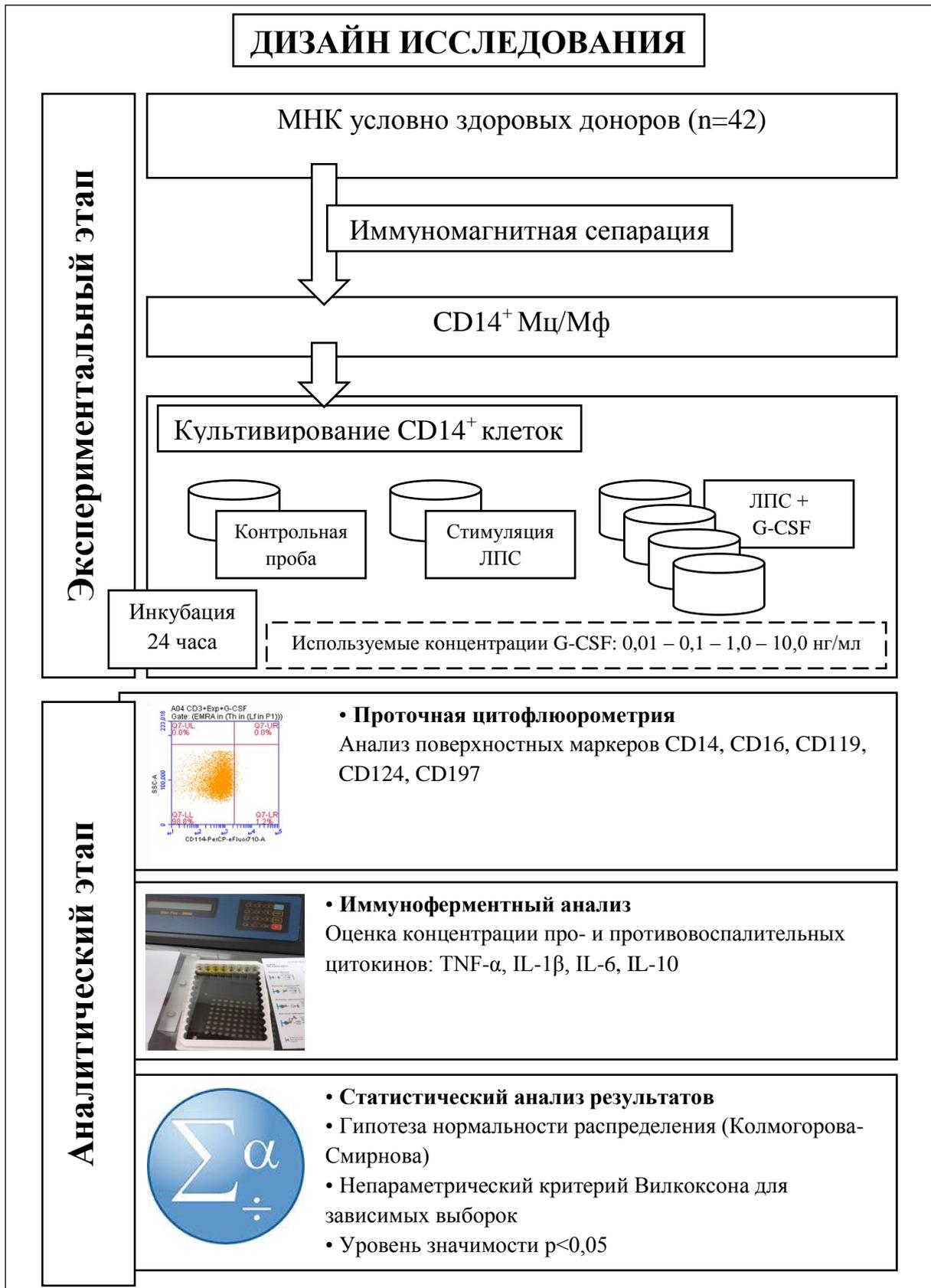


Рисунок 5. Мц/Мф модель - дизайн исследования

T-клеточная модель (Рис. 6) была направлена на определение прямых эффектов G-CSF на поверхностные и цитокин-продуцирующие свойства T-лимфоцитов.

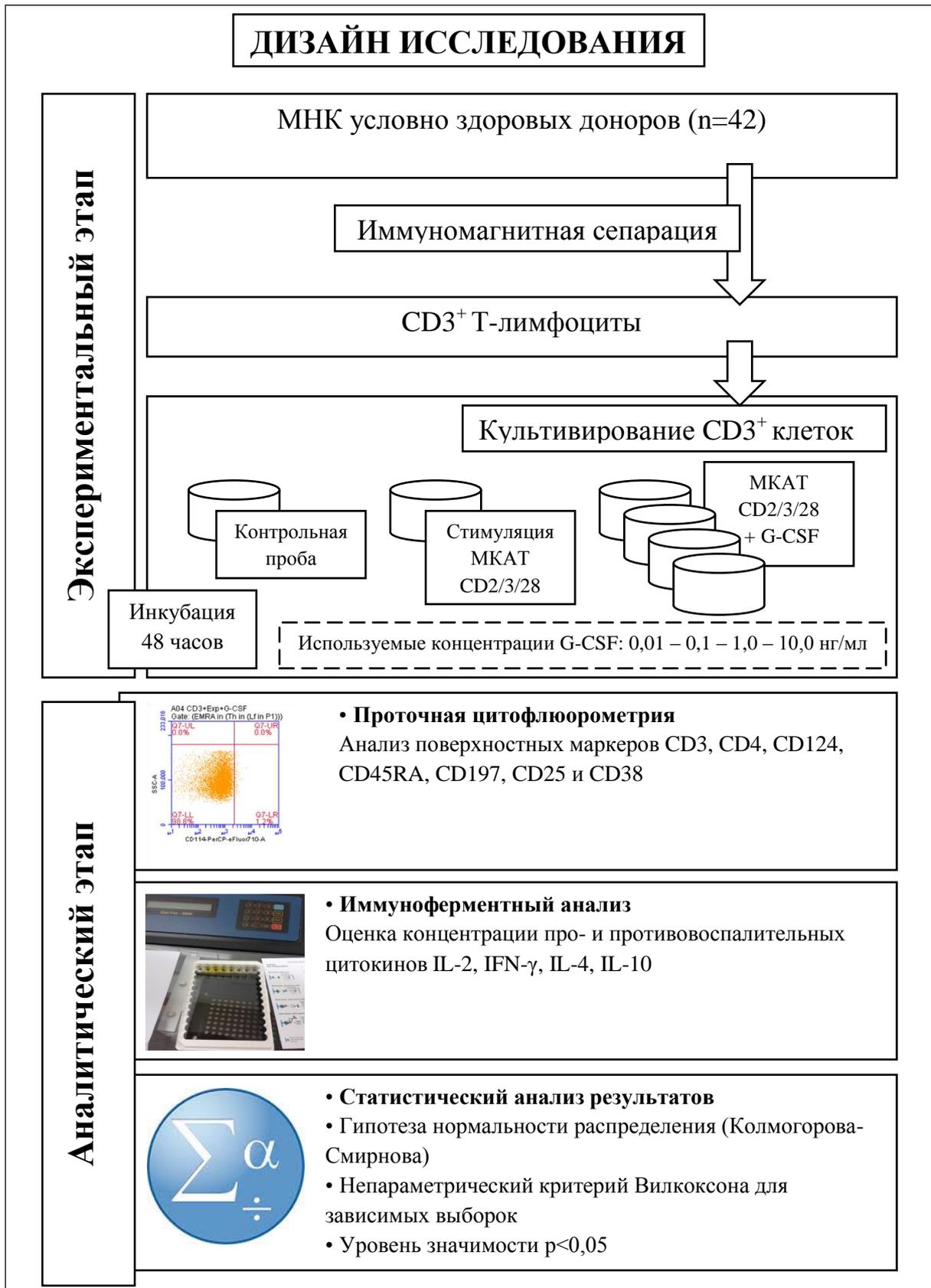


Рисунок 6. Т-клеточная модель - дизайн исследования

### **2.1.1. Выделение мононуклеарных лейкоцитов из периферической крови**

Материалом исследования являлась венозная кровь в объеме 20 мл, полученная из локтевой вены стандартным методом с использованием вакуумных систем для забора крови «BD VACUTAINER™» (Greiner bio-one, Австрия) содержащих 20 Ед/мл гепарина. МНК получали из периферической крови путем центрифугирования на градиенте плотности фиколла (Ficoll-Paque™ PREMIUM, GE Healthcare, США),  $1,077 \pm 0,001$  г/мл. Для этого в пропорции 1:1 разводили гепаринизированную венозную кровь фосфатно солевым буфером и аккуратно наслаивали клеточную суспензию в соотношении 3:1 на раствор фиколла. Далее пробирку с кровью помещали в центрифугу Eppendorf Centrifuge 5702R, (Eppendorf, Германия) и откручивали в течение 45 минут на скорости 1500 об/мин при 24°C. После данной процедуры, на границе плотностей растворов образовывалось кольцо МНК. Это кольцо собирали в стерильных условиях и помещали в предварительно подготовленную пробирку. Далее клетки отмывали несколько раз в большом объеме буфера посредством центрифугирования в течение 15 минут при 1500 об/мин. Полученный клеточный осадок разводили в фосфатно-солевом буфере и использовали для получения чистых Мц/Мф и Т-лимфоцитов.

### **2.1.2. Выделение CD14<sup>+</sup> моноцитов/макрофагов и CD3<sup>+</sup> Т-лимфоцитов из мононуклеарных клеток**

Получение монокультур CD14<sup>+</sup> клеток (Мц/Мф) и CD3<sup>+</sup> клеток (Т-лимфоцитов) осуществляли методом позитивной, колоночной иммуномагнитной сепарации. В основе использованного нами метода лежит технология MACS (magnetic-activated cell sorting), (Miltenyi Biotec, Германия), базирующаяся на использовании специфичных антител, конъюгированных с суперпарамагнитными частицами MACS MicroBeads. В наших исследованиях мы использовали human CD14 MicroBeads (Miltenyi Biotec, Германия) и human CD3 MicroBeads (Miltenyi Biotec, Германия). В соответствии с инструкцией производителя мы добавляли взвесь частиц в клеточную суспензию, где за счет высокоспецифичных взаимодействий по типу антиген-антитело, интересующие нас клетки (Мц/Мф или Т-лимфоциты) приобретали суперпарамагнитную метку. Далее клетки помещали в специальный буфер для сепарации и вносили их в колонки LS

Columns (Miltenyi Biotec, Германия) со специальным ферромагнитным матриксом, закрепленные в магнитном сепараторе QuadroMACS™ Separator (Miltenyi Biotec, Германия). В сепараторе магнитное поле захватывало и удерживало суперпарамагнитные частицы и, соответственно, клетки, на поверхности которых располагались данные частицы. Не прикрепившиеся к колонке клетки отмывали промывочным буфером. После нескольких промывок, колонка убиралась из сепаратора, в отсутствие магнитного поля, целевая клеточная фракция выходила из колонки в небольшом объеме специального буфера. Частицы MACS MicroBeads - биodeградируемые. Это позволяло минимизировать их воздействие на жизнеспособность, активационный потенциал и функциональную активность выделенных клеток. Выделенные монокультуры CD3<sup>+</sup> и CD14<sup>+</sup> помещали в культуральную среду TechMACS Medium (Miltenyi Biotec, Германия).

### **2.1.3. Культивирование моноцитов/макрофагов и Т-клеток**

Непосредственно перед культивированием проводили подсчет клеток, оценку их жизнеспособности и чистоты. Подсчет клеток проводили с помощью автоматического счетчика частиц Z2 COULTER COUNTER Analyzer, (Beckman coulter, США), принцип работы которого базируется на технологии распределения частиц по размеру и определения изменения электрического сопротивления жидкости частицами в электрическом поле, проходящими через отверстие между двумя электродами (изменение сопротивления было пропорционально объему частицы). Жизнеспособность и чистоту выделенных клеток осуществляли методом проточной цитофлуориметрии на приборе BD Accuri®C6 Flow Cytometer, (BD Biosciences, США) с использованием возможностей программного обеспечения C6 Flow Plus. Для определения жизнеспособности использовали флуоресцентный краситель пропидиум иодид (PI) (eBioscience, Германия). Это интеркалирующий флуоресцентный краситель, который избирательно проникает через мембрану мертвых клеток. Клетки, положительно окрашенные этим красителем, считаются мертвыми. Для определения чистоты, выделенные клетки окрашивали анти-CD14 антителами, конъюгированными с (PerCP) (eBioscience, Германия) или анти-CD3 антителами, конъюгированными с PE

(eBioscience, Германия). Оценку жизнеспособности и подсчет клеток проводили до и после их культивирования.

Выделенные CD14<sup>+</sup> Мц/Мф рассаживали в 24-луночный планшет и культивировали в концентрации  $1,0 - 1,5 \times 10^6$  кл/мл в бессывороточной среде TechMACS Medium (Miltenyi Biotec, Германия), содержащей  $5 \times 10^{-5}$  М 2-меркаптоэтанола (Acros Organics, США), в течение 24 ч, при 37°C, во влажной атмосфере с 5% CO<sub>2</sub>.

Для активации Мц/Мф мы использовали бактериальный ЛПС (Пирогенал, МЕДГАМАЛ ФНИЦЭМ им. Н.Ф. ГАМАЛЕИ, Россия) в концентрации 1 мкг/мл. Рекомбинантный G-CSF (human G-CSF, research grade) (Miltenyi Biotec, Германия) в концентрациях 0,01, 0,1, 1,0 10,0 нг/мл добавляли к клеткам вместе с ЛПС в самом начале их культивирования. Ставили следующие варианты культур:

1. CD14<sup>+</sup> клетки
2. CD14<sup>+</sup> клетки + G-CSF (10,0 нг/мл)
3. CD14<sup>+</sup> клетки + ЛПС (1 мкг/мл)
4. CD14<sup>+</sup> клетки + ЛПС (1 мкг/мл) + G-CSF (0,01 нг/мл)
5. CD14<sup>+</sup> клетки + ЛПС (1 мкг/мл) + G-CSF (0,1 нг/мл)
6. CD14<sup>+</sup> клетки + ЛПС (1 мкг/мл) + G-CSF (1,0 нг/мл)
7. CD14<sup>+</sup> клетки + ЛПС (1 мкг/мл) + G-CSF (10,0 нг/мл)

После культивирования клетки собирали и анализировали их поверхностные маркеры методом проточной цитофлюорометрии, а надосадочную жидкость оценивали на содержание цитокинов иммуноферментным методом.

Выделенные CD3<sup>+</sup> Т-лимфоциты рассаживали в 24-луночный планшет и культивировали в концентрации  $1,0 - 1,5 \times 10^6$  кл/мл в бессывороточной среде TechMACS Medium (Miltenyi Biotec, Германия), содержащей  $5 \times 10^{-5}$  М 2-меркаптоэтанола (Acros Organics, США), в течение 48 ч, при 37°C, во влажной атмосфере с 5% CO<sub>2</sub>.

Для активации Т-клеток использовали частицы, конъюгированные с антителами к молекулам CD2, CD3 и CD28 (T Cell Activation/Expansion Kit, MACS Miltenyi Biotec, Германия), которые при взаимодействии с Т-лимфоцитами имитируют действие АПК. Рекомбинантный G-CSF (human G-CSF, research grade) (Miltenyi Biotec, Германия) в

концентрациях 0,01, 0,1, 1,0, 10,0 нг/мл добавляли к клеткам вместе с активирующими частицами в самом начале их культивирования. Ставили следующие варианты культур:

1. CD3<sup>+</sup> клетки
2. CD3<sup>+</sup> клетки + G-CSF (10,0 нг/мл)
3. CD3<sup>+</sup> клетки + активатор
4. CD3<sup>+</sup> клетки + активатор + G-CSF (0,01 нг/мл)
5. CD3<sup>+</sup> клетки + активатор + G-CSF (0,1 нг/мл)
6. CD3<sup>+</sup> клетки + активатор + G-CSF (1,0 нг/мл)
7. CD3<sup>+</sup> клетки + активатор + G-CSF (10,0 нг/мл)

После культивирования клетки собирали и анализировали их поверхностные маркеры методом проточной цитофлуориметрии, а надосадочную жидкость так же оценивали на содержание цитокинов иммуноферментным методом.

#### **2.1.4. Проточная цитофлуориметрия клеток**

После культивирования клетки отмывали, затем окрашивали с помощью коктейлей меченных антител, помещали в специальные пробирки и анализировали их на наличие исследуемых поверхностных маркеров на проточном цитофлуориметре.

Для окрашивания Мц/Мф использовали коктейль антител, включающий в себя PerCP-меченые анти-CD14 (eBioscience, Германия), FITC-меченые анти-CD16, PE-меченые анти-CD119, APC-меченые анти-CD124 и PE/Alexa Fluor® 488-меченые анти-CD197 антитела (BioLegend, США). Окрашивание проводили строго по инструкции компании-производителя антител. Для адекватного отображения данных флуоресценции и настройки цветовых компенсаций использовали одноцветные и ФМО (флуоресценция минус один) контроли. Для выставления границ зоны позитивного окрашивания использовали неокрашенные, одноцветные и ФМО-контроли. Для анализа неспецифического связывания использовали изотип-контроли (Iso) для IgG1 и IgG2a: Iso IgG2a, меченные APC, PE, AF488 и Iso IgG1-меченный PE (BioLegend, США). Анализ и обработку полученных результатов проводили с использованием специализированного программного обеспечения C-Sampler Software (BD Biosciences, США).

Для идентификации Т-клеточных субпопуляций и определения их активационного статуса использовали следующие меченные флуорохромами антитела:

CD114-FITC, CD4-PerCP (eBioscience, Германия), CD45RA-APC, CD197-PE (BD Pharmingen, США), CD25-FITC и CD38-AF488 (BioLegend, США). Для предотвращения возможных неспецифических взаимодействий использовали блокатор Fc-рецепторов (Miltenyi Biotec, Германия). Клетки окрашивали в точном соответствии с инструкциями компаний-производителей используемых антител. Для оценки неспецифического связывания использовали изотипические контроли, в частности: Iso MOPC-21 для IgG1 и Iso MPC-11 для IgG2b. Выставление зон негативного окрашивания проводили с использованием неокрашенных, одноцветных и ФМО-контролей. Обработку и анализ цитометрических данных проводили с помощью программного обеспечения C-Sampler Software (BD Biosciences, США).

### **2.1.5. Определение концентраций цитокинов в культуральных супернатантах**

Содержание цитокинов в клеточных супернатантах определяли методом ИФА с использованием коммерческих тест-систем компании «Вектор Бест», согласно приложенным инструкциям. Результаты оценивали на автоматическом комбинированном иммуноферментном и биохимическом анализаторе «ChemWell 2910» (Awareness Technology, inc., США).

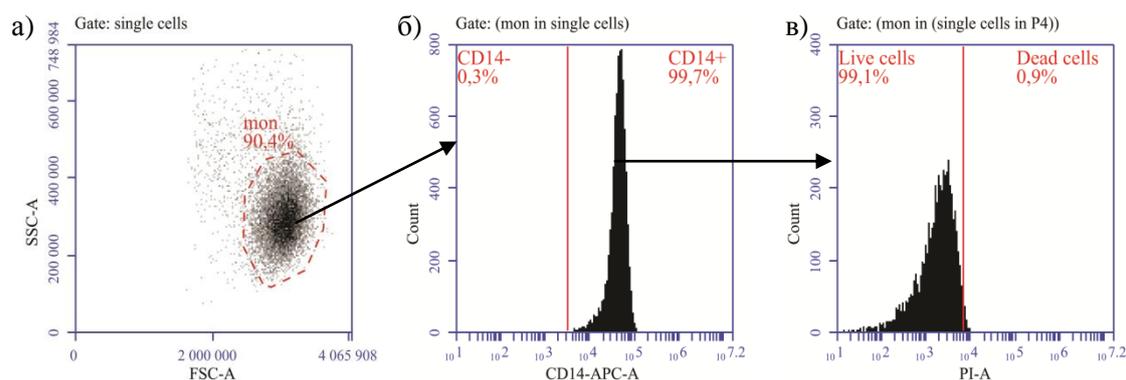
### **2.1.6. Статистический анализ**

Статистический анализ данных проводили с использованием программного обеспечения IBM SPSS Statistics 20 (Statistical Package for the Social Sciences, США). Проверка гипотезы о нормальности распределения результатов по критерию Колмогорова-Смирнова, показала, что выборки не имели нормального распределения. Были определены: медиана (M), первый и третий квартили (Q1, Q3). Для оценки статистической достоверности различий использовали непараметрический критерий Вилкоксона для зависимых выборок. Различия между выборками считались значимыми при уровне  $p < 0,05$ .

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

### 3.1. Чистота и жизнеспособность выделенных CD14<sup>+</sup> и CD3<sup>+</sup> клеток.

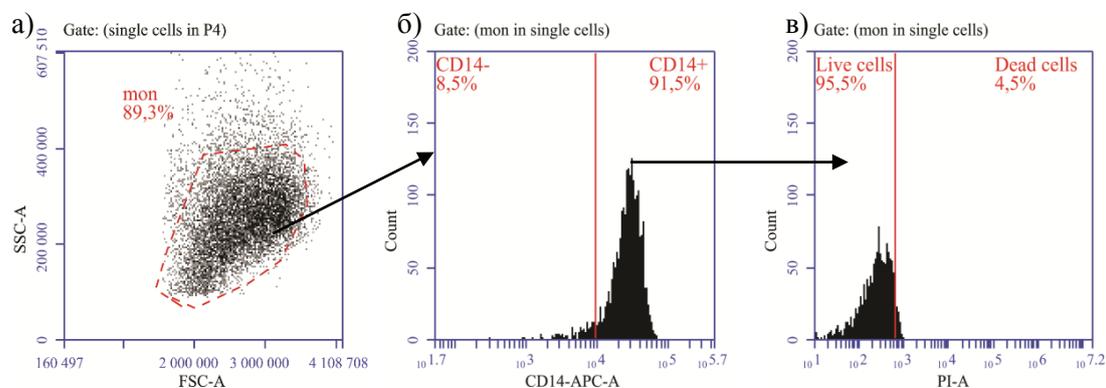
Выделенные методом магнитной сепарации CD14<sup>+</sup> Мц/Мф имели следующие характеристики: чистота – 98,8 (97,8 – 99,3) %, жизнеспособность – 95,4 (94,0 – 99,5) %. Данные полученные на проточном цитофлуориметре здесь и далее представлены в виде точечных графиков и двумерных гистограмм (**Рисунок 7**).



**Рисунок 7.** Чистота и жизнеспособность выделенных из МНК Мц/Мф.

- а) распределение клеток по прямому (FSC) и боковому (SSC) светорассеянию;  
 б) содержание CD14<sup>+</sup> клеток;  
 в) жизнеспособность клеток, оцениваемая по окрашиванию PI: зона позитива – мертвые, зона негатива – живые.

Через 24 часа культивирования в присутствии бактериального ЛПС наблюдалось статистически значимое снижение жизнеспособности макрофагальных клеток. При этом добавление G-CSF в клеточные культуры не оказывало существенного влияния на клеточную жизнеспособность (**рисунок 8**).

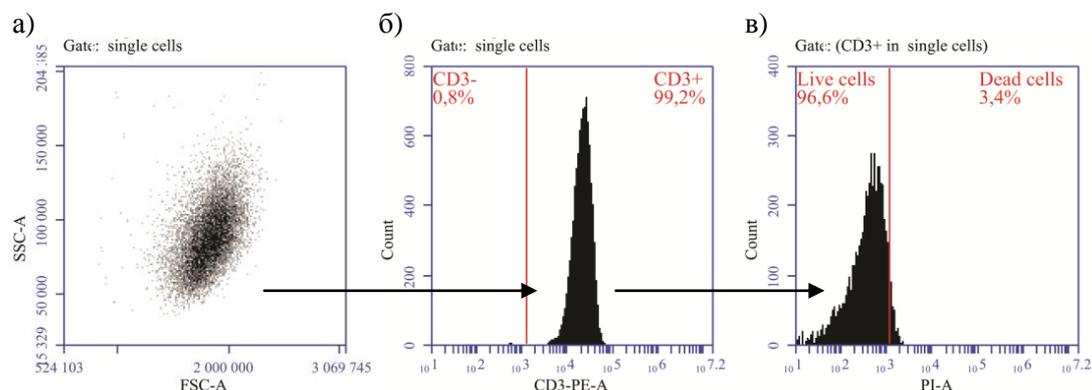


**Рисунок 8.** Чистота и жизнеспособность Мц/Мф после их культивирования (24 ч) в присутствии ЛПС.

- а) распределение клеток по прямому (FSC) и боковому (SSC) светорассеянию;  
 б) содержание CD14<sup>+</sup> клеток;

в) жизнеспособность клеток, оцениваемая по окрашиванию PI: зона позитива – мертвые, зона негатива – живые.

Жизнеспособность и чистота культуры  $CD3^+$  Т-лимфоцитов, полученных методом магнитной сепарации, составляли не менее 95,0% и 99,0% ( $\pm 1,0\%$ ) соответственно (Рисунок 9).



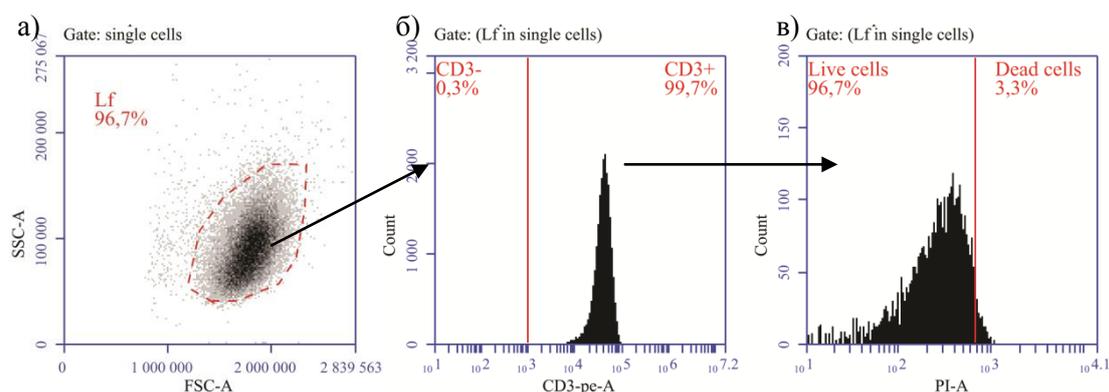
**Рисунок 9.** Чистота и жизнеспособность выделенных из МНК  $CD3^+$  Т-лимфоцитов

а) распределение клеток по прямому (FSC) и боковому (SSC) светорассеянию

б) содержание  $CD3^+$  Т-клеток;

в) жизнеспособность клеток, оцениваемая по окрашиванию PI: зона позитива – мертвые, зона негатива – живые.

После 48 часов культивирования жизнеспособность клеток несколько снижалась. G-CSF не оказывал существенного влияния на жизнеспособность Т-лимфоцитов (рисунок 10).



**Рисунок 10.** Чистота и жизнеспособность  $CD3^+$  Т-лимфоцитов после их культивирования (48ч) с активирующими частицами.

а) распределение клеток по прямому (FSC) и боковому (SSC) светорассеянию

б) содержание  $CD3^+$  Т-клеток;

в) жизнеспособность клеток, оцениваемая по окрашиванию PI: зона позитива – мертвые, зона негатива – живые.

### 3.2. Влияние G-CSF на поверхностные и цитокин-продуцирующие свойства моноцитов/макрофагов

#### 3.2.1. Оценка прямых эффектов G-CSF на число CD16<sup>+</sup>, CD119<sup>+</sup>, CD124<sup>+</sup>, CD197<sup>+</sup> моноцит/макрофагов

На рисунке 11 представлена стратегия гейтирования для проточной цитометрии макрофагальных клеток. Чистота CD14-позитивных клеток, выделенных из МНК периферической крови методом позитивной колоночной магнитной сепарации, составляла 98,8 (97,8 – 99,3) %, клеточная жизнеспособность составляла 95,4 (94,0 – 99,5) %

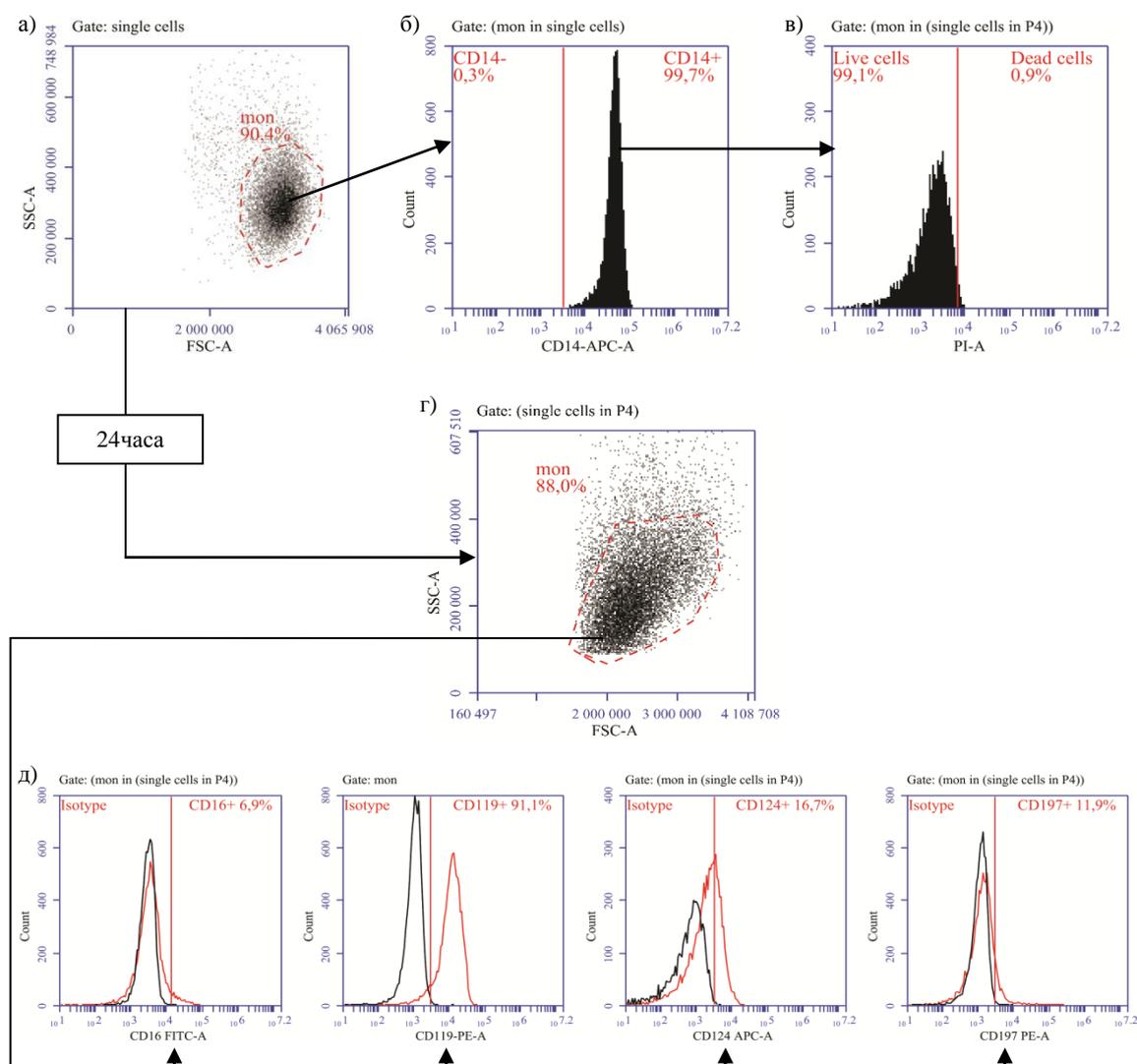
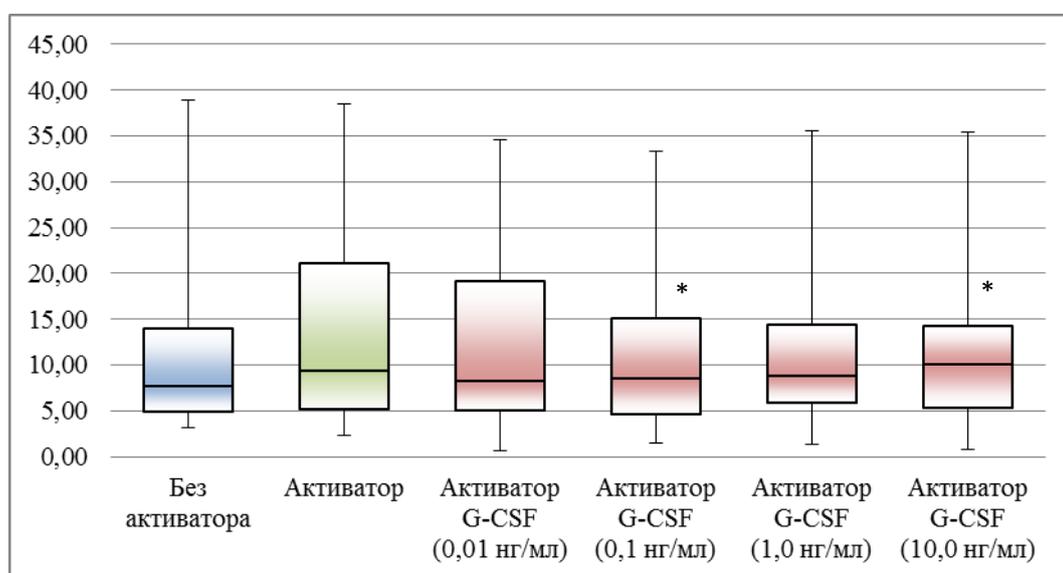


Рисунок 11. Алгоритм цитометрического анализа Мц/Мф.

- а) Прямое светорассеяние (FSC) против бокового светорассеяния (SSC) клеток до культивирования;
- б) гистограмма CD14<sup>+</sup> клеток перед культивированием;
- в) клеточная жизнеспособность, оцененная с использованием окрашивания PI: окрашенные – мертвые клетки, неокрашенные – живые клетки;
- г) прямое светорассеяние (FSC) против бокового светорассеяния (SSC) клеток после культивирования;
- д) окрашивание CD16<sup>+</sup>, CD119<sup>+</sup>, CD124<sup>+</sup> и CD197<sup>+</sup> клеток из общего числа Мц/Мф.

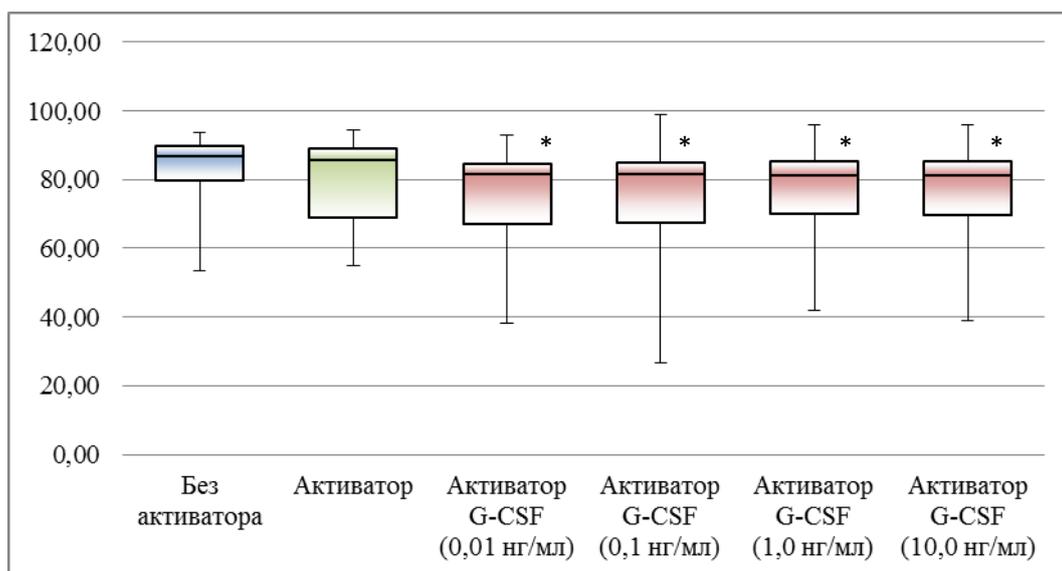
Активации Мц/Мф, вызванная ЛПС, не оказывала статистически значимого влияния на количество CD16<sup>+</sup> клеток. В тоже время, как показано на **рисунке 12**, добавление G-CSF к активируемым клеткам в концентрациях 0,1 и 10,0 нг/мл достоверно снижало количество CD16<sup>+</sup> клеток с 9,4 (5,2 – 21,1) % до 8,5 (4,6 – 15,1) % и с 9,4 (5,2 – 21,1) % до 8,8 (5,9 – 14,4) % соответственно.



**Рисунок 12.** Процентное содержание CD16<sup>+</sup> клеток в суммарной популяции макрофагальных клеток.

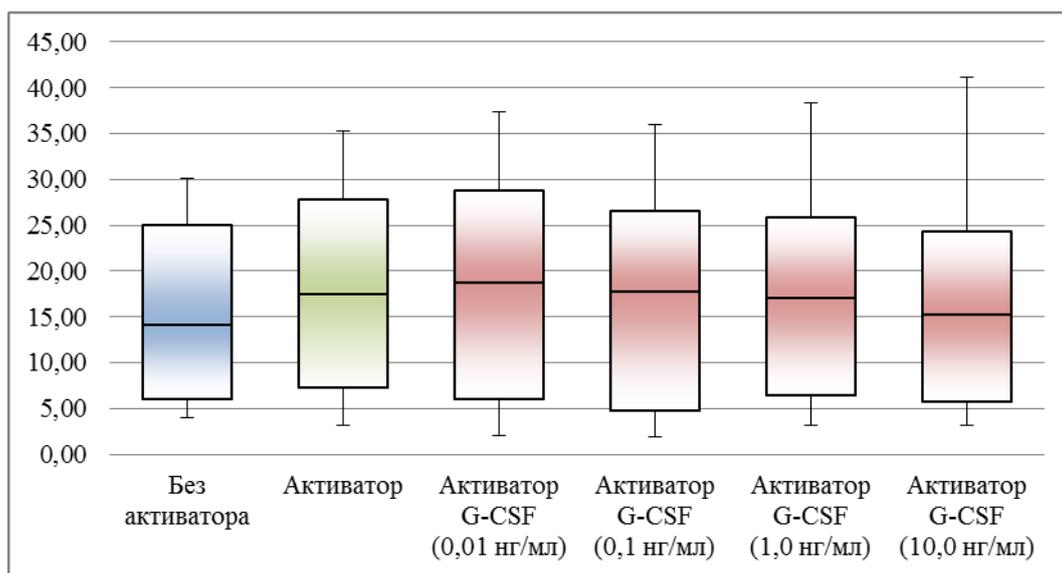
\*  $p < 0,05$  – в сравнении с клетками, активированными ЛПС в отсутствие G-CSF.

Активация Мц/Мф не приводила к существенным изменениям в количестве CD119<sup>+</sup> клеток. Как показано на **рисунке 13**, G-CSF во всех исследованных концентрациях обладал способностью существенно снижать среди активируемых клеток процентное содержание CD119<sup>+</sup> клеток (0,01 нг – с 85,5 (69,0 – 89,0) % до 81,6 (67,1 – 84,7) %; 0,1 нг – до 81,4 (67,6 – 84,9) %; 1,0 нг – до 81,2 (70,2 – 85,5) %; 10,0 нг – до 81,1(69,5 – 85,2) %).



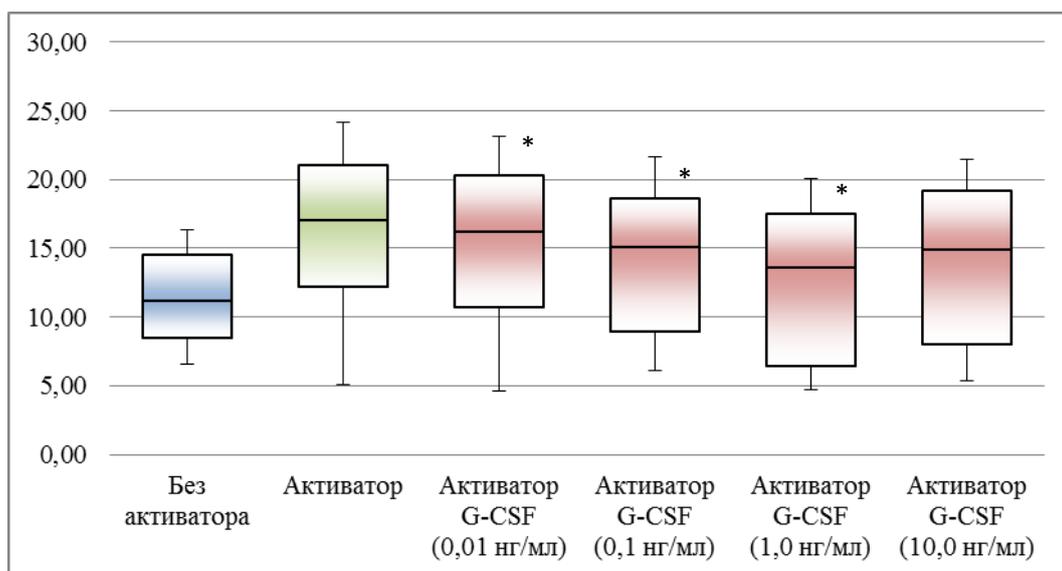
**Рисунок 13.** Процентное содержание CD119<sup>+</sup> клеток среди макрофагальных клеток.  
\*  $p < 0,05$  – в сравнении с клетками, активированными ЛПС в отсутствие G-CSF .

Согласно данным, представленным на **рисунке 14**, G-CSF не оказывал существенного влияния на количество CD124<sup>+</sup> макрофагальных клеток.



**Рисунок 14.** Процентное содержание CD124<sup>+</sup> клеток среди макрофагальных клеток.

ЛПС-индуцированная активация Мц/Мф приводила к существенному увеличению числа клеток экспрессирующих на своей поверхности молекулу CD197 (CCR7 – рецептор С-С хемокина 7) с 11,2 (8,5 – 14,5) % до 17,1 (12,2 – 21,0) %. Добавление G-CSF в концентрациях 0,01, 0,1 и 1,0 нг/мл приводило к заметному снижению числа CD197<sup>+</sup> клеток среди активированных Мф до 16,2 (10,7 – 20,3) %, 15,1 (9,0 – 18,7) % и 13,6 (6,4 – 17,6) % соответственно (**Рисунок 15**).

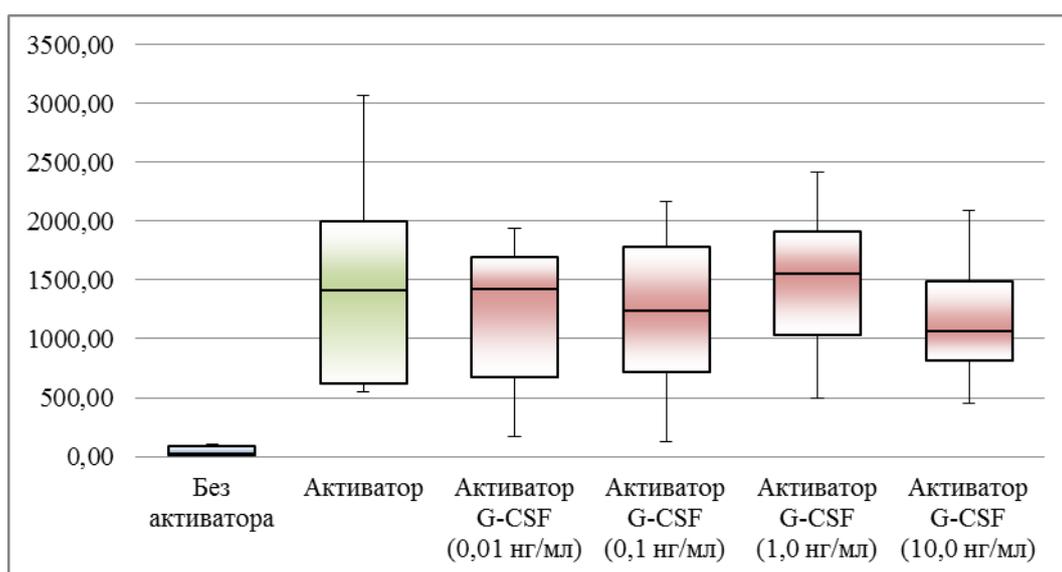


**Рисунок 15.** Процентное содержание CD197<sup>+</sup> клеток среди макрофагальных клеток.

\*  $p < 0,05$  – в сравнении с клетками, активированными ЛПС в отсутствие G-CSF .

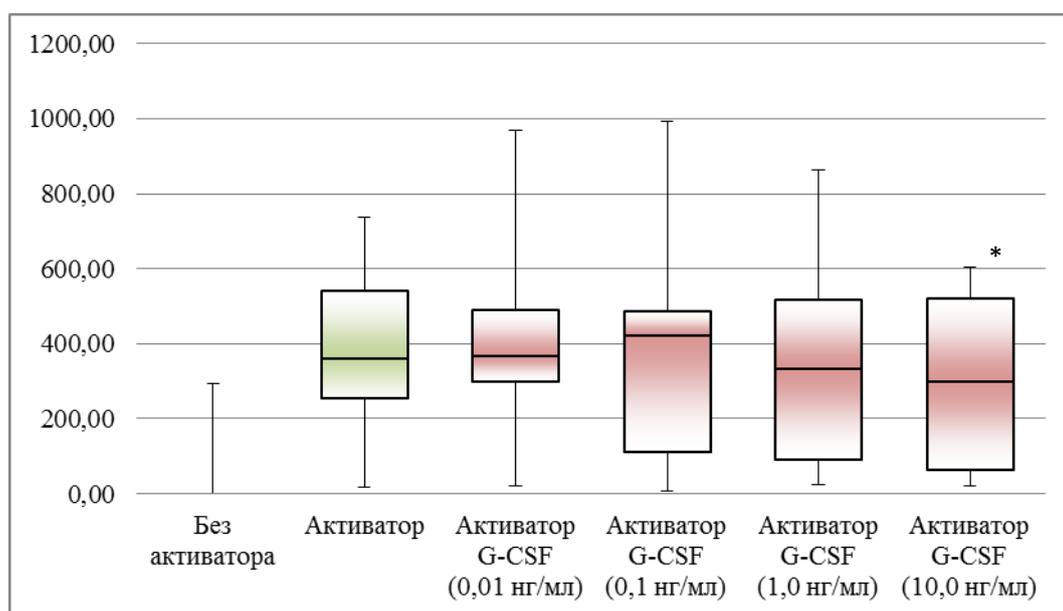
### 3.2.2. Влияние G-CSF на макрофагальную секрецию TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 и IL-10.

TNF- $\alpha$  – многофункциональный провоспалительный цитокин, участвующий в процессах липидного метаболизма и противовирусной защиты. Основными клетками продуцентами являются Мц/Мф. Как и ожидалось, активация ЛПС приводила к резкому усилению продукции TNF- $\alpha$  (с 23,79 (10,28 – 89,41) пг/мл до 1415,00 (624,85 – 1999,13) пг/мл). Добавление G-CSF в сочетании с ЛПС не приводило к статистически значимым изменениям в макрофагальной продукции TNF- $\alpha$  (**рисунок 16**).



**Рисунок 16.** Концентрация TNF- $\alpha$  (пг/мл) в культуральных супернатантах Мц/Мф.

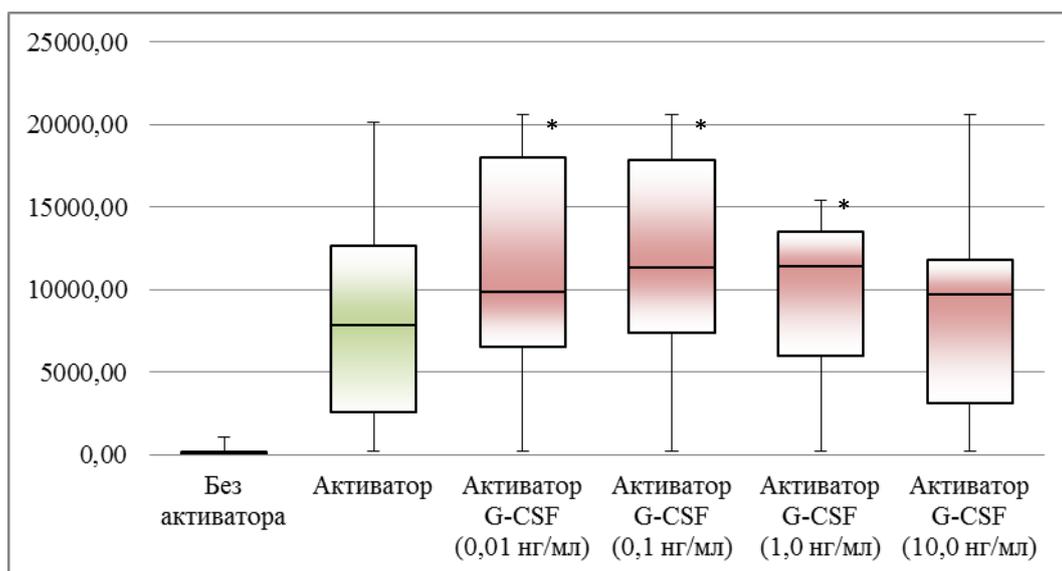
IL-1 $\beta$ , так же, как и TNF- $\alpha$ , относится к группе провоспалительных цитокинов. Он вовлечен в процессы активации и апоптоза лимфоцитов. IL-1 $\beta$  усиливает экспрессию молекул адгезии на клетках эндотелия и, тем самым, способствует диапедезу иммунокомпетентных клеток. Уровень продукции данного цитокина не активированными Мц/Мф был ниже чувствительности тест-системы. Активация Мц/Мф приводила к усилению продукции IL-1 $\beta$  до 359,40 (255,60 – 542,40) пг/мл. Добавление G-CSF только в максимальной концентрации (10,0 нг/мл) приводило к статистически значимому снижению продукции IL-1 $\beta$  до 298,80 (63,00 – 522,00) пг/мл (**Рисунок 17**).



**Рисунок 17.** Концентрация IL-1 $\beta$  (пг/мл) в культуральных супернатантах Мц/Мф.

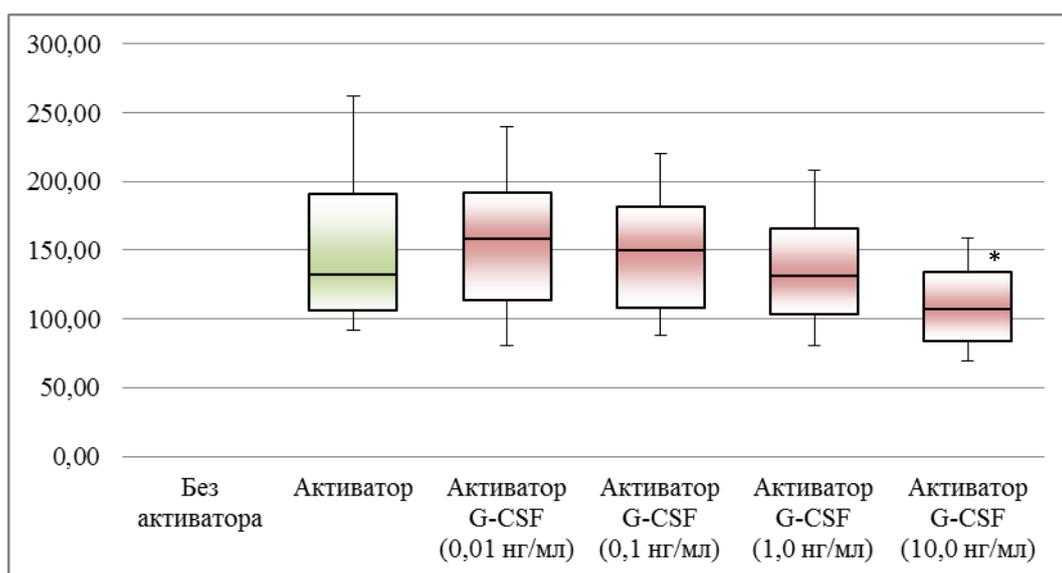
\*  $p < 0,05$  – в сравнении с клетками, активированными ЛПС в отсутствие G-CSF .  
в сравнении с пробой с активатором.

IL-6 является цитокином с широким спектром действия, обладающим как провоспалительными, так и противовоспалительными эффектами, в зависимости от особенностей рецепторных взаимодействий (Scheller J., et al. 2011). Уровень продукции данного цитокина не активированными Мц/Мф был ниже чувствительности тест-системы. Активация Мц/Мф приводила к усилению продукции IL-6. Интересно, что G-CSF в концентрациях 0,01, 0,1 и 1,0 нг/мл был способен значимо стимулировать Мф-продукцию IL-6 с 7805,15 (2535,43 – 12618,86) пг/мл до 9830,57 (6558,14 – 18000,00), 11337,43 (7344,00 – 17888,57) и 11373,72 (5956,50 – 13489,50) пг/мл соответственно (**Рисунок 18**).



**Рисунок 18.** Концентрация IL-6 (пг/мл) в культуральных супернатантах Мц/Мф  
\*  $p < 0,05$  – в сравнении с клетками, активированными ЛПС в отсутствие G-CSF .

IL-10 является противовоспалительным и иммуносупрессорным цитокином. Его преимущественно продуцируют альтернативно-активированные Мф, а также T-reg и Th-2 клетки (Hedrich С.М., Bream J.Н., 2010; Geginat J., et al., 2016; Hu D., et al., 2017; Rojas J.М., et al., 2017; Lane D., et al., 2018; Zhang P., Hill G.Р., 2019; Powell M.Д., et al., 2019). Активация Мц/Мф индуцировала продукцию IL-10. Как показано на **рисунке 19**, G-CSF в концентрации 10,0 нг/мл заметно снижал продукции IL-10 активированными Мц/Мф с 132,60 (106,25 – 191,35) пг/мл до 107,40 (84,12 – 134,05) пг/мл.



**Рисунок 19.** Концентрация IL-10 (пг/мл) в культуральных супернатантах Мц/Мф.  
\*  $p < 0,05$  – в сравнении с клетками, активированными ЛПС в отсутствие G-CSF .

### 3.3. Влияние G-CSF на Т-клеточный иммуногенез

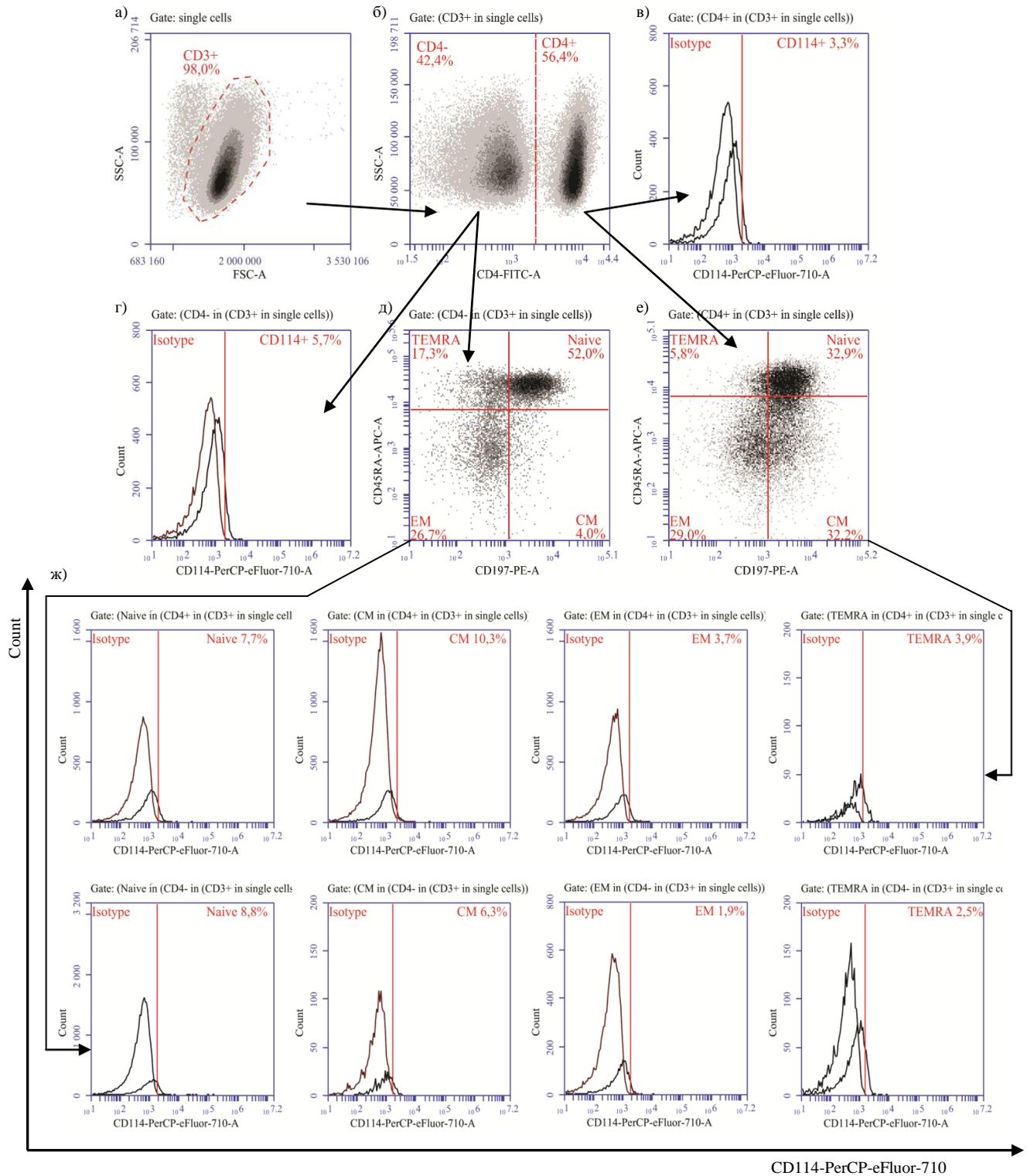
#### 3.3.1. Влияние клеточной активации и G-CSF на число G-CSFR (CD114)<sup>+</sup> лимфоцитов в Т-клеточных субпопуляциях

G-CSF воздействует на клетки посредством высокоспецифичного взаимодействия со своим рецептором (G-CSFR, CD114) на клеточной поверхности. Как было показано ранее (Touw I.P., van de Geijn G.J., 2007; Bunse C.E., et al., 2016), молекула CD114 экспрессируется на поверхности лимфоцитов. Однако, значимость G-CSFR в активации разных Т-клеточных субпопуляций до сих пор являлась мало изученной. Поэтому, мы исследовали влияние Т-клеточной активации на динамику численности G-CSFR<sup>+</sup> Т-клеток, а также на относительное число G-CSFR<sup>+</sup> лимфоцитов в различных Т-клеточных субпопуляциях.

Первоначально в общей CD3<sup>+</sup> клеточной популяции мы идентифицировали субпопуляции CD4<sup>+</sup> и CD4<sup>-</sup> клеток. Молекула CD4 это корецептор Т-клеточного рецептора, который отвечает за высокоспецифическое связывание с молекулами МНС II-типа, представленными на поверхности АПК, в то время, как за взаимодействие с МНС I-типа отвечает другой корецептор – CD8. CD4<sup>-</sup> клетки, это как правило CD8<sup>+</sup> клетки, за исключением некоторых минорных субпопуляций (Ярилин А.А., 2010). Таким образом, субпопуляцию CD4<sup>-</sup> Т-лимфоцитов можно считать синонимичной субпопуляции CD8<sup>+</sup> Т-клеток. В пределах этих двух популяций мы идентифицировали клетки по группам в зависимости от экспрессии на их поверхности молекул CD45RA и CD197.

CD45RA – длинная изоформа молекулы CD45, общего лейкоцитарного маркера, экспрессируется на поверхности наивных Т-лимфоцитов. Короткая изоформа CD45R0 представлена на Т-клетках памяти. CD197 – (СС-рецептор хемокина 7, CCR7) регулирует хоуминг клеток во вторичные лимфоидные органы. На основе определения экспрессии этих двух мембранных молекул, мы идентифицировали наивные CD45RA<sup>+</sup>CD197<sup>+</sup> Т-клетки (naïve), CD45RA<sup>-</sup>CD197<sup>+</sup> центральные Т-клетки памяти (CM), CD45RA<sup>-</sup>CD197<sup>-</sup> эффекторные Т-клетки памяти (EM), а также CD45RA<sup>+</sup>CD197<sup>-</sup> терминально дифференцированные Т-клеточные эффекторы (TEMRA) (Кудрявцев И.В., 2014; Todosenko N.M., et al., 2016; Shmarov V.A., et al., 2016).

На рисунке 20 представлена стратегия гейтирования, позволяющая идентифицировать CD114<sup>+</sup> Т-лимфоциты в Т-клеточных субпопуляциях.



**Рисунок 20.** Алгоритм цитометрического анализа экспрессии CD114 Т-лимфоцитами.

- а) прямое светорассеяние (FSC) против бокового светорассеяния (SSC);
- б) идентификация CD4-негативных и CD4-позитивных Т-клеток;
- в) окрашивание CD114<sup>+</sup> Т-клеток среди CD4-позитивных Т-клеток;

- г) окрашивание CD114<sup>+</sup> Т-клеток среди CD4-негативных Т-клеток;
- д) идентификация naïve Т-лимфоцитов, CM Т-лимфоцитов, EM Т-лимфоцитов и TEMRA Т-лимфоцитов среди CD4-негативных клеток по экспрессии молекул CD197 и CD45RA
- е) идентификация naïve Т-лимфоцитов, CM Т-лимфоцитов, EM Т-лимфоцитов и TEMRA Т-лимфоцитов среди CD4-позитивных клеток по экспрессии молекул CD197 и CD45RA
- ж) содержание CD114<sup>+</sup> лимфоцитов среди naïve Т-лимфоцитов, CM Т-лимфоцитов, EM Т-лимфоцитов и TEMRA Т-лимфоцитов в CD4-позитивной и CD4-негативной Т-клеточных субпопуляциях.

Как показано в **таблице 1** активация Т-лимфоцитов значительно увеличивала содержание CD114<sup>+</sup> клеток среди наивных CD4<sup>+</sup> лимфоцитов, а также среди CD4<sup>+</sup> центральных и эффекторных Т-клеток памяти. В этих условиях терминально дифференцированные CD4-позитивные Т-клетки не показали существенного прироста CD114<sup>+</sup> клеток. Т-клеточная активация также приводила к значимому приросту CD114<sup>+</sup> клеток среди наивных CD4-негативных лимфоцитов, а также среди CD4-негативных центральных Т-клеток памяти, но не среди CD4-негативных эффекторных Т-клеток памяти и терминально дифференцированных Т-клеточных эффекторов. Интересно, что G-CSF в концентрации 10,0 нг/мл был способен заметно усиливать стимулирующий эффект активации на экспрессию CD114 только среди наивных CD4-позитивных Т-лимфоцитов и CD4-позитивных терминально дифференцированных Т-клеточных эффекторов, не оказывая при этом существенного влияния на другие Т-клеточные субпопуляции.

Таким образом, только небольшое число Т-лимфоцитов экспрессирует на своей поверхности G-CSFR. Вместе с тем, экспрессия этого рецептора G-CSF может возрастать на относительно низкодифференцированных Т-клетках в ответ на активирующие стимулы.

Таблица 1. Содержание CD114<sup>+</sup> клеток (%) в Т-клеточных субпопуляциях.

Субпопуляция		Без активации	С активацией	Активация + G-CSF
CD4 <sup>+</sup> Т-клетки	%	0,9 (0,5 – 1,4)	2,5* (1,4 – 4,1)	2,4* (1,4 – 3,2)
CD4 <sup>+</sup> naïve Т-клетки	%	1,5 (0,3 – 1,9)	2,3* (1,8 – 2,6)	2,5* (1,3 – 3,8)
CD4 <sup>+</sup> CM Т-клетки	%	1,0 (0,4 – 1,9)	2,17* (1,7 – 2,6)	<b>2,5**</b> <b>(1,5 – 4,1)</b>
CD4 <sup>+</sup> EM Т-клетки	%	0,2 (0,1 – 0,2)	0,6* (0,3 – 0,9)	0,7* (0,5 – 1,0)
CD4 <sup>+</sup> TEMRA Т-клетки	%	0,5 (0,0 – 1,2)	0,9 (0,2 – 1,3)	<b>1,2**</b> <b>(0,8 – 1,6)</b>
CD4 <sup>+</sup> Т-клетки	%	1,6 (0,5 – 2,9)	3,4* (1,5 – 4,4)	3,5* (1,3 – 7,2)
CD4 <sup>+</sup> naïve Т-клетки	%	1,3 (0,2 – 1,8)	3,0* (1,2 – 5,1)	2,5* (1,1 – 4,3)
CD4 <sup>+</sup> CM Т-клетки	%	1,1 (0,4 – 2,2)	3,8* (0,8 – 9,4)	2,8* (0,5 – 5,2)
CD4 <sup>+</sup> EM Т-клетки	%	0,34 (0,0 – 0,9)	0,6 (0,1 – 1,1)	0,6 (0,1 – 0,9)
CD4 <sup>+</sup> TEMRA Т-клетки	%	0,5 (0,1 – 1,3)	0,5 (0,2 – 1,1)	0,6 (0,3 – 1,0)

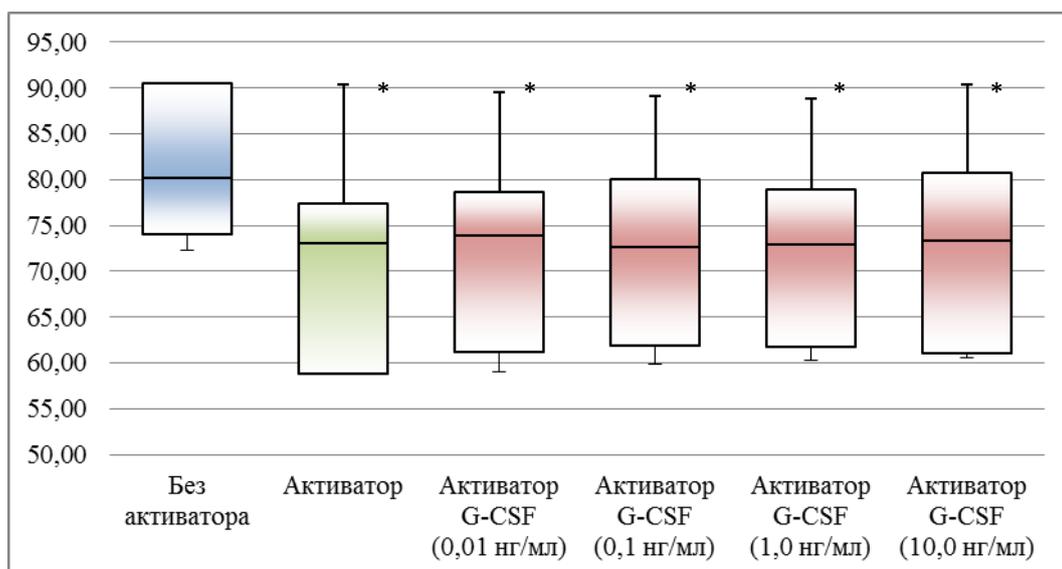
Примечание:

\* p<0,05 - в сравнении с Т-клетками, культивированными без активирующих частиц и G-CSF;

\*\* p<0,05 – в сравнении с Т-клетками, культивированными с активирующими частицами без G-CSF.

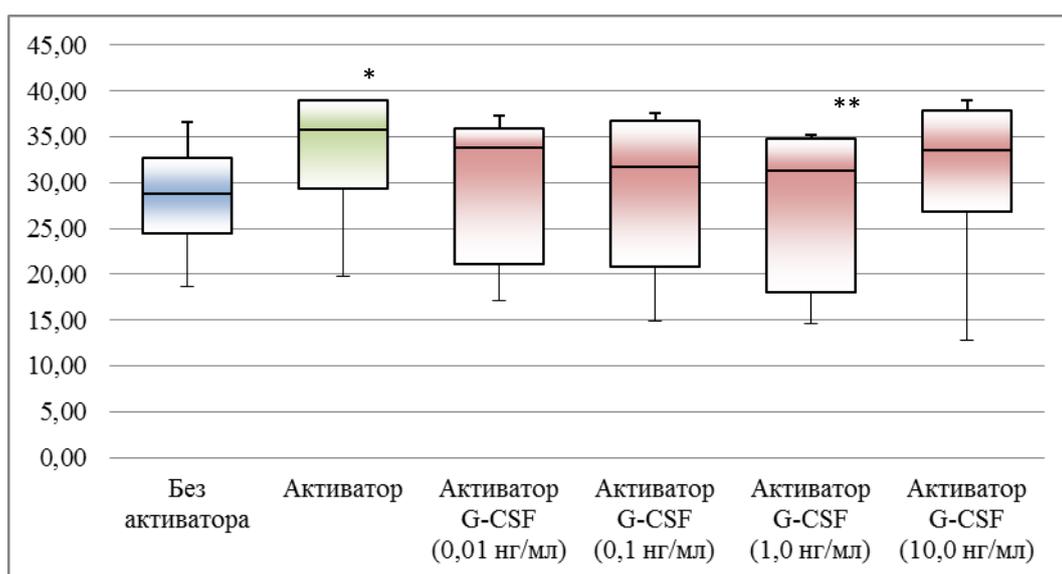
### 3.3.2. Влияние G-CSF на субпопуляционный состав Т-лимфоцитов

В рамках данной работы провели оценку влияния активации и G-CSF на субпопуляционный состав Т-лимфоцитов в условиях их краткосрочного культивирования. Как показано на **рисунке 21**, активация Т-клеток сопровождалась значимым уменьшением CD4-позитивных Т-лимфоцитов с 80,22 (74,06 – 90,48) % до 73,03 (58,79 – 77,40) %. При этом добавление G-CSF в Т-клеточные культуры не оказывало существенного влияния на этот процесс.



**Рисунок 21.** Содержание (%) CD4-позитивных Т-лимфоцитов в Т-клеточных культурах  
\*  $p < 0,05$  – в сравнении с пробой без Т-клеточной активации.

Интересно, что в ответ на активацию число наивных  $CD4^+CD45RA^+CD197^+$  Т-лимфоцитов заметно увеличивалось с 28,85 (24,42 – 32,69) % до 35,75 (29,33 – 38,99) %. Добавление G-CSF в клеточные культуры нивелировало этот процесс, но значимое снижение CD4-позитивных наивных Т-клеток наблюдалось только при концентрации G-CSF 1,0 нг/мл (**Рисунок 22**). При этом относительное число наивных клеток снижалось до 31,26 (18,04 – 34,74) %



**Рисунок 22.** Содержание (%) CD4-позитивных naïве Т-лимфоцитов.

\*  $p < 0,05$  – в сравнении с пробой без Т-клеточной активации;

\*\*  $p < 0,05$  – в сравнении с пробой с Т-клеточной активацией без G-CSF.

Ни Т-клеточная активация, ни G-CSF не оказывали существенного влияния на относительную численность  $CD4^+CD45RA^-CD197^+$  центральных Т-клеток памяти (Рисунок 23).

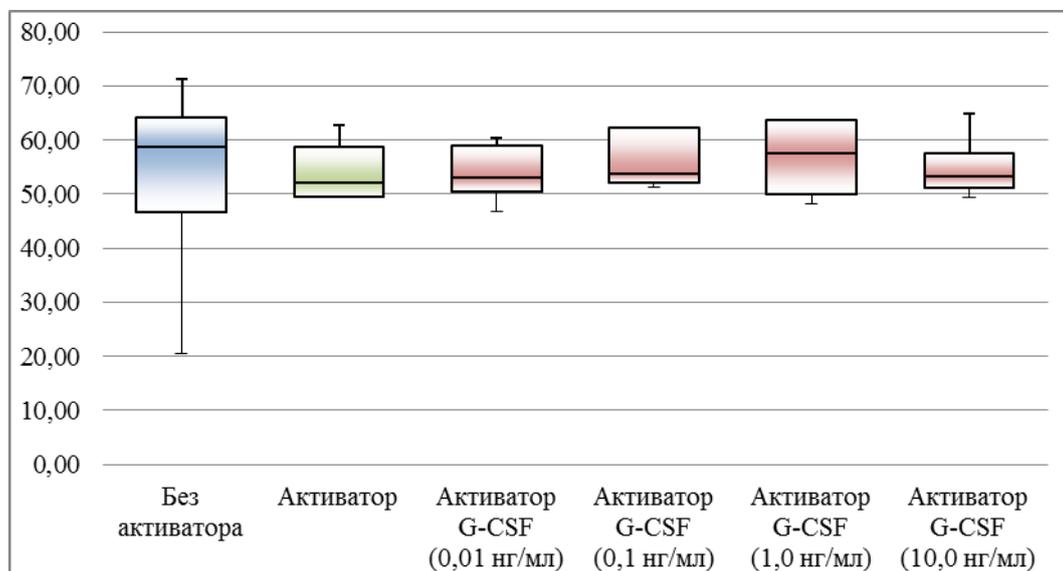


Рисунок 23. Содержание (%) CD4-позитивных СМ Т-лимфоцитов.

Относительное содержание  $CD4^+CD45RA^-CD197^-$  эффекторных Т-лимфоцитов памяти также существенно не менялось под воздействием Т-клеточной активации и G-CSF (Рисунок 24).

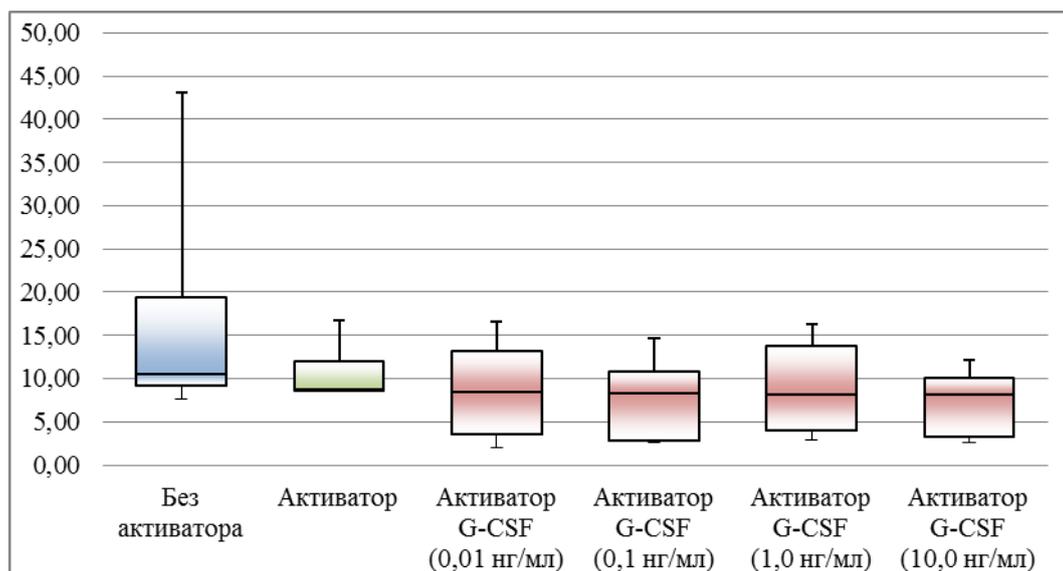
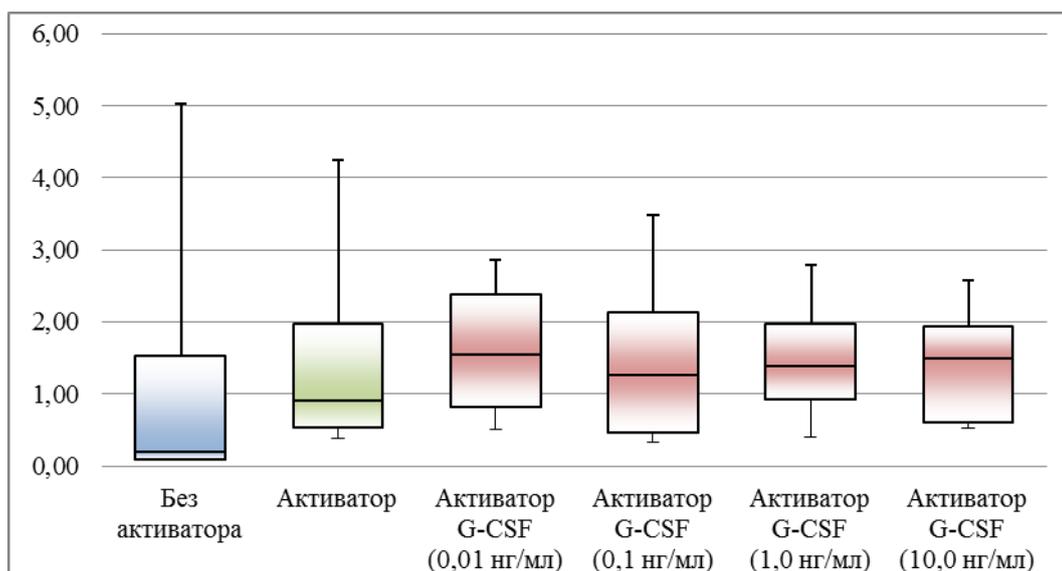


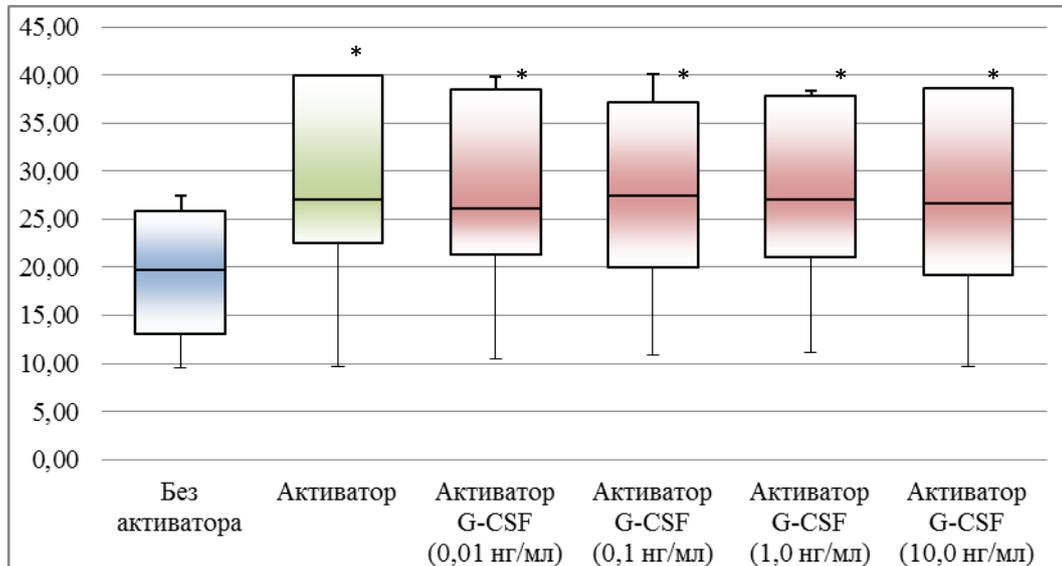
Рисунок 24. Содержание (%) CD4-позитивных ЕМ Т-лимфоцитов.

Аналогичная ситуация просматривалась при количественном анализе  $CD4^+CD45RA^-CD197^+$  терминально дифференцированных Т-клеток. (Рисунок 25).



**Рисунок 25.** Содержание (%) CD4-положительных TEMRA T-лимфоцитов.

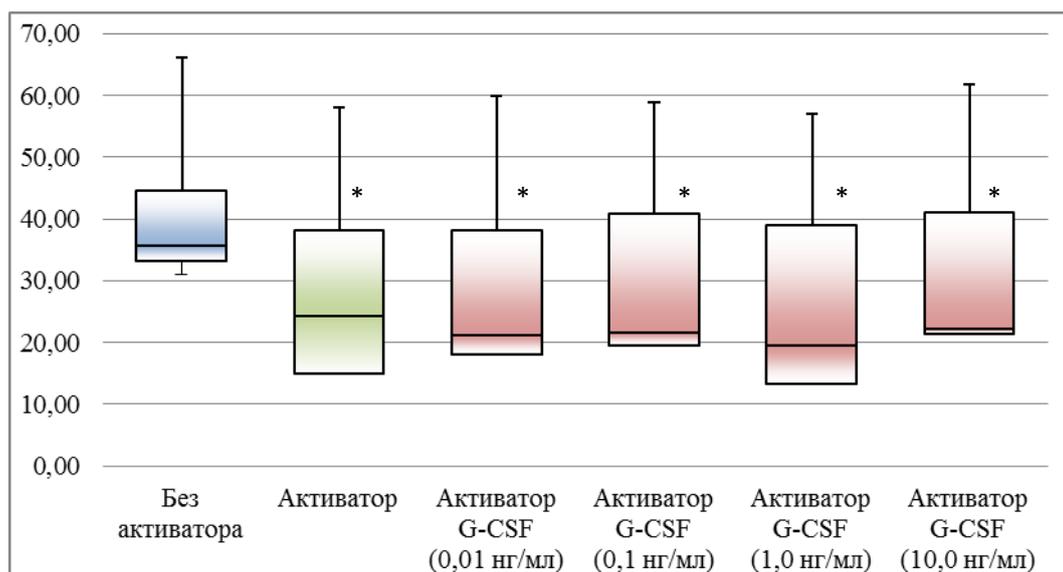
В то же время, T-клеточная активация сопровождалась значимым увеличением относительной численности CD4-негативных T-лимфоцитов с 19,78 (13,02 – 25,88) % до 27,05 (22,59 – 40,03) %. При этом, G-CSF не оказывал значимого влияния на этот процесс (**Рисунок 26**).



**Рисунок 26.** Содержание (%) CD4-негативных T-лимфоцитов.

\*  $p < 0,05$  – в сравнении с пробой без T-клеточной активации.

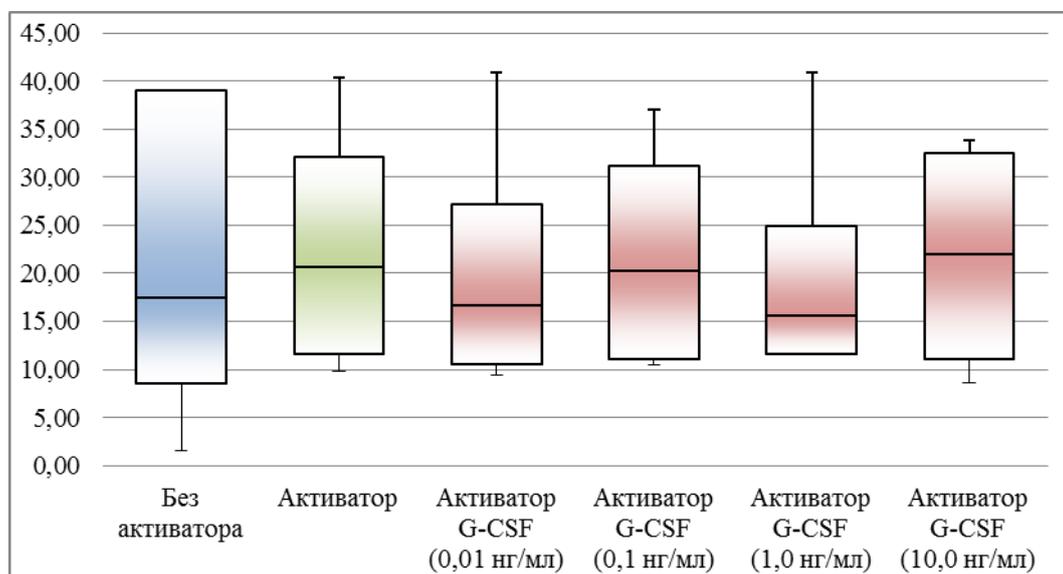
Как показано, на **рисунке 27**, относительное число наивных CD4-негативных CD45RA<sup>+</sup>CD197<sup>+</sup> T-лимфоцитов статистически значимо снижалось в ответ на T-клеточную активацию с 35,62 (33,15 – 44,53) % до 24,33 (14,86 – 38,07) %, G-CSF не вносил существенных изменений в этот процесс.



**Рисунок 27.** Содержание (%) CD4-негативных naïve Т-лимфоцитов.

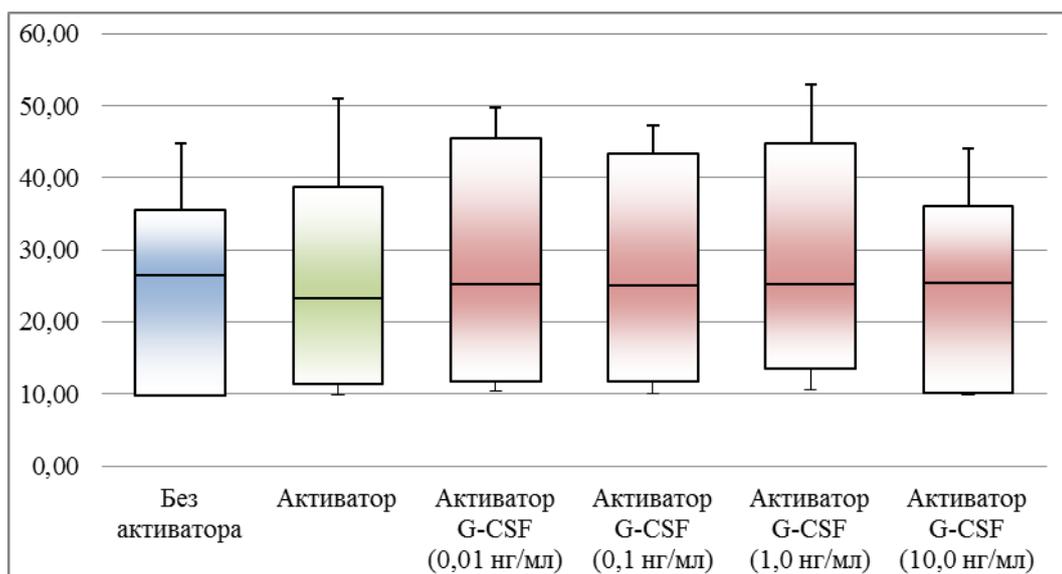
\*  $p < 0,05$  – в сравнении с пробой без Т-клеточной активации;

Данные, представленные на **рисунке 28**, свидетельствуют о том, что ни Т-клеточная активация, ни G-CSF не были способны изменять относительную численность в культуре CD4-негативных центральных Т-клеток памяти.



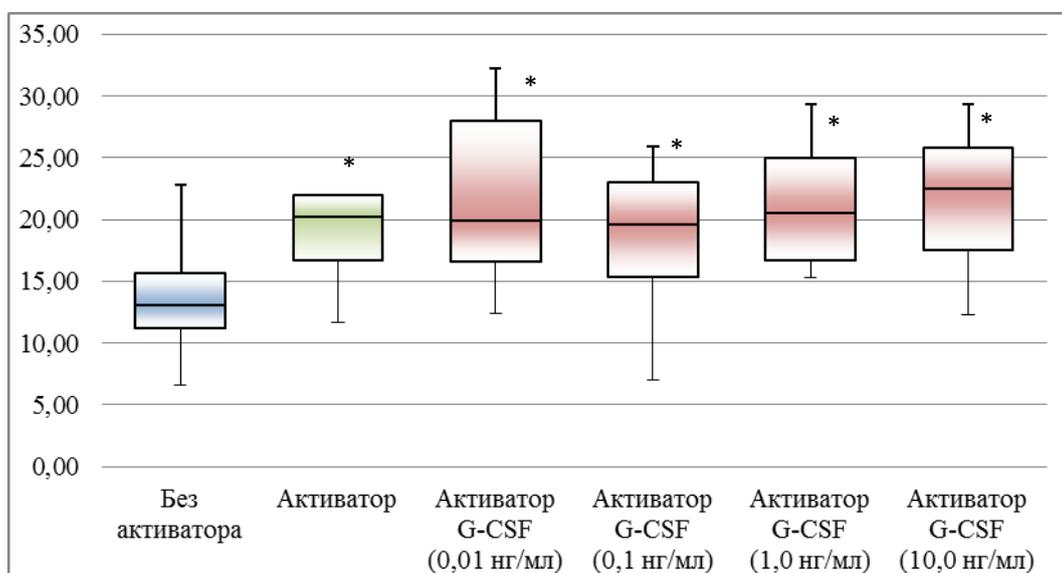
**Рисунок 28.** Содержание (%) CD4-негативных CM Т-лимфоцитов.

Аналогичная картина наблюдалась в отношении CD4<sup>-</sup>CD45RA<sup>-</sup>CD197<sup>-</sup> эффекторных Т-клеток памяти (**Рисунок 29**).



**Рисунок 29.** Содержание (%) CD4-негативных EM T-клеток.

Вместе с тем, T-клеточная активация приводила к увеличению относительной численности в культуре  $CD4^+CD45RA^+CD197^-$  терминально дифференцированных T-клеток с 13,08 (11,25 – 15,70) % до 20,20 (16,73 – 21,95) %. G-CSF не влиял на этот процесс (**Рисунок 30**).



**Рисунок 30.** Содержание (%) CD4-негативных TEMRA T-клеток.

\*  $p < 0,05$  – в сравнении с пробой без T-клеточной активации;

Таким образом, основное влияние на динамику субпопуляционного состава оказывают активационные процессы, в частности они приводят к смещению соотношения CD4-позитивных и CD4-негативных популяций в сторону последних. G-

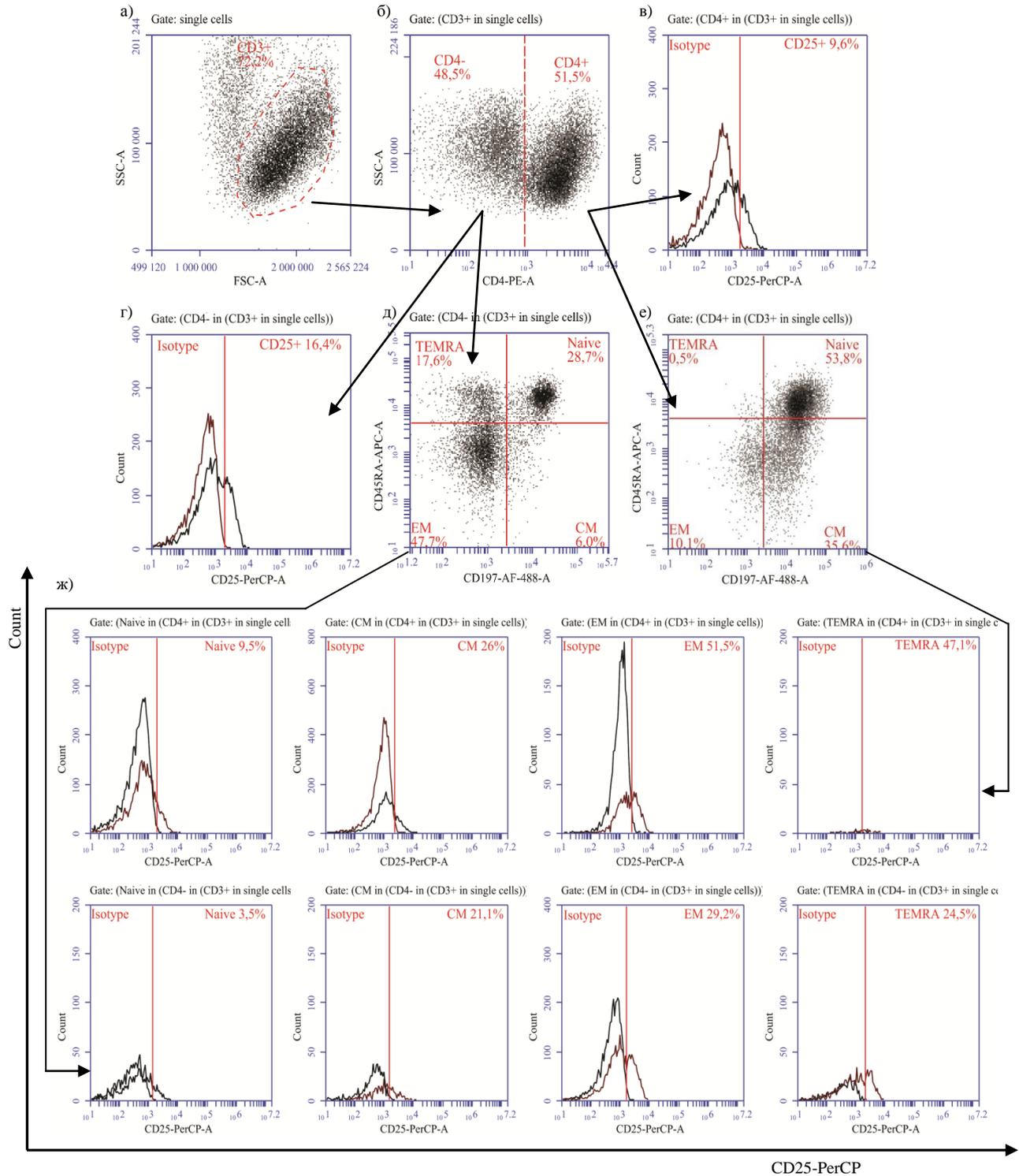
CSF, по-видимому, не способен существенно изменять субпопуляционный баланс Т-лимфоцитов, отвечающих на активационное воздействие.

### **3.3.3. Прямое влияние G-CSF на число CD25<sup>+</sup> и CD38<sup>+</sup> клеток в Т-клеточных субпопуляциях**

Оценку Т-клеточной активации проводили посредством определения числа клеток, несущих на своей поверхности характерные активационные маркеры CD25 и CD38. В качестве активатора лимфоцитов использовали частицы, конъюгированные с МКАТ CD2/CD3/CD28.

Молекула CD25 –  $\alpha$ -субъединица рецептора IL-2, через которую происходит запуск IL-2 зависимой пролиферации Т-лимфоцитов. Усиление экспрессия этой молекулы является общепризнанным фенотипическим признаком Т-клеточной активации (Литвинова Л.С., и др., 2014; Kuwabara T., et al., 2018; Seyfarth J., et al., 2019)

На **рисунке 31** Представлена стратегия гейтирования позволяющая оценить число CD25<sup>+</sup> Т-лимфоцитов в различных Т-клеточных субпопуляциях.



**Рисунок 31.** Алгоритм цитометрического анализа экспрессии CD25<sup>+</sup>Т-лимфоцитами.

а) прямое светорассеяние (FSC) против бокового светорассеяния (SSC);

б) идентификация CD4-негативных и CD4-позитивных Т-клеток;

в) окрашивание CD25<sup>+</sup> Т-клеток среди CD4-позитивных Т-клеток;

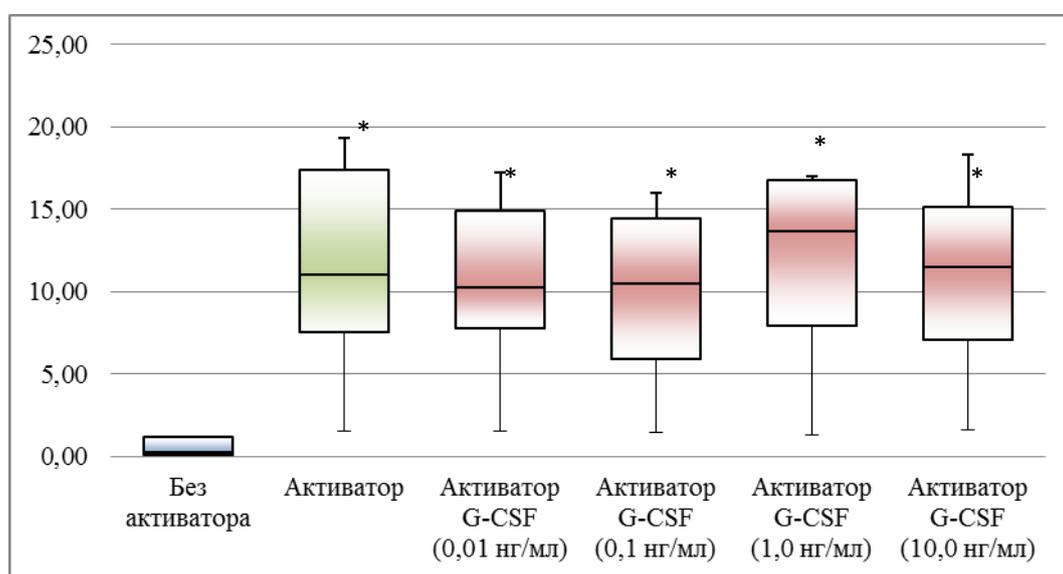
г) окрашивание CD25<sup>+</sup> Т-клеток среди CD4-негативных Т-клеток;

д) идентификация naïve Т-лимфоцитов, CM Т-лимфоцитов, EM Т-лимфоцитов и TEMRA Т-лимфоцитов среди CD4-негативных клеток по экспрессии молекул CD197 и CD45RA

е) идентификация naïve Т-лимфоцитов, CM Т-лимфоцитов, EM Т-лимфоцитов и TEMRA Т-лимфоцитов среди CD4-позитивных клеток по экспрессии молекул CD197 и CD45RA

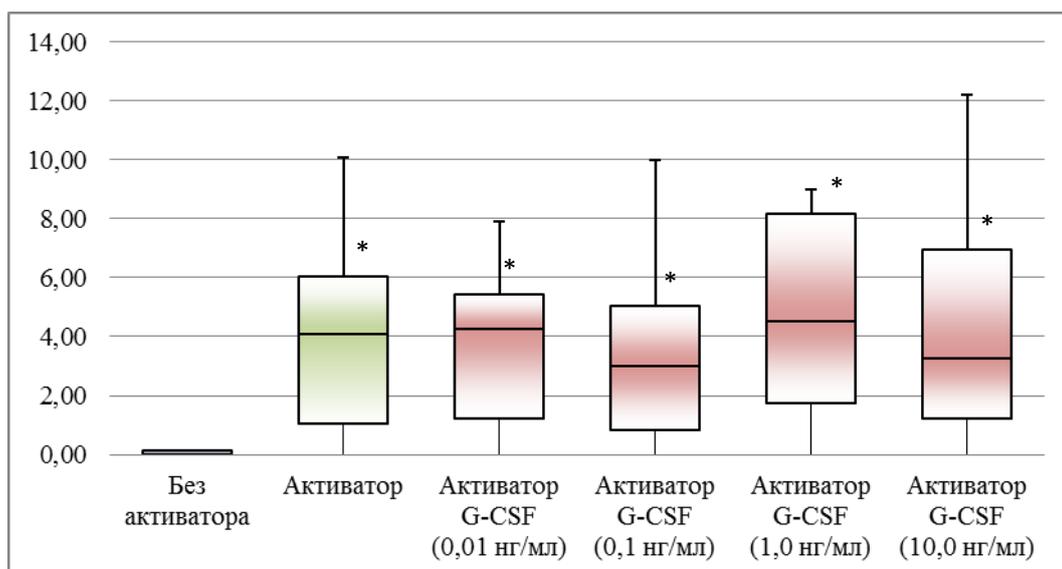
ж) содержание  $CD25^+$  лимфоцитов среди naïve Т-лимфоцитов, CM Т-лимфоцитов, EM Т-лимфоцитов и TEMRA Т-лимфоцитов в CD4-положительной и CD4-отрицательной Т-клеточных субпопуляциях.

В результате проведенного исследования выявлено, что G-CSF не оказывал значимого влияния на экспрессию молекулы CD25 на поверхности не активированных Т-лимфоцитов (данные не представлены). Как и следовало ожидать, Т-клеточная активация приводила к повышению относительного числа  $CD25^+$  клеток, среди субпопуляции CD4-положительных Т-лимфоцитов с 0,20 (0,08 – 1,15) % до 11,00 (7,50 – 17,35) %. Этот эффект не менялся в присутствии G-CSF (**Рисунок 32**).



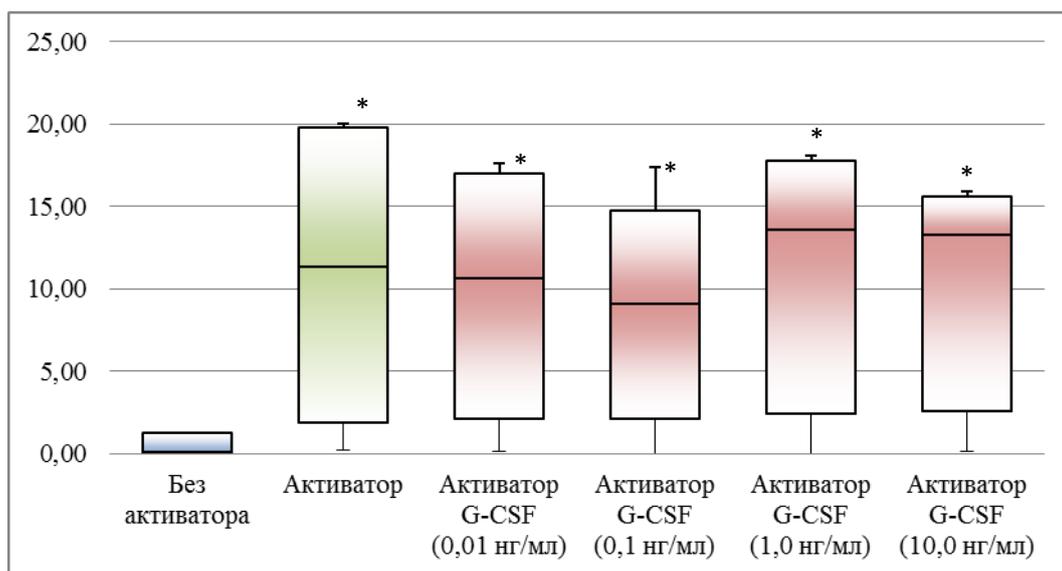
**Рисунок 32.** Содержание (%)  $CD25^+$  клеток среди CD4-положительных Т-лимфоцитов.  
\*  $p < 0,05$  – в сравнении с пробой без Т-клеточной активации.

Относительное число наивных  $CD4^+CD45RA^+CD197^+$  Т-лимфоцитов значимо возрастало в ответ на добавление активацию с 0,00 (0,00 – 0,13) % до 4,10 (1,05 – 6,05) %. Внесение G-CSF не оказывало существенного влияния на мембранную экспрессию молекулы CD25 (**Рисунок 33**).



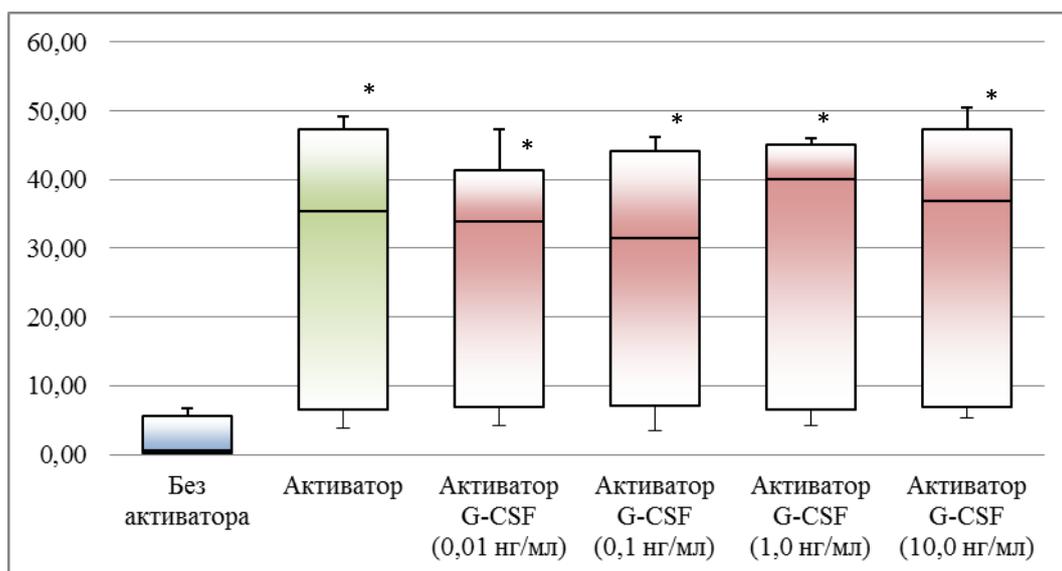
**Рисунок 33.** Содержание (%)  $CD25^+$  клеток среди  $CD4$ -положительных naïve Т-лимфоцитов  
\*  $p < 0,05$  – в сравнении с пробой без Т-клеточной активации.

Как показано **рисунке 34**, G-CSF не оказывал существенного влияния на ассоциированную с экспрессией CD25 активацию  $CD4^+CD45RA^-CD197^+$  центральных Т-клеток памяти.



**Рисунок 34.** Содержание (%)  $CD25^+$  клеток среди  $CD4$ -положительных CM Т-клеток.  
\*  $p < 0,05$  – в сравнении с пробой без Т-клеточной активации;

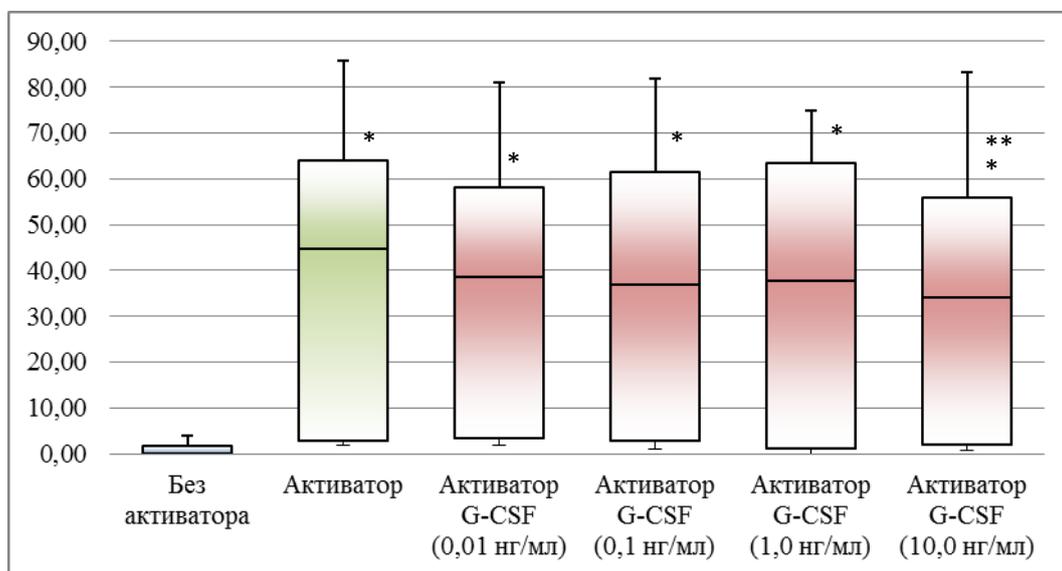
G-CSF также не оказывал значимых эффектов на содержание  $CD25^+$  в субпопуляции  $CD4^+CD45RA^-CD197^-$  эффекторных Т-клеток памяти (**Рисунок 35**).



**Рисунок 35.** Содержание (%)  $CD25^+$  клеток среди  $CD4$ -позитивных EM Т-клеток.

\*  $p < 0,05$  – в сравнении с пробой без Т-клеточной активации;

Как показано на **рисунок 36**, добавление G-CSF в максимальной концентрации (10,0 нг/мл) приводило к ослаблению активационного эффекта среди  $CD4$ -позитивных терминально дифференцированных Т-лимфоцитов, регистрируемого по числу  $CD25^+$ . В результате наблюдалось снижение до 34,15 (2,03 – 55,93) % относительно контрольной группы в присутствии активационного стимула.

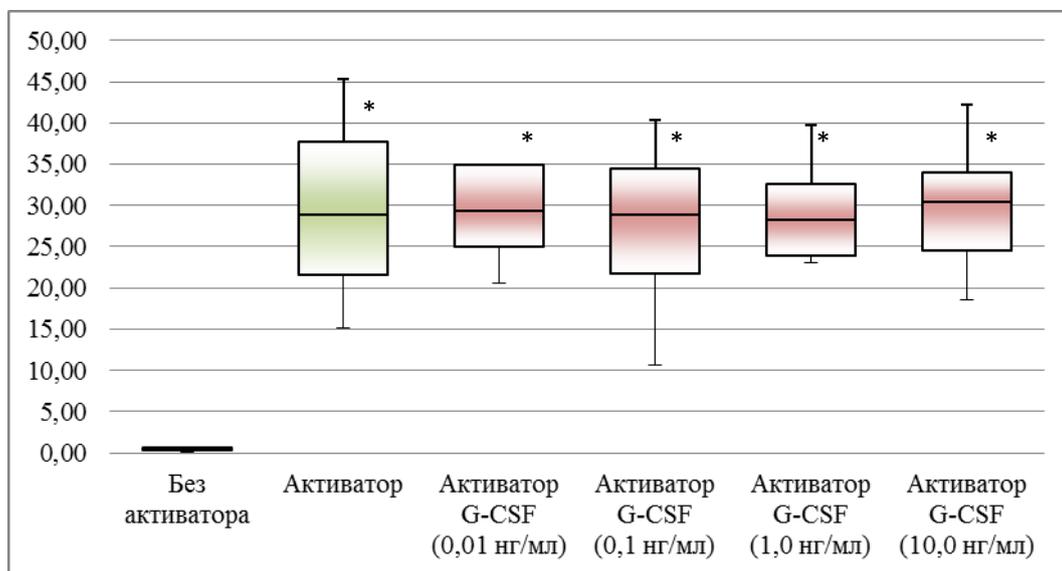


**Рисунок 36.** Содержание (%)  $CD25^+$  клеток среди  $CD4$ -позитивных TEMRA Т-клеток.

\*  $p < 0,05$  – в сравнении с пробой без Т-клеточной активации;

\*\*  $p < 0,05$  – в сравнении с пробой с Т-клеточной активацией без G-CSF.

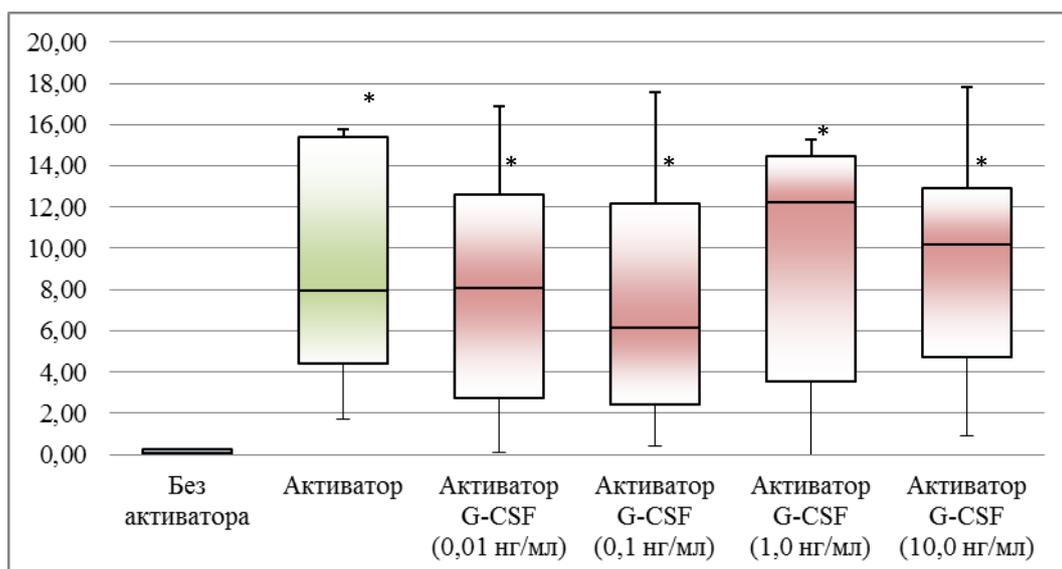
В субпопуляции CD4-негативных Т-лимфоцитов эффект активации был более выражен в сравнении с субпопуляцией CD4-позитивных клеток. Однако, и в этой субпопуляции эффекты G-CSF были незначительными (**Рисунок 37**).



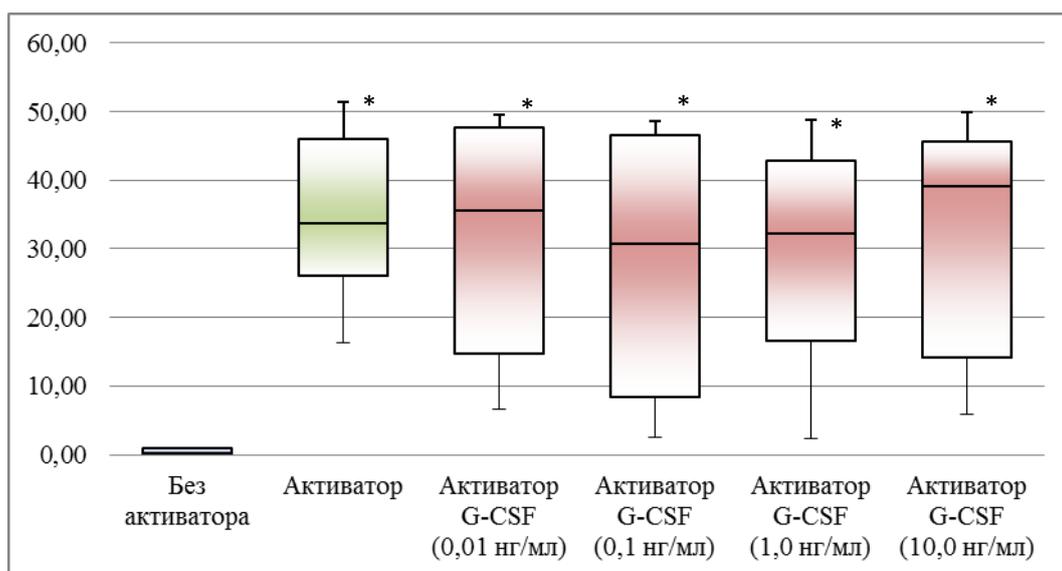
**Рисунок 37.** Содержание (%) CD25<sup>+</sup> клеток среди CD4-негативных Т-лимфоцитов.

\*  $p < 0,05$  – в сравнении с пробой без Т-клеточной активации.

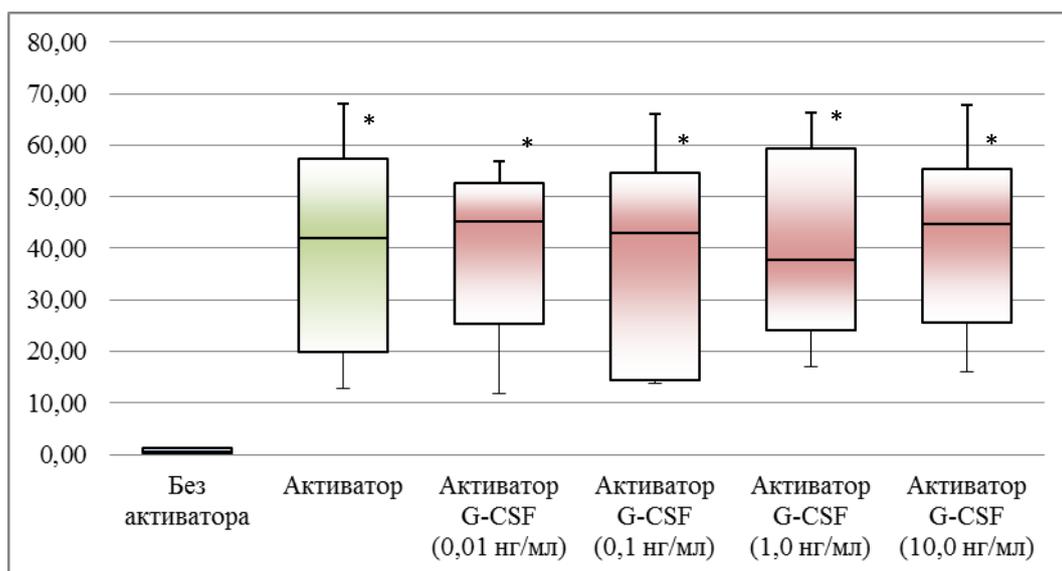
Как и в случае с CD4-позитивными Т-клетками, Т-клеточная активация приводила к увеличению относительного числа CD25<sup>+</sup> клеток во всех исследованных субпопуляциях. G-CSF не оказывал значимых эффектов на прирост численности CD25<sup>+</sup> клеток как среди наивных CD4-негативных Т-лимфоцитов (**рисунок 38**), так и среди CD4-негативных центральных (**рисунок 39**) и эффекторных (**рисунок 40**) Т-клеток памяти. Терминально дифференцированные CD4-негативные Т-клетки также оказались нечувствительными к действию G-CSF (**рисунок 41**).



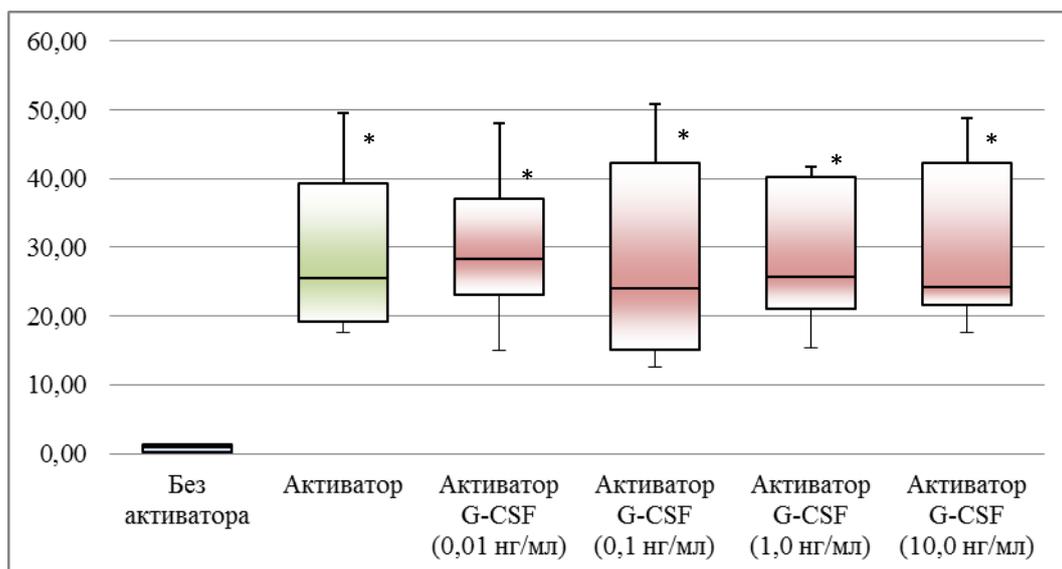
**Рисунок 38.** Содержание (%)  $CD25^+$  клеток среди  $CD4$ -негативных naïve Т-лимфоцитов  
\*  $p < 0,05$  – в сравнении с пробой без Т-клеточной активации;



**Рисунок 39.** Содержание (%)  $CD25^+$  клеток среди  $CD4$ -негативных CM Т-клеток.  
\*  $p < 0,05$  – в сравнении с пробой без Т-клеточной активации.



**Рисунок 40.** Содержание (%) CD25<sup>+</sup> клеток среди CD4-негативных EM Т-клеток.  
\* p<0,05 – в сравнении с пробой без Т-клеточной активации.

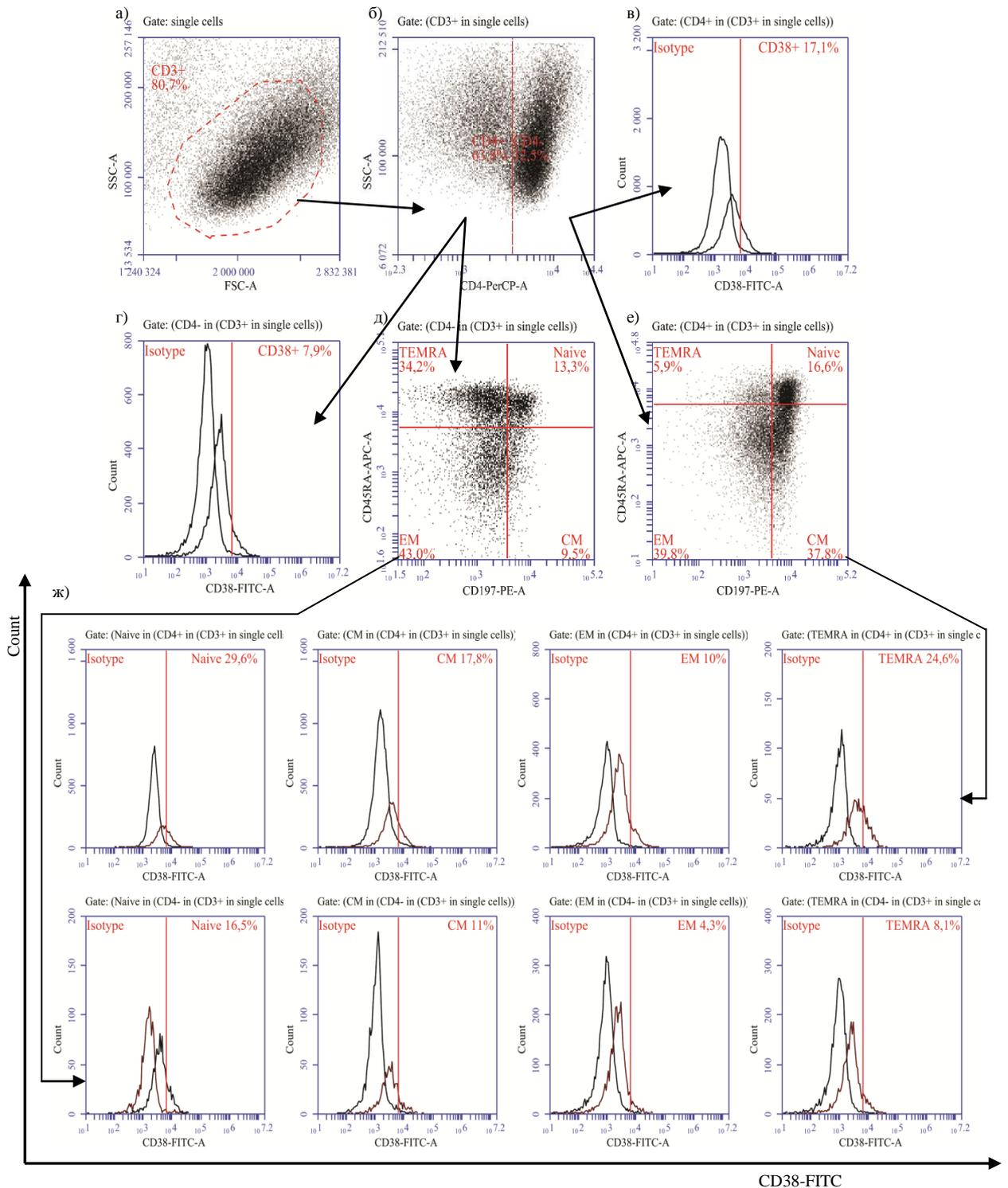


**Рисунок 41.** Содержание (%) CD25<sup>+</sup> клеток среди CD4-негативных TEMRA Т-клеток.  
\* p<0,05 – в сравнении с пробой без Т-клеточной активации.

Таким образом, G-CSF проявлял тенденцию к снижению активационных процессов у Т-лимфоцитов, что, однако, было статистически значимым только в субпопуляции CD4-позитивных терминально дифференцированных Т-клеток.

Молекула CD38 – циклическая ADP рибозогидролаза, опосредованно отвечающая за регуляцию концентрации внутриклеточного Ca<sup>2+</sup>. Эта молекула активно экспрессируется на зрелых Т-лимфоцитах, после их активации митогеном (Wiggins B.G., 2018).

На рисунке 42 Представлена стратегия гейтирования использованная для оценки числа  $CD38^+$  Т-лимфоцитов в различных Т-клеточных субпопуляциях.

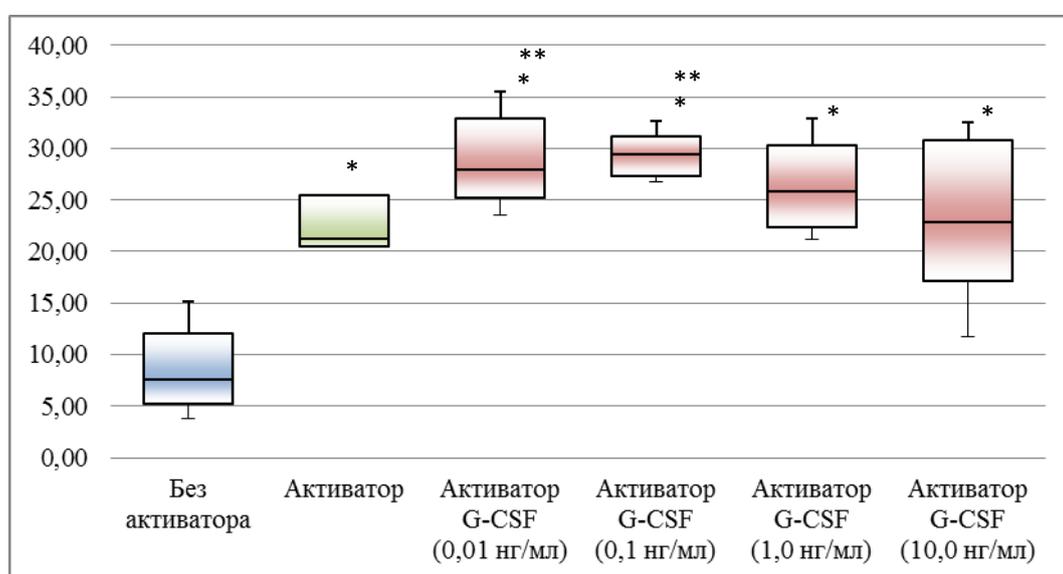


**Рисунок 42.** Алгоритм цитометрического анализа экспрессии  $CD38^+$  Т-лимфоцитами.

- а) прямое светорассеяние (FSC) против бокового светорассеяния (SSC);
- б) идентификация  $CD4^-$ -негативных и  $CD4^+$ -позитивных Т-клеток;
- в) окрашивание  $CD38^+$  Т-клеток среди  $CD4^+$ -позитивных Т-клеток;
- г) окрашивание  $CD38^+$  Т-клеток среди  $CD4^-$ -негативных Т-клеток;

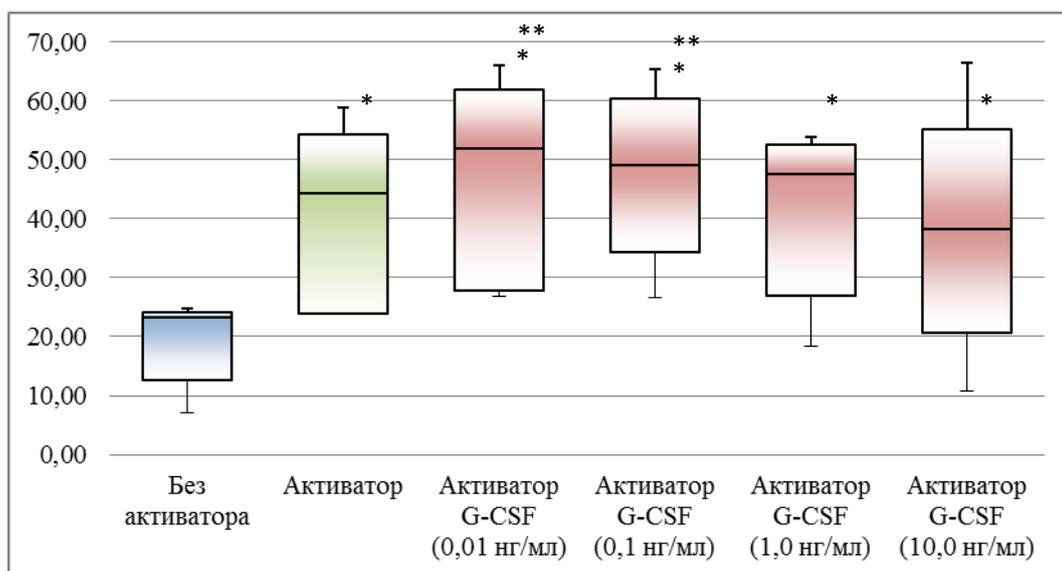
- д) идентификация naïve Т-лимфоцитов, СМ Т-лимфоцитов, ЕМ Т-лимфоцитов и ТЕМРА Т-лимфоцитов среди CD4-негативных клеток по экспрессии молекул CD197 и CD45RA
- е) идентификация naïve Т-лимфоцитов, СМ Т-лимфоцитов, ЕМ Т-лимфоцитов и ТЕМРА Т-лимфоцитов среди CD4-позитивных клеток по экспрессии молекул CD197 и CD45RA
- ж) содержание CD38<sup>+</sup> лимфоцитов среди naïve Т-лимфоцитов, СМ Т-лимфоцитов, ЕМ Т-лимфоцитов и ТЕМРА Т-лимфоцитов в CD4-позитивной и CD4-негативной Т-клеточных субпопуляциях.

Было установлено, что Т-клеточная активация приводила к существенному приросту CD38<sup>+</sup> клеток во всех исследованных Т-клеточных субпопуляциях с 7,60 (5,25 – 12,00) % до 21,20 (20,50 – 25,40) %. Внесение G-CSF в концентрациях 0,01 нг/мл и 0,1 нг/мл значимо усиливало этот прирост в CD4-позитивной Т-клеточной субпопуляции до 27,90 (25,15 – 32,95) % и 29,40 (27,30 – 31,15) % соответственно (**Рисунок 43**).



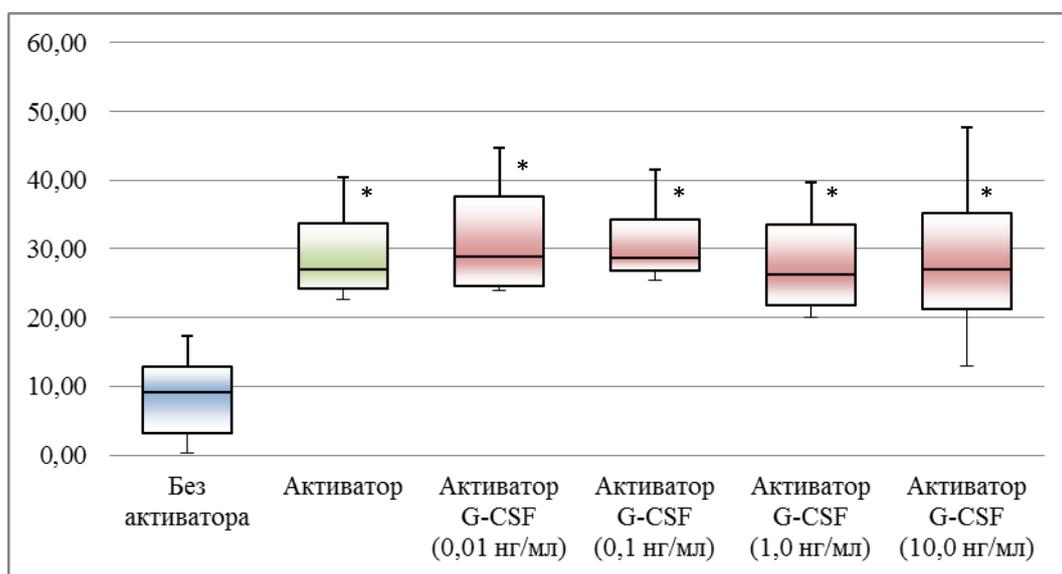
**Рисунок 43.** Содержание (%) CD38<sup>+</sup> клеток среди CD4-позитивных Т-лимфоцитов  
 \* p<0,05 – в сравнении с пробой без Т-клеточной активации;  
 \*\* p<0,05 – в сравнении с пробой с Т-клеточной активацией без G-CSF.

Добавление G-CSF (0,01 нг/мл и 0,1 нг/мл) в клеточную культуру приводило к значимому увеличению относительного числа CD38<sup>+</sup> клеток среди наивных CD4-позитивных Т-лимфоцитов с 44,3 (24,0 – 54,35) % до 51,9 (27,75 – 62,00) % и 49,2 (34,3 – 60,5) % соответственно (**Рисунок 44**).



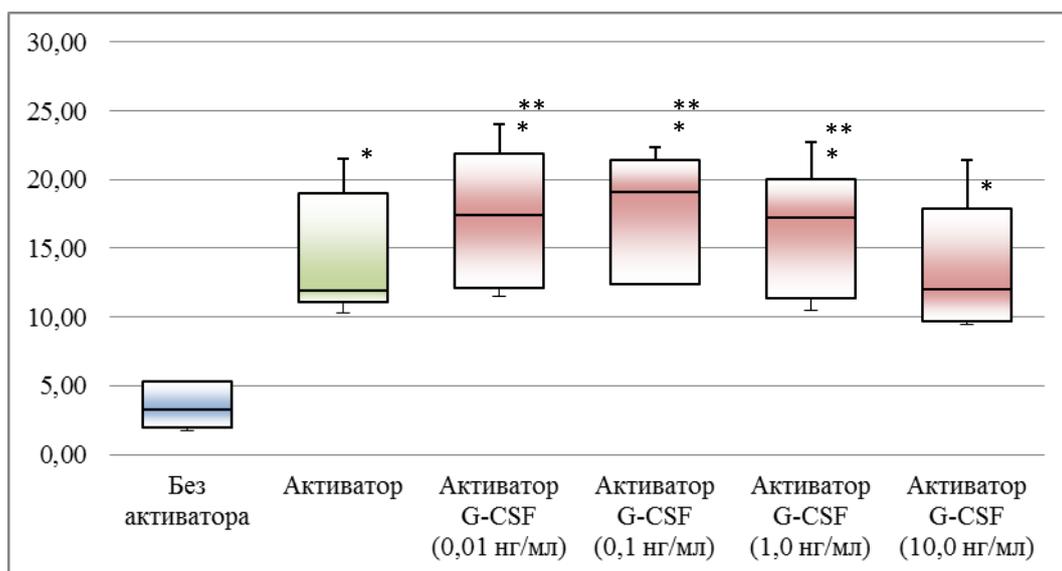
**Рисунок 44.** Содержание (%)  $CD38^+$  клеток среди  $CD4$ -положительных naïve Т-лимфоцитов  
 \*  $p < 0,05$  – в сравнении с пробой без Т-клеточной активации;  
 \*\*  $p < 0,05$  – в сравнении с пробой с Т-клеточной активацией без G-CSF.

В тоже время, G-CSF не оказывал значимого влияния на содержание  $CD38^+$  клеток среди  $CD4$ -положительных центральных Т-клеток памяти (**Рисунок 45**).



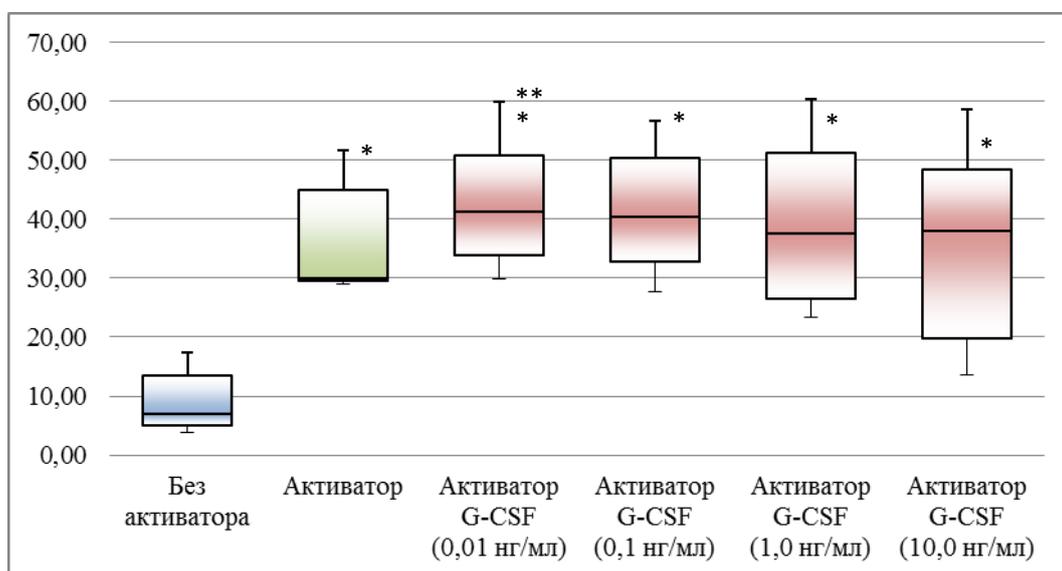
**Рисунок 45.** Содержание (%)  $CD38^+$  клеток среди  $CD4$ -положительных CM Т-клеток.  
 \*  $p < 0,05$  – в сравнении с пробой без Т-клеточной активации.

Установлено, что в концентрациях 0,01, 0,1 и 1,0 нг/мл G-CSF был способен усиливать индуцированный Т-клеточной активацией прирост  $CD38^+$  клеток в субпопуляции  $CD4$ -положительных эффекторных Т-клеток памяти с 11,90 (11,10 – 19,00) % до 17,40 (12,15 – 21,90) %, 19,10 (12,35 – 21,45) % и 17,20 (11,40 – 20,05) % соответственно (**Рисунок 46**).



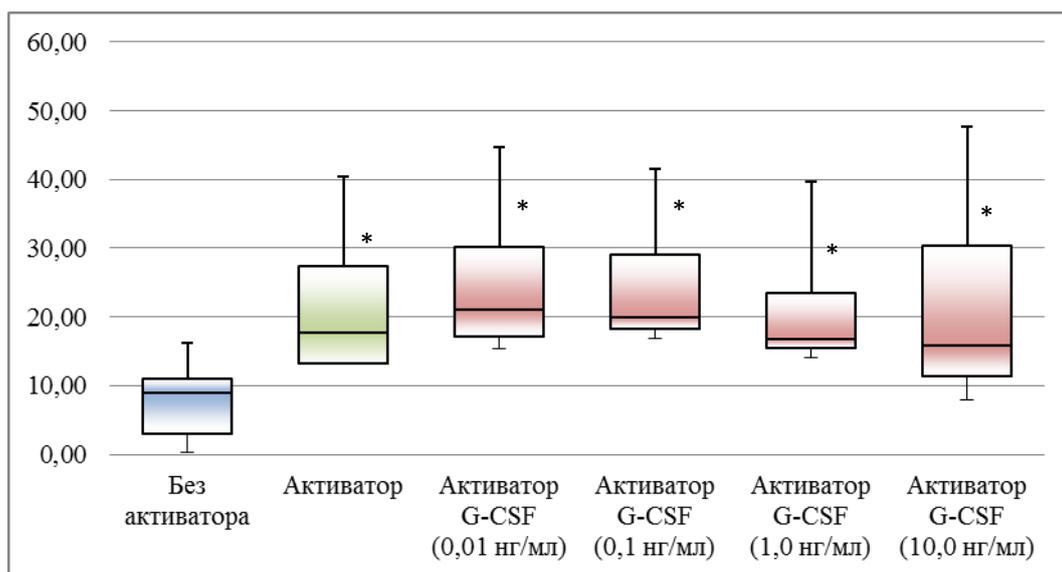
**Рисунок 46.** Содержание (%) CD38<sup>+</sup> клеток среди CD4-положительных EM T-клеток.  
 \* p<0,05 – в сравнении с пробой без T-клеточной активации;  
 \*\* p<0,05 – в сравнении с пробой с T-клеточной активацией без G-CSF.

В концентрации 0,01 нг/мл G-CSF также значительно увеличивал прирост CD38<sup>+</sup> клеток с 30,10 (29,55 – 44,90) % до 41,20 (34,00 – 50,95) % в субпопуляции CD4-положительных терминально дифференцированных T-клеток (**Рисунок 47**).

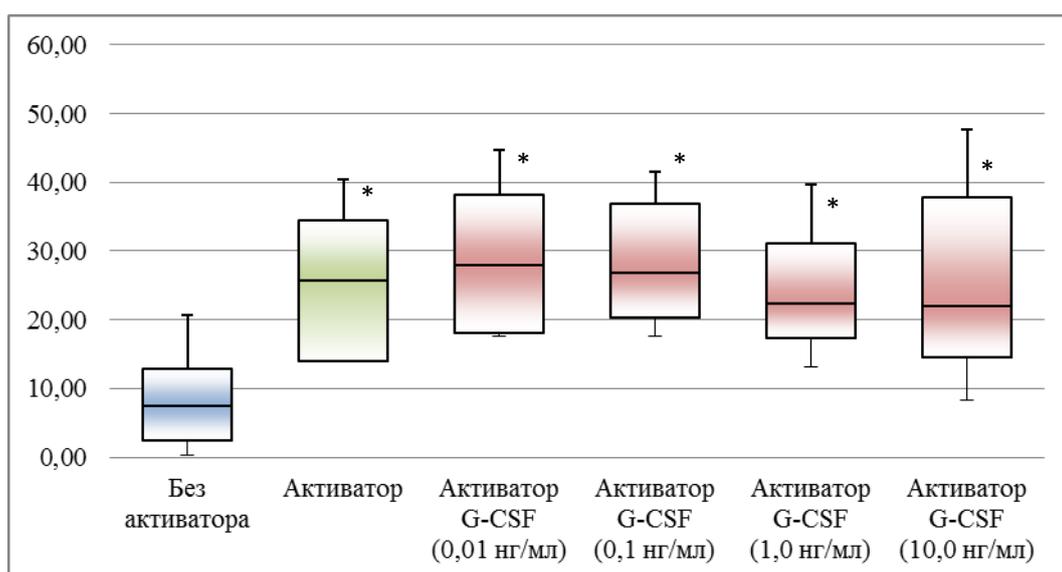


**Рисунок 47.** Содержание (%) CD38<sup>+</sup> клеток среди CD4-положительных TEMRA T-клеток.  
 \* p<0,05 – в сравнении с пробой без T-клеточной активации;  
 \*\* p<0,05 – в сравнении с пробой с T-клеточной активацией без G-CSF.

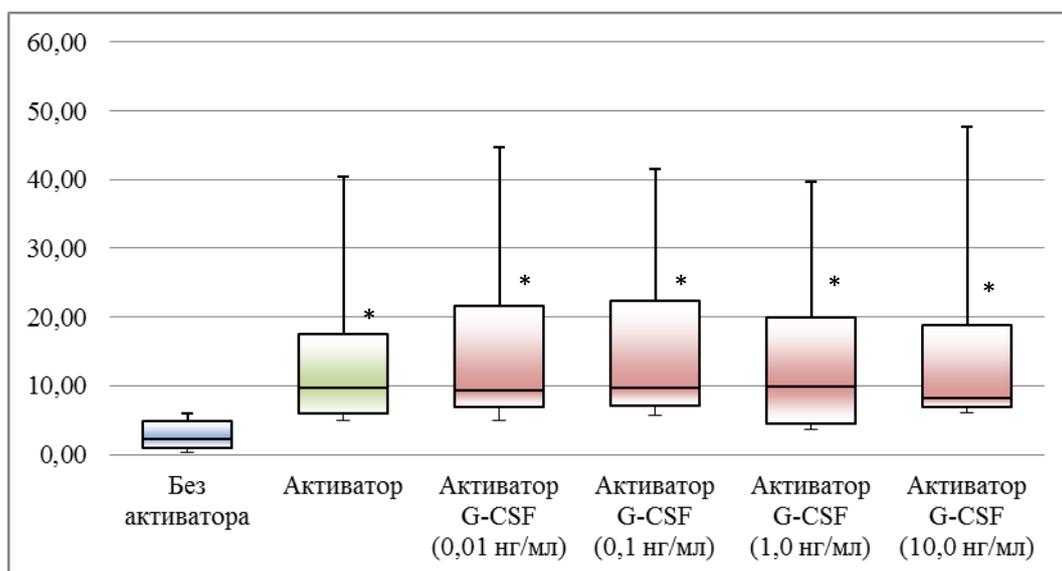
G-CSF в целом был не способен влиять на индуцированный активацией прирост CD38<sup>+</sup> клеток в субпопуляции CD4-негативных T-лимфоцитов (**Рисунок 48**) и, в частности, в субпопуляциях наивных T-клеток (**Рисунок 49**) и эффекторных T-клеток памяти (**Рисунок 50**).



**Рисунок 48.** Содержание (%)  $CD38^+$  клеток среди  $CD4$ -негативных Т-лимфоцитов.  
\*  $p < 0,05$  – в сравнении с пробой без Т-клеточной активации.

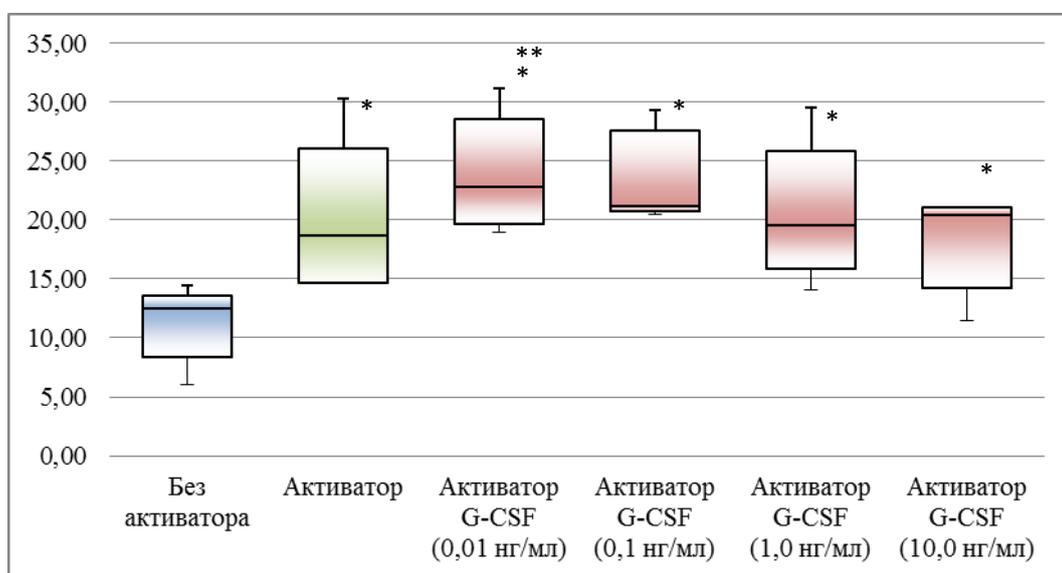


**Рисунок 49.** Содержание (%)  $CD38^+$  клеток среди  $CD4$ -негативных naïve Т-лимфоцитов.  
\*  $p < 0,05$  – в сравнении с пробой без Т-клеточной активации.

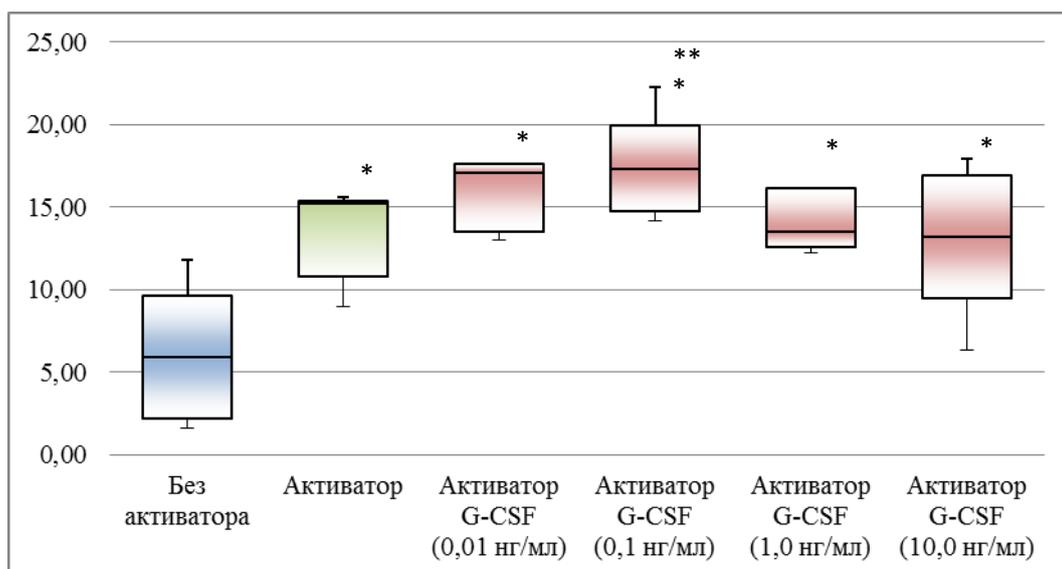


**Рисунок 50.** Содержание (%)  $CD38^+$  клеток среди  $CD4$ -негативных EM Т-клеток.  
\*  $p < 0,05$  – в сравнении с пробой без Т-клеточной активации.

Вместе с тем, G-CSF в концентрации 0,01 нг/мл заметно усиливал индуцированный прирост  $CD38^+$  клеток среди  $CD4$ -негативных центральных Т-клеток памяти с 18,70 (14,70 – 26,10) % до 22,80 (19,70 – 28,60) %. (**рисунок 51**), а в концентрации 0,1 нг/мл с 15,20 (10,80 – 15,40) % до 17,30 (14,75 – 19,95) % среди  $CD4$ -негативных терминально дифференцированных Т-клеток (**рисунок 52**).



**Рисунок 51.** Количество (%)  $CD38^+$  клеток среди  $CD4$ -негативных CM Т-клеток.  
\*  $p < 0,05$  – в сравнении с пробой без Т-клеточной активации;  
\*\*  $p < 0,05$  – в сравнении с пробой с Т-клеточной активацией без G-CSF.



**Рисунок 52.** Содержание (%) CD25<sup>+</sup> клеток среди CD4-негативных TEMRA Т-клеток.

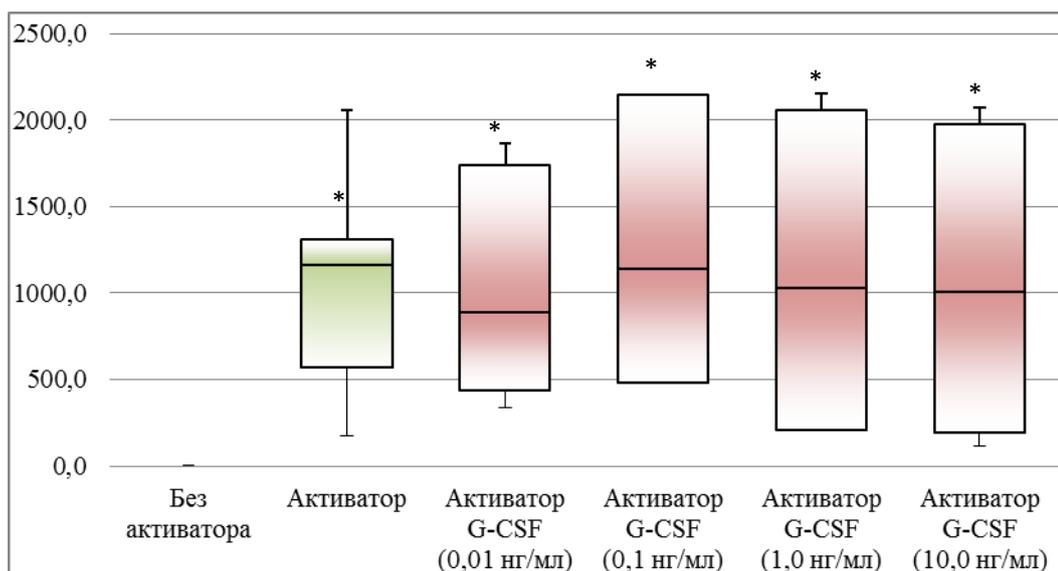
\* p<0,05 – в сравнении с пробой без Т-клеточной активации;

\*\* p<0,05 – в сравнении с пробой с Т-клеточной активации без G-CSF.

Таким образом, на фоне повышения числа CD38-позитивных лимфоцитов в результате активации, наблюдался дополнительный стимулирующий эффект, обусловленный добавлением G-CSF. Наиболее выражено этот эффект проявился в субпопуляциях CD4-позитивных Т-лимфоцитов. Среди субпопуляций CD4-негативных Т-лимфоцитов, только центральные Т-клетки памяти и терминально дифференцированные Т-клеточные эффекторы оказались чувствительными к действию G-CSF.

### 3.3.4. Влияние G-CSF на продукцию Т-лимфоцитами про- и противовоспалительных цитокинов

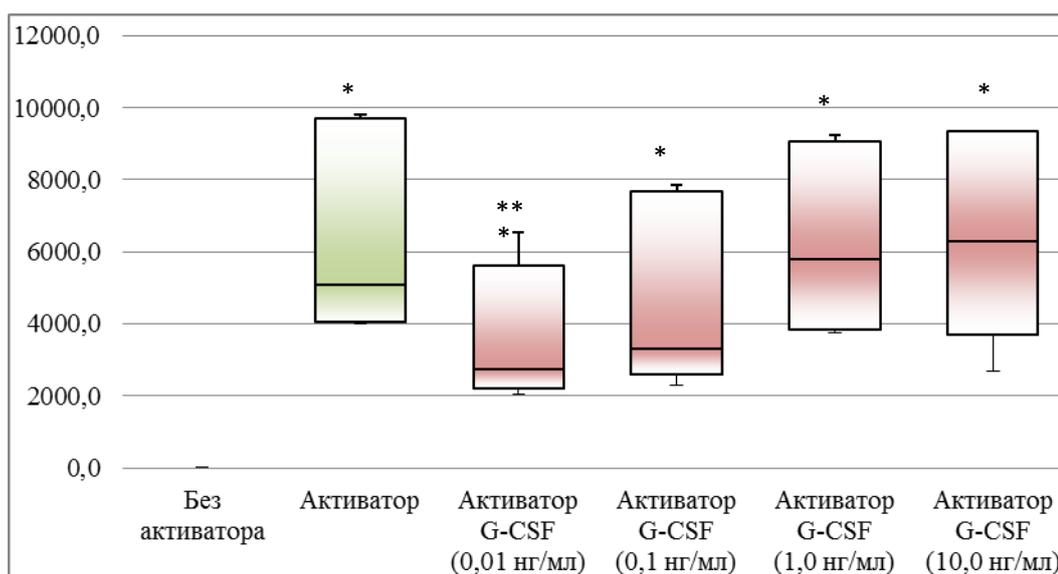
IL-2 отвечает за активацию и пролиферацию Т-лимфоцитов (Yong C., 2017). В дополнение к этому он играет важную роль в процессах Т-клеточной дифференцировки (Ross S.H., Cantrell D.A., 2018). Активация Т-лимфоцитов стимулирует продукцию IL-2. В наших исследованиях, G-CSF не оказывал значимого влияния на секрецию IL-2 активированными Т-клетками (**Рисунок 53**).



**Рисунок 53.** Содержание IL-2 (пг/мл) в Т-клеточных супернатантах.

\*  $p < 0,05$  – в сравнении с пробой без Т-клеточной активации;

IFN- $\gamma$  относится к интерферонам II-го типа, являясь ключевым звеном в противовирусном иммунитете; он индуцирует классическую активацию Мф и индуцирует экспрессию продуктов МНС II класса. Активными продуцентами IFN- $\gamma$  являются CD4 Th1-клетки, CTL, НК-клетки и NKT-клетки (Negishi H., et al., 2018; Parker V.S., et al., 2016). Как и ожидалось, Активация Т-клеток стимулировала секрецию IFN- $\gamma$ . Данные, представленные на **рисунке 54**, свидетельствуют, что G-CSF в концентрации 0,01 нг/мл обладал способностью значимо снижать продукцию IFN- $\gamma$  с 5094,0 (4039,8 – 9688,0) пг/мл до 2743,0 (2190,0 – 5630,0) пг/мл.

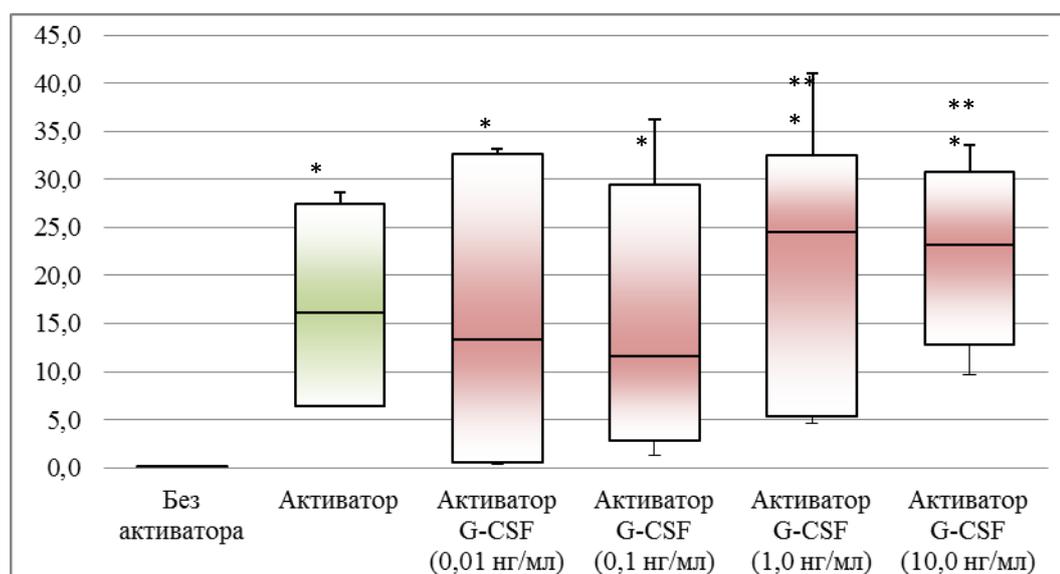


**Рисунок 54.** Содержание INF- $\gamma$  (пг/мл) в Т-клеточных супернатантах.

\*  $p < 0,05$  – в сравнении с пробой без Т-клеточной активации;

\*\*  $p < 0,05$  – в сравнении с пробой с Т-клеточной активации без G-CSF.

IL-4 – противовоспалительный цитокин, который продуцируется преимущественно Th2-клетками. Он способен индуцировать альтернативную активацию Мф (Van Dyken S.J., Locksley R.M., 2013), а также подавлять провоспалительную активность Th1 клеток и Мф (Zhu J., 2015). Как показано на **рисунке 55** Т-клеточная активация индуцировала продукцию IL-4. Добавление G-CSF в концентрации 1,0 нг/мл и 10,0 нг/мл приводило к усилению продукции IL-4 активированными Т-лимфоцитами (с 16,1 (6,4 – 27,5) пг/мл до 24,5 (5,4 – 32,6) пг/мл и 23,2 (12,8 – 30,8) пг/мл соответственно).

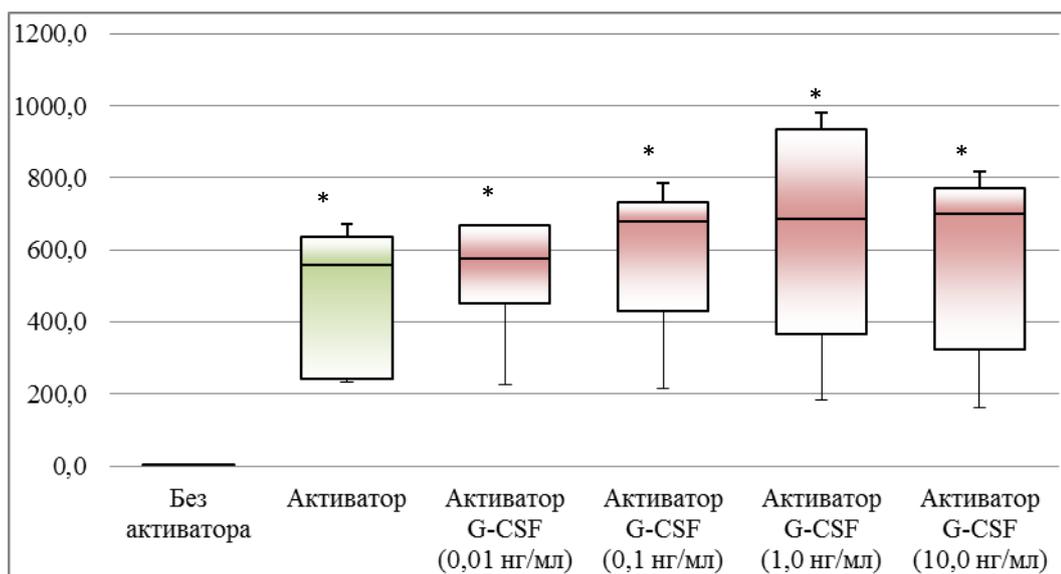


**Рисунок 55.** Содержание IL-4 (пг/мл) в Т-клеточных супернатантах.

\*  $p < 0,05$  – в сравнении с пробой без Т-клеточной активации;

\*\*  $p < 0,05$  – в сравнении с пробой с Т-клеточной активации без G-CSF.

IL-10 является иммуносупрессорным цитокином, снижающим продукцию цитокинов Т-хелперов 1-го типа (Zarour H.M., 2016; Perobelli S.M., et al., 2016; Ouyang W., O'Garra A., 2019). Как показано на **рисунке 56**, активация Т-лимфоцитов стимулировала продукцию IL-10. В наших экспериментах активированные Т-лимфоциты под влиянием G-CSF продемонстрировали тенденцию к дополнительному усилению продукции IL-10 (с 556,5 (242,4 – 635,5) пг/мл до 701,4 (322,2 – 769,5) пг/мл), но эта тенденция не подтверждалась статистической достоверностью.



**Рисунок 56.** Содержание IL-10 (пг/мл) в Т-клеточных супернатантах.

\*  $p < 0,05$  – в сравнении с пробой без Т-клеточной активации;

\*\*  $p < 0,05$  – в сравнении с Т-клеточной активацией без G-CSF.

Таким образом G-CSF может быть вовлечен в регуляцию Т-клеточной продукции как про-, так и противовоспалительных цитокинов.

#### ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Опосредованное G-CSF усиление лейкоцитопоза является универсальной адаптивной реакцией не только на инфекции, но и на любые нарушения целостности органов и тканей организма. Отсюда следует, что начальные, наиболее чувствительные к иммуномодулирующим воздействиям этапы адаптивного иммунного ответа развиваются, как правило, на фоне повышенных концентраций G-CSF в клеточном микроокружении. Одним из ключевых моментов в запуске адаптивного иммунного ответа является контакт между АПК и Т-лимфоцитом. В сравнении с первичным иммунным ответом, вторичный иммунный ответ имеет более выраженный характер. (Селедцов В.И., и др., 2010). В процессе формирования вторичного иммунного ответа в презентацию антигенных молекул активно вовлекаются макрофагальные клетки. После встречи с патогеном АПК активно мигрируют в Т-зависимые зоны лимфоидных органов для (Ярилин А.А., 2010; Kambayashi T., Laufer T.M., 2014). Такая клеточная миграция в значительной степени определяет активность как врожденного, так и адаптивного иммунитета.

Ранее в литературе была описана экспрессия G-CSFR на поверхности Мц/Мф (Hollmén M., et al., 2016). Так же стоит отметить тот факт, что ЛПС индуцирует продукцию G-CSF клетками эндотелия (Vinzens S., et al., 2017; Rizzo M.D., et al., 2019). Эти факты предполагают значимость этого цитокина в регуляции иммунных реакций на периферии.

Молекула CD16 (FcγRIII) обеспечивает вовлечение иммунокомпетентных клеток, в частности, Мц/Мф в процесс антителозависимой цитотоксичности (Yeap W.H., et al., 2016). В наших исследованиях не было выявлено статистически значимого изменения относительного количества CD16<sup>+</sup> Мц/Мф в ответ на активационный стимул, тогда как добавление G-CSF к активируемым макрофагальным клеткам приводило к статистически значимому снижению относительного числа CD16<sup>+</sup> клеток. В ответ на активацию часть классических Мц/Мф (CD14<sub>high</sub> CD16<sup>-</sup>), основной функцией которых является фагоцитоз (Jakubzick C.V., et al., 2017), дифференцируются в переходные CD14<sub>high</sub> CD16<sub>low</sub>, а в дальнейшем в классические CD14<sub>low</sub> CD16<sub>high</sub>, также известные как CD14<sub>dim</sub> CD16<sub>high</sub> Мф, в большей степени специализированные на развитии

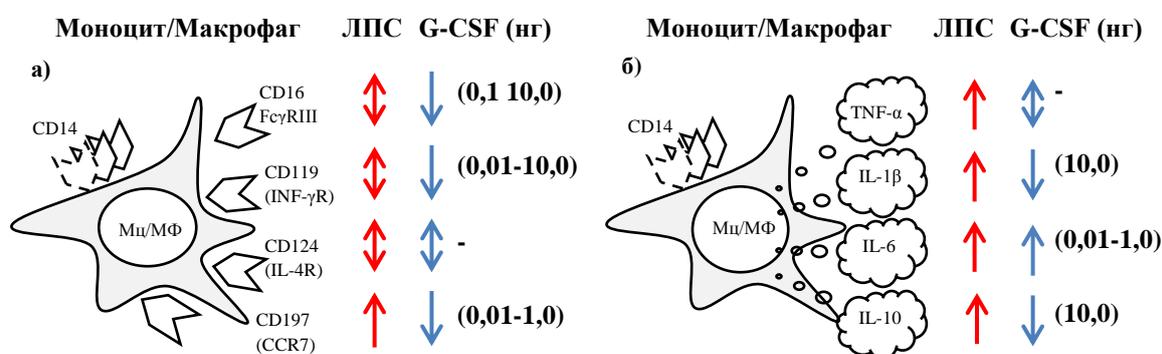
воспалительных реакций (Cros J., et al., 2010). Таким образом, можно предполагать, что на этапе формирования переходных CD14<sub>high</sub> CD16<sub>low</sub> макрофагов, G-CSF способен сдерживать их про-воспалительную дифференцировку.

Процесс макрофагальной активации в значительной степени определяется экспрессией на их поверхности рецептора IFN- $\gamma$  (CD119) и рецептора IL-4 (CD124). Согласно нашим данным, G-CSF способен снижать относительное количество CD119<sup>+</sup> клеток, и, таким образом снижать чувствительность суммарного пула макрофагальных клеток к действию INF- $\gamma$ . Интересно, что при этом G-CSF не оказывал негативного влияния на количество CD124<sup>+</sup> клеток, тем самым, сохраняя чувствительность Мф к противовоспалительному действию IL-4. Из этих данных следует, что G-CSF может способствовать альтернативной, противовоспалительной активации Мф за счет изменения баланса чувствительности к про и противовоспалительным цитокинам.

Известно, что классическая макрофагальная активация характеризуется повышением экспрессии CD197 (CCR7) – хемокинового рецептора, обеспечивающего миграцию клеток в лимфоидную ткань и их последующее вовлечение в адаптивный иммуногенез (Zhang Z. et al., 2011). В наших экспериментах, под действием активационного стимула наблюдалось повышение экспрессии молекулы CCR7. Интересно, что добавление G-CSF к активируемым Мф приводило к статистически значимому снижению относительного числа CD197<sup>+</sup> клеток. Таким образом, G-CSF способен снижать миграционный потенциал контактировавших с антигеном макрофагальных клеток относительно лимфоидной ткани и, тем самым, сдерживать развитие адаптивных иммунных процессов. В свете полученных данных можно предполагать, что G-CSF играет значимую роль в иммунорегуляторных механизмах, предотвращающих развитие иммунных реакций на антигенные “шумы”, которые не представляют угрозы для организма, но при высокой чувствительности иммунной системы к их действию могут разбалансировать иммунную защиту.

Ранее было показано, что G-CSF, системно вводимый человеку, снижал продукцию TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-12 и IFN- $\gamma$  МНК (Carr M.J., et al., 2017). В своих экспериментах мы не наблюдали под действием G-CSF статистически значимого снижения продукции TNF- $\alpha$  активированными Мц/Мф. В то же время G-CSF в максимальной концентрации приводил к статистически значимому снижению продукции IL-1beta. Возможно, что в описанных ранее данных снижение продукции

провоспалительных цитокинов имело опосредованный характер, обусловленный снижением продукции IFN- $\gamma$  Т-лимфоцитами. Стоит отметить, что при прямом воздействии G-CSF на Мц/Мф увеличивалась продукция IL-6. Это цитокин, активно продуцируемый разными типами клеток, участвующий как в воспалительных и противоинфекционных ответах, так и в регуляции метаболических, а также регенеративных процессов (Scheller J., et al. 2011). Усиление продукции IL-6 Мц/Мф могло бы, по-видимому, так же способствовать формированию условий благоприятных для развития противовоспалительных реакций. В тоже время в концентрациях 0,01, 0,1 и 1,0 нг G-CSF не оказывал значимого влияния на продукцию IL-10 активированными Мф, однако при максимальной концентрации гемопоэтина наблюдалось статистически значимое снижение продукции этого цитокина (**Рисунок 57**).



**Рисунок 57.** Влияние процессов активации и G-CSF (нг/мл) на Мц/Мф

а) Общая популяция Мц/Мф

б) Продукция цитокинов Мц/Мф

Обозначения:

↑↓ - статистически значимые изменения

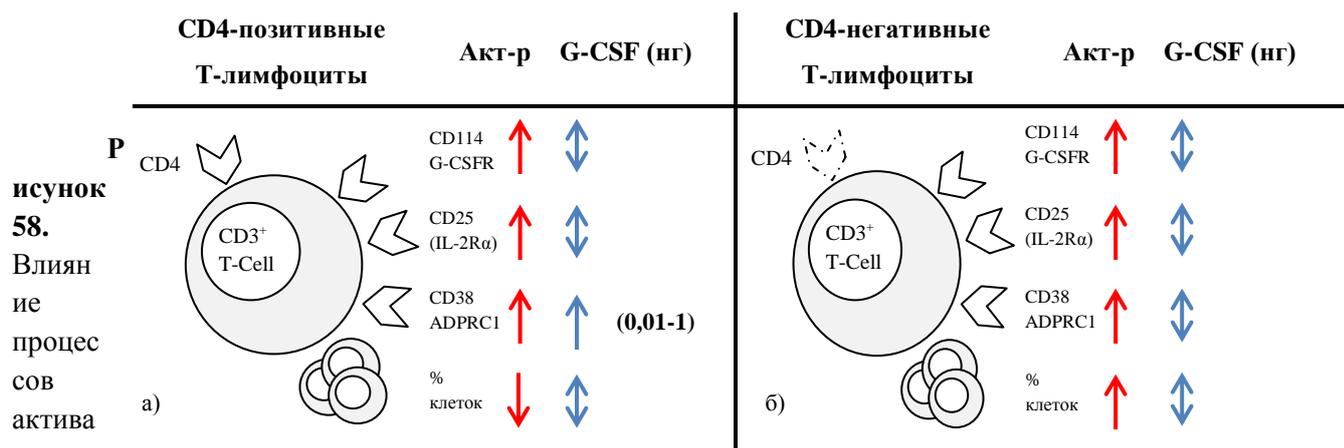
↕ - отсутствие изменений

Таким образом, G-CSF стимулирует дополнительную выработку IL-6, активированными Мц/Мф, а в максимальной концентрации, способствует снижению производства некоторых как про-, так и противовоспалительных цитокинов. Такой разнонаправленный эффект возможно обусловлен гетерогенностью популяции Мц/Мф. Однако, в целом, среди G-CSF обусловленных эффектов преобладают эффекты противовоспалительной направленности.

В настоящее время, G-CSF активно применяется в регенеративной медицине. Репаративные эффекты этого гемопоэтина связывают преимущественно с мобилизацией и вовлечением стволовых и низкодифференцированных клеток в процессы тканевого

морфогенеза. На основании представленных данных можно предположить, что опосредованная G-CSF модуляция активности Мц/Мф так же может вносить значимый вклад в репаративные процессы.

Основное влияние на динамику субпопуляционного состава Т-лимфоцитов оказывают активационные процессы, в частности они приводят к смещению соотношения CD4-позитивных и CD4-негативных популяций, в сторону последних. В то же время добавление G-CSF не оказывало значимого влияния на этот процесс. Согласно нашим данным, экспрессия G-CSFR носит индуцибельный характер, что соответствует литературным данным (Bunse С.Е., et al., 2016). Добавление G-CSF к активированным Т-лимфоцитам не приводило к статистически значимым изменениям числа CD25<sup>+</sup> клеток. Это говорит об отсутствии прямого влияния гемопоетина на CD25-зависимые Т-клеточные процессы и, в частности, на пролиферативную активность Т-клеток. С другой стороны, функциональная активность Т-клеток также связана с другим активационным маркером CD38 (гликозилированным мембранным белком с эффектами эктонуклеотидазы), который обладает свойствами рецептора и эктофермента, участвующего как во внутриклеточном сигнальном гомеостазе, так и во внеклеточной связи между иммунными клетками различного происхождения (Qian Y., et al., 2018). Активность CD38 аналогична активности, проявляемой ADP-рибозилциклазой (Quarona V., et al., 2013) (он опосредует синтез аденозиндифосфат рибозы (ADPR) и циклического ADPR из никотинамидадениндинуклеотида), который необходим для мобилизации цитозольного кальция из внутриклеточных депо (Okamoto H., et al., 2017). CD38 играет также важную роль в поддержании адгезии и трафика лимфоцитов по эндотелию с помощью CD31-зависимого механизма (Villegas-Ospina S., et al., 2017). Важным представляется то, что высокий уровень экспрессии CD38 на Т-клетках может ассоциироваться с их низкой пролиферативной активностью и высоким уровнем продукции ими IL-2 и IFN- $\gamma$  (Seledtsov V.I., Seledtsova G.V., 2012; MacDonald R.J., et al. 2017). В наших экспериментах, для CD4-позитивных Т-лимфоцитов продемонстрировано увеличение числа CD38<sup>+</sup> клеток в культурах активированных Т-лимфоцитов с добавлением G-CSF, что говорит об увеличении функциональной активности этих клеток. В то же время активация приводила к некоторому статистически значимому уменьшению относительного числа CD4- позитивных Т-лимфоцитов, однако, роль G-CSF в этом процессе была не значима (**Рисунок 58**).



G-CSF (нг/мл) на Т-лимфоциты

а) Субпопуляция CD4-позитивных Т-лимфоцитов

б) Субпопуляция CD4-негативных Т-лимфоцитов

Обозначения:

↑↓ - статистически значимые изменения

↕ - отсутствие изменений

**Рисунок 59** отражает данные, характеризующие непосредственное влияние G-CSF на активацию наивных Т-клеток, центральных и эффекторных Т-клеток памяти, а также терминально дифференцированных Т-клеточных эффекторов. Наивные Т-лимфоциты – это клетки прошедшие антигеннезависимую дифференцировку в тимусе, но не прошедшие антигензависимую дифференцировку во вторичных лимфоидных органах. Они являются активными продуцентами IL-2. В наших экспериментах среди наивных CD4-позитивных Т-лимфоцитов наблюдалось увеличение числа CD114<sup>+</sup> клеток в ответ на активационный стимул. G-CSF не оказывал влияния на этот процесс. Похожая ситуация складывалась и с числом CD25-позитивных клеток. В тоже время относительное число CD38<sup>+</sup> Т-лимфоцитов дополнительно увеличивалось в ответ на добавление G-CSF, а относительная численность субпопуляции наивных Т-лимфоцитов снижалась. Таким образом, G-CSF не оказывал влияния на CD25-опосредованную пролиферативную активность наивных Т-лимфоцитов, но увеличивал их функциональную активность и скорее всего, способствовал их дифференцировке в более зрелые формы (**Рисунок 59 б**).

Центральные Т-клетки памяти в отличие от наивных клеток уже прошли антигензависимую дифференцировку во вторичных лимфоидных органах, но еще сохраняют молекулу CD197 на своей поверхности. Они характеризуются высоким уровнем продукции IL-2, а также в моделях *in vitro* показывают наиболее выраженный

ответ на активацию (Nielsen B.R. et al, 2017). CD4-позитивные центральные Т-клетки памяти характеризуются наиболее выраженной способностью к гомеостатической пролиферации (Tian Y., et al., 2017) и считаются наиболее долгоживущей популяцией Т-лимфоцитов (Orata M.M., et al., 2018). В нашей работе показано, что в пуле центральных Т-клеток памяти в ответ на активационный стимул увеличивалось число CD114, CD25 и CD38 позитивных клеток. G-CSF обладал способностью увеличивать число CD114<sup>+</sup> клеток среди Т-клеток центральной памяти (**Рисунок 59 г**).

Субпопуляция CD4-позитивных эффекторных Т-клеток памяти включает в себя продуцентов как IFN- $\gamma$ , так и IL-4 (Tompa A., et al., 2018). Эта группа также характеризуется высоким уровнем экспрессии поверхностных маркеров, отвечающих за миграцию клеток в очаг воспаления: рецепторов хемокинов CCR5, CCR6 и CXCR3, а также молекул адгезии CD11a, CD11c, CD18, CD29 и др. (Cossarizza A., et al., 2017). В наших экспериментах для CD4-позитивных эффекторных Т-клеток памяти продемонстрирована сходная с CD4-позитивными центральными Т-клетками памяти реакция на активационный стимул. Однако выявлено более значительное увеличение CD38<sup>+</sup> Т-лимфоцитов в ответ на G-CSF в широком спектре доз. Таким образом, G-CSF оказывает преимущественное влияние на более коротко живущие, но функционально более значимые эффекторные Т-клетки памяти (**Рисунок 59 в**).

Как известно, CD4-позитивные терминально дифференцированные Т-клеточные эффекторы чувствительны к влиянию IL-6, IL-8, IL-12, IL-18 и других провоспалительных цитокинов продуцируемых Мц/Мф (Larkin B., et al., 2017). В наших экспериментах среди терминально дифференцированных Т-клеток в ответ на G-CSF наблюдалось увеличение как CD114, так и CD38 положительных лимфоцитов. В тоже время число CD25-позитивных клеток статистически не изменялось. Вероятно, это говорит об усилении функциональной активности терминально дифференцированных Т-клеток в результате прямого воздействия G-CSF (**Рисунок 59 а**). Хочется отметить, что G-CSF в дополнении к прямым эффектам направленным на эту клеточную субпопуляцию *in vivo* будет оказывать и опосредованное влияние, обусловленное усилением продукции IL-6 Мц/Мф.

Р и с у н о к 5 9 .	CD4-позитивные Т-лимфоциты			Акт-р	G-CSF (нг)	CD4-позитивные Т-лимфоциты			
	а)	б)	в)			г)			
	CD4	CD4	CD4		+	CD4	CD4	CD4	+
	CD3 <sup>+</sup> T-Cell	CD3 <sup>+</sup> T-Cell	CD3 <sup>+</sup> T-Cell			CD3 <sup>+</sup> T-Cell	CD3 <sup>+</sup> T-Cell	CD3 <sup>+</sup> T-Cell	
	CD114 G-CSFR	CD114 G-CSFR	CD114 G-CSFR	↑↓	↑	CD114 G-CSFR	CD114 G-CSFR	CD114 G-CSFR	↑
	CD25 (IL-2Rα)	CD25 (IL-2Rα)	CD25 (IL-2Rα)	↑	↓	CD25 (IL-2Rα)	CD25 (IL-2Rα)	CD25 (IL-2Rα)	↑
	CD38 ADPRC1	CD38 ADPRC1	CD38 ADPRC1	↑	↑	CD38 ADPRC1	CD38 ADPRC1	CD38 ADPRC1	↑
	% клеток	% клеток	% клеток	↑↓	↑↓	% клеток	% клеток	% клеток	↑
	(10,0)	(0,01)	(0,01-1,0)			(0,01-0,1)	(1,0)	(0,01-0,1)	

П

роцессов активации и G-CSF (нг/мл) на CD4-позитивные Т-лимфоциты

а) Субпопуляция TEMRA Т-лимфоцитов

б) Субпопуляция naïve Т-лимфоцитов

в) Субпопуляция EM Т-лимфоцитов

г) Субпопуляция CM Т-лимфоцитов

Обозначения:

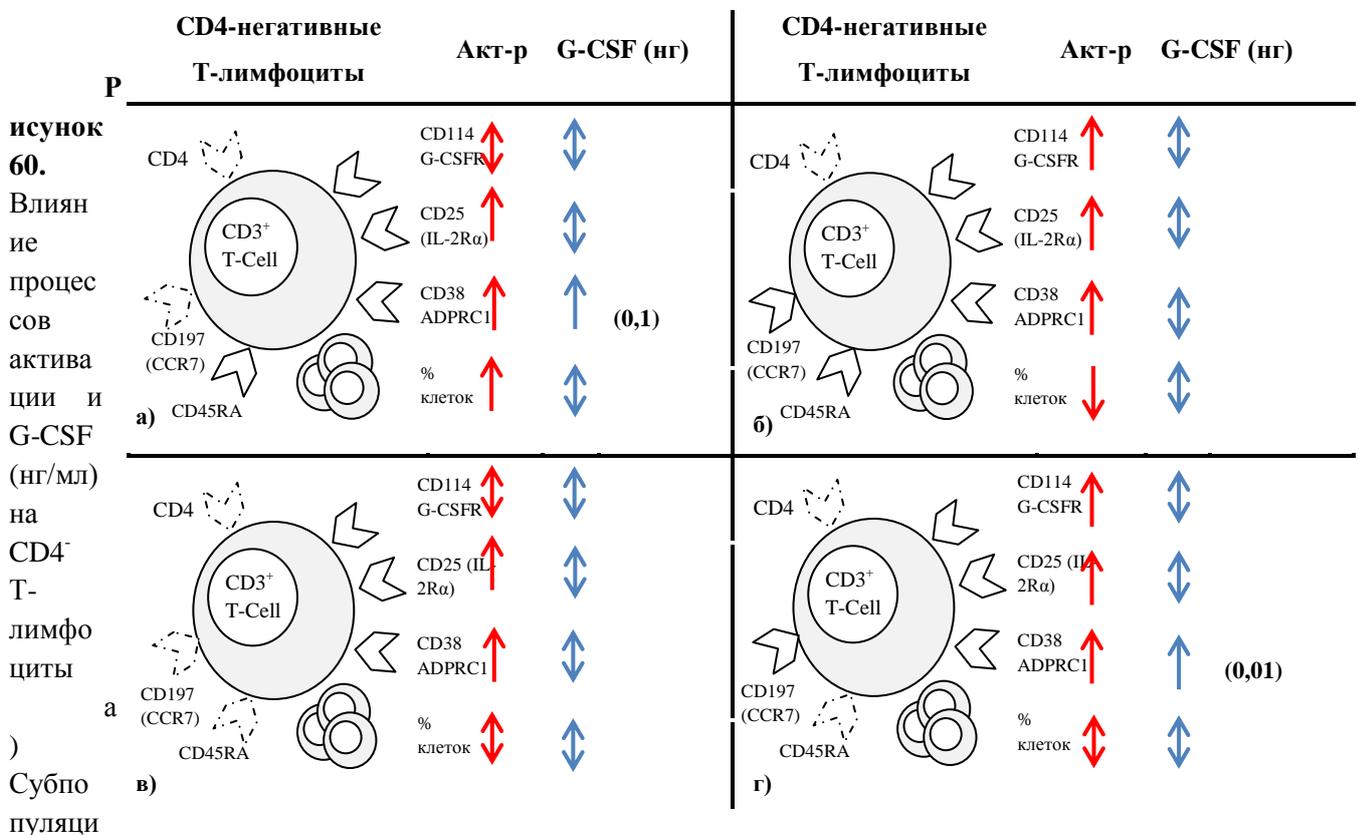
↑↓ - статистически значимые изменения

↑ - отсутствие изменений

Среди CD4-негативных Т-лимфоцитов, под влиянием G-CSF наблюдались эффекты, представленные на **рисунке 60**.

Согласно литературным данным CD4-негативные наивные Т-лимфоциты малочувствительны к IL-7 и IL-15 и способны продуцировать высокие уровни IL-2 (Henning A.N., et al., 2018). Их активация усиливает процессы гомеостатической пролиферации. В нашей работе в ответ на активацию было отмечено уменьшение доли наивных клеток среди CD4-негативных лимфоцитов, что в сочетании с увеличением числа CD38<sup>+</sup> клеток может говорить о стимуляции дифференцировочных процессов. Согласно нашим данным G-CSF не оказывал значимого влияния на эти процессы (**Рисунок 60 б**).

CD4-негативные центральные Т-клетки памяти при длительном культивировании могут дифференцироваться как в эффекторные Т-клетки памяти, так и в терминально дифференцированные Т-клетки (Younes S.A., et al., 2016; Portero-Sainz I., et al., 2017). В нашей работе продемонстрировано увеличение числа CD25, CD38 и CD114 позитивных клеток среди CD4-негативных Т-лимфоцитов центральной памяти в ответ на антигензависимую активацию. Внесение G-CSF в культуру клеток приводило к статистически значимому увеличению числа CD38<sup>+</sup> Т-лимфоцитов. Это может указывать на усиление функциональной активности, данной Т-клеточной субпопуляции (Рисунок 60 г).



а) Субпопуляция TEMRA Т-лимфоцитов

б) Субпопуляция naïve Т-лимфоцитов

в) Субпопуляция EM Т-лимфоцитов

г) Субпопуляция CM Т-лимфоцитов

Обозначения:

↑↓ - статистически значимые изменения

↓ - отсутствие изменений

CD4-негативные Т-лимфоциты эфетроной памяти характеризуются достаточно высокой гетерогенностью и включают в себя, как незрелые клетки эффекторной памяти 1-го типа, не способные осуществлять эффекторные функции, так и клетки эффекторной

памяти 3-го типа которые по своим свойствам близки к полноценным эффекторным клеткам (Van den Broek T., et al., 2018). В нашей работе показано, что активация приводит к увеличению числа CD25 и CD38 позитивных клеток в этой субпопуляции. Добавление G-CSF не приводило, к каким-либо статистически значимым количественным и маркерным изменениям в этих клетках (**Рисунок 60 в**).

Субпопуляция CD4-негативных терминально дифференцированных Т-лимфоцитов включает в себя наиболее дифференцированные и функционально активные клетки (Takata H., et al., 2012). В наших экспериментах антигензависимая активация приводила к увеличению числа CD38<sup>+</sup> и CD25<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, а G-CSF статистически значимо увеличивал число CD38<sup>+</sup> Т-лимфоцитов среди активированных терминально дифференцированных Т-клеток (**Рисунок 60 а**), что говорит о вовлеченности этого гемопэтина в процесс регуляции функциональной активности CD4-негативных терминально дифференцированных Т-лимфоцитов.

IL-2 играет ключевую роль в процессах клеточной пролиферации и активации Т-лимфоцитов (Yong C., 2017). В нашей работе было продемонстрировано усиление продукции IL-2 активированными Т-клетками, что соответствует литературным данным (Селедцов В.И. и др., 2010; Liao W. et al., 2013). Уровень продукции цитокина при добавлении G-CSF не изменялся.

Одним из цитокинов с ярко выраженным провоспалительным эффектом является IFN- $\gamma$ . Это интерферон II-го типа, который участвует в процессах активации макрофагов и индукции экспрессии молекулы МНС-II, так же он играет ключевую роль в развитии и реализации противовирусных иммунных реакций. К основным продуцентам этого цитокина относят Th1-клетки, цитотоксические лимфоциты, NK-клетки и NKT-клетки (Parker B.S., et al., 2016; Negishi H., et al., 2018). В наших экспериментах G-CSF снижал продукцию IFN- $\gamma$ , осуществляемую активированными Т-лимфоцитами.

IL-10 является иммуносупрессорным цитокином (Zarour H.M., 2016; Ouyang W., O'Garra A., 2019). Активация Т-лимфоцитов стимулировала продукцию IL-10. Активированные Т-лимфоциты под влиянием G-CSF продемонстрировали тенденцию к дополнительному усилению продукции IL-10, что возможно обусловлено продукцией этого цитокина Т-регуляторными клетками под действием G-CSF, что сопоставимо с данными, приведенными в работе Перобелли (Perobelli S.M., et al., 2016). Но эта тенденция не подтверждалась статистической достоверностью.

IL-4 – противовоспалительный цитокин, продуцируемый преимущественно Th2-клетками. IL-4 является ключевым стимулятором альтернативной активации Мф (Van Dyken S.J., Locksley R.M., 2013). Он подавляет функциональную активность провоспалительных Th1-клеток. В наших экспериментах G-CSF был способен усиливать Т-клеточную продукцию IL-4. Таким образом, в целом, полученные данные указывают на способность G-CSF поддерживать адаптивные иммунные процессы противовоспалительной направленности и стимуляцию репаративных процессов.

#### 4. ВЫВОДЫ

1. G-CSF сдерживает развитие классической (M1) активации макрофагов, о чём свидетельствует снижение относительного количества активированных макрофагов, экспрессирующих CD16, CD119 и CD197, и стимуляция макрофагальной продукции IL-6 и снижение продукции IL-10 и IL-1 $\beta$  под действием G-CSF.
2. G-CSF вовлечен в T-клеточный иммуноадаптогенез, о чём говорит индукция мембранной экспрессии G-CSFR (CD114<sup>+</sup>) под влиянием T-клеточной активации.
3. G-CSF не оказывает прямого влияния на IL-2-зависимый T-клеточный рост, о чём свидетельствует отсутствие влияния G-CSF на экспрессию CD25 (рецептор IL-2) и продукцию IL-2 активированными T-лимфоцитами.
4. Прямое влияние G-CSF на активацию T-клеток определяется их субпопуляционной принадлежностью, о чём свидетельствует более выраженное увеличение относительного числа CD38<sup>+</sup> клеток среди активированных CD4-позитивных T-лимфоцитов, но не среди CD4-негативных.
5. G-CSF поддерживает T-хелперные реакции 2 типа, о чём говорит снижение продукции INF- $\gamma$  и усиление выработки IL-4, осуществляемое активированными T-лимфоцитами под действием G-CSF.
6. G-CSF в рамках адаптивного иммуногенеза сдерживает провоспалительные (M1) макрофагальные реакции и способствует развитию противовоспалительных иммунных процессов, опосредуемых T-хелперами 2-го типа.

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Клеточные механизмы генерации иммунологической памяти / В.И. Селедцов, Л.С. Литвинова, А.Г. Гончаров и др. // Цитокины и воспаление. – 2010. – Т. 4. – С. 9-15
2. Кудрявцев И.В. Т-клетки памяти: основные популяции и стадии дифференцировки / И.В. Кудрявцев // Российский иммунологический журнал. – 2014. – Т. 8, №4. – С. 947-964.
3. Меджитов, Р. Врожденный иммунитет / Р. Меджитов, Ч. Джаневей // Казанский медицинский журнал. – 2004. – Т. 85, №3. – С. 161-167.
4. Основные поверхностные маркеры функциональной активности Тлимфоцитов / Л.С. Литвинова, А.А. Гуцол, Н.А. Сохоневич и др. // Медицинская иммунология. – 2014. – Т. 16, № 1. – С. 7-26.
5. Симбирцев, А.С. Цитокины: классификация и биологические функции / А.С. Симбирцев // Цитокины и воспаление. - 2004. - №2. - С. 16 – 21.
6. Хаитов, Р.М. 2016 Иммунология Учебник М.: ГЭОТАР-Медиа, 2016 – 496 с.
7. Черешнев, А.А. Иммунология воспаления: роль цитокинов / А.А. Черешнев, Е.Ю. Гусев // Медицинская иммунология. – 2001. – Т. 3. - №3. – С. 361-368.
8. Ярилин, А.А. Иммунология. Учебник / Ярилин А.А. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 752 с.
9. A GCSFR/CSF3R zebrafish mutant models the persistent basal neutrophil deficiency of severe congenital neutropenia / V. Pazhakh, S. Clark, M.C. Keightley, et al. // Scientific reports. – 2017. – V. 7, №1. – P. 1-11.
10. A high migratory capacity of donor T-cells in response to the lymph node homing receptor CCR7 increases the incidence and severity of GvHD / I. Portero-Sainz, V. G. G.de Soria, C. Cuesta-Mateos, et al. // Bone marrow transplantation. – 2017. – V. 52, №5. – P. 745-752.
11. A Truncated Granulocyte Colony-stimulating Factor Receptor (G-CSFR) Inhibits Apoptosis Induced by Neutrophil Elastase G185R Mutant IMPLICATION FOR UNDERSTANDING CSF3R GENE MUTATIONS IN SEVERE CONGENITAL

- NEUTROPENIA / Y. Qiu, Y. Zhang, N. Hu, et al. // *Journal of Biological Chemistry*. – 2017. – V. 292, №8. – P. 3496-3505.
12. Altered expression of CSF3R splice variants impacts signal response and is associated with SRSF2 mutations / A. Lance, L.J. Druhan, C.G. Vestal, et al. // *Leukemia*. – 2019. – P. 1-11.
  13. An immunoregulatory and tissue-residency program modulated by c-MAF in human TH 17 cells / D. Aschenbrenner, M. Foglierini, D. Jarrossay, et al. // *Nature immunology*. – 2018. – V. 19, №10. – P. 1126-1136.
  14. Application of 2D-NMR with room temperature NMR probes for the assessment of the higher order structure of filgrastim / R.G. Brinson, H. Ghasriani, D.J. Hodgson, et al. // *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. – 2017. – V. 141. – P. 229-233.
  15. Arvedson T.L., Structural biology of G-CSF and its receptor / T.L. Arvedson, M.J. Giffin // *Twenty Years of G-CSF*. – Springer, Basel, 2012. – P. 61-82.
  16. Ascites IL-10 promotes ovarian cancer cell migration / D. Lane, I. Matte, P. Garde-Granger, et al. // *Cancer Microenvironment*. – 2018. – V. 11, №2-3. – P. 115-124.
  17. Azcutia V., Role of negative regulation of immune signaling pathways in neutrophil function / V. Azcutia, C.A. Parkos, J.C. Brazil // *Journal of leukocyte biology*. – 2018. – V. 103, №6. – P. 1029-1041.
  18. Barreda D.R., Regulation of myeloid development and function by colony stimulating factors / D.R. Barreda, P.C. Hanington, M. Belosevic // *Developmental & Comparative Immunology*. – 2004. – V. 28, №5. – P. 509-554.
  19. Bendall L.J., G-CSF: From granulopoietic stimulant to bone marrow stem cell mobilizing agent / L.J. Bendall, K.F. Bradstock // *Cytokine & growth factor reviews*. – 2014. – V. 25, №. 4. – P. 355-367.
  20. Bergan-Roller H.E., The growth hormone signaling system: insights into coordinating the anabolic and catabolic actions of growth hormone / H.E. Bergan-Roller, M.A. Sheridan // *General and comparative endocrinology*. – 2018. – V. 258. – P. 119-133.
  21. Biosimilar structural comparability assessment by NMR: from small proteins to monoclonal antibodies / B. Japelj, G. Ilc, J. Marušič, et al. // *Scientific reports*. – 2016. – V. 6, №1. – P. 1-12.

22. Blazar B.R., Immune regulatory cell infusion for graft-versus-host disease prevention and therapy / B.R. Blazar, K. MacDonald, G.R. Hill // *Blood*. – 2018. – V. 131, №24. – P. 2651-2660.
23. Boettcher S., Regulation of inflammation-and infection-driven hematopoiesis / S. Boettcher, M.G. Manz // *Trends in immunology*. – 2017. – V. 38, №5. – P. 345-357.
24. Bone marrow micro-environment is a crucial player for myelomagenesis and disease progression / P. Mondello, S. Cuzzocrea, M. Navarra, et al. // *Oncotarget*. – 2017. – V. 8, №12. – P. 20394.
25. Brooks A.J., Cytokine receptors / A.J. Brooks, F. Dehkhoda, B.B. Kragelund // *Principles of Endocrinology and Hormone Action*. – 2016. – P. 1-29.
26. *C. elegans* DPY-19 is a C-mannosyltransferase glycosylating thrombospondin repeats / F.F. Buettner, A. Ashikov, B. Tiemann, et al. // *Molecular cell*. – 2013. – V. 50, №2. – P. 295-302.
27. Canonical and non-canonical aspects of JAK–STAT signaling: lessons from interferons for cytokine responses / A. Majoros, E. Platanitis, E. Kernbauer-Hölzl, et al. // *Frontiers in immunology*. – 2017. – V. 8. – P. 29.
28. CD16 is indispensable for antibody-dependent cellular cytotoxicity by human monocytes / W.H. Yeap, K.L. Wong, N. Shimasaki, et al. // *Scientific reports*. – 2016. – V. 6. – P. 34310.
29. CD38 and CD157: a long journey from activation markers to multifunctional molecules / V. Quarona, G. Zaccarello, A. Chillemi, et al. // *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*. – 2013. – V. 84, №4. – P. 207-217.
30. CD38 Deficiency Promotes Inflammatory Response through Activating Sirt1/NF- $\kappa$ B-Mediated Inhibition of TLR2 Expression in Macrophages / Y. Qian, C. Chen, L. Ma, et al. // *Mediators of inflammation*. – 2018. – V. 2018.
31. CD4 T-cells with high common  $\gamma$  chain expression and disturbed cytokine production are enriched in children with type-1 diabetes / J. Seyfarth, N. Mütze, J. Antony Cruz, et al. // *Frontiers in immunology*. – 2019. – V. 10. – P. 820.
32. Cell fate decision as high-dimensional critical state transition / M. Mojtahedi, A. Skupin, J. Zhou, et al. // *PLoS biology*. – 2016. – V. 14, №12.

33. Changes in gene expression during G-CSF-induced emergency granulopoiesis in humans / C.C. Pedersen, R. Borup, A. Fischer-Nielsen, et al. // *The Journal of Immunology*. – 2016. – V. 197, №5. – P. 1989-1999.
34. Characterization of naïve, memory and effector T cells in progressive multiple sclerosis / B.R. Nielsen, R. Ratzner, L. Börnsen, et al. // *Journal of neuroimmunology*. – 2017. – V. 310. – P. 17-25.
35. Chopra M., Acute lung injury: apoptosis and signaling mechanisms / M. Chopra, J.S. Reuben, A.C. Sharma // *Experimental biology and medicine*. – 2009. – V. 234, №4. – P. 361-371.
36. Clinical-grade generation of peptide-stimulated CMV/EBV-specific T cells from G-CSF mobilized stem cell grafts / R. Gary, M. Aigner, S. Moi, et al. // *Journal of translational medicine*. – 2018. – V. 16, №1. – P. 124.
37. Craig M., A mathematical model of granulopoiesis incorporating the negative feedback dynamics and kinetics of G-CSF/neutrophil binding and internalization / M. Craig, A.R. Humphries, M.C. Mackey // *Bulletin of mathematical biology*. – 2016. – V. 78, №12. – P. 2304-2357.
38. Crystal Structure of the Entire Ectodomain of gp130 insights into the molecular assembly of the tall cytokine receptor complexes / Y. Xu, N.J. Kershaw, C.S. Luo, et al. // *Journal of Biological Chemistry*. – 2010. – V. 285, №28. – P. 21214-21218.
39. CSF3R mutations have a high degree of overlap with CEBPA mutations in pediatric AML / J.E. Maxson, R.E. Ries, Y.C. Wang, et al. // *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. – 2016. – V. 127, №24. – P. 3094-3098.
40. Cutting edge: activation of STING in T cells induces type I IFN responses and cell death / B. Larkin, V. Ilyukha, M. Sorokin, et al. // *The Journal of Immunology*. – 2017. – V. 199, №2. – P. 397-402.
41. Dalia, A.B. Minimization of bacterial size allows for complement evasion and is overcome by the agglutinating effect of antibody / A.B. Dalia, J.N. Weiser // *Cell Host Microbe*. – 2011. – V. 10, №5. – P. 486-496
42. DC subsets regulate humoral immune responses by supporting the differentiation of distinct Tfh cells / A. Bouteau, J. Kervecan, Q. Su, et al. // *Frontiers in immunology*. – 2019. – V. 10. – P. 1134.

43. Direct effects of interleukin-7 on the function of human T cells in vitro / V.A. Shmarov, V.V. Malashchenko, M.E. Meniailo, et al. // *European cytokine network*. – 2016. – V. 27, №4. – P. 102-107.
44. Distinct routes of lineage development reshape the human blood hierarchy across ontogeny / F. Notta, S. Zandi, N. Takayama, et al. // *Science*. – 2016. – V. 351, №6269. – P. aab2116.
45. Dwivedi P., Granulocyte colony-stimulating factor receptor signaling in severe congenital neutropenia, chronic neutrophilic leukemia, and related malignancies / P. Dwivedi, K.D. Greis // *Experimental hematology*. – 2017. – V. 46. – P. 9-20.
46. Effect of administration timing of postchemotherapy granulocyte colony-stimulating factor on host-immune cell recovery and CD8+ T-cell response / M.L. Salem, M. Nassef, S.G. Abdel Salam, et al. // *Journal of immunotoxicology*. – 2016. – V. 13, №6. – P. 784-792.
47. Efficacy of intrauterine perfusion of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) for Infertile women with thin endometrium: A systematic review and meta-analysis / Y. Xie, T. Zhang, Z. Tian, et al. // *American Journal of Reproductive Immunology*. – 2017. – V. 78, №2. – P. e12701.
48. Efficiency of granulocyte colony-stimulating factor immobilized on magnetic microparticles on proliferation of NFS-60 cells / A. Popov, A. Stirke, N. Bakute, et al. // *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. – 2019. – V. 578. – P. 123580.
49. Enhanced MAPK signaling is essential for CSF3R-induced leukemia / S. Rohrabough, M. Kesarwani, Z. Kincaid, et al. // *Leukemia*. – 2017. – V. 31, №8. – P. 1770-1778.
50. Erythropoietin exerts direct immunomodulatory effects on the cytokine production by activated human T-lymphocytes / N.M. Todosenko, V.A. Shmarov, V.V. Malashchenko, et al. // *International immunopharmacology*. – 2016. – V. 36. – P. 277-281.
51. Expression and control of codon-optimized granulocyte colony-stimulating factor in *Pichia pastoris* / N. Maity, A. Thawani, A. Sharma, et al. // *Applied biochemistry and biotechnology*. – 2016. – V. 178, №1. – P. 159-172.

52. Expression of the G-CSF receptor in monocytic cells is sufficient to mediate hematopoietic progenitor mobilization by G-CSF in mice / M.J. Christopher, M. Rao, F. Liu, et al. // *Journal of Experimental Medicine*. – 2011. – V. 208, № 2. – P. 251-260.
53. Ferrao R., The Janus kinase (JAK) FERM and SH2 domains: bringing specificity to JAK–receptor interactions / R. Ferrao, P.J. Lupardus // *Frontiers in endocrinology*. – 2017. – V. 8. – P. 71.
54. Förster R., Lymph node homing of T cells and dendritic cells via afferent lymphatics / R. Förster, A. Braun, T. Worbs // *Trends in immunology*. – 2012. – V. 33, №6. – P. 271-280.
55. Gain-of-function mutations in granulocyte colony–stimulating factor receptor (CSF3R) reveal distinct mechanisms of CSF3R activation / H. Zhang, C. Coblenz, K. Watanabe-Smith, et al. // *Journal of Biological Chemistry*. – 2018. – V. 293, №19. – P. 7387-7396.
56. G-CSF administration favours SDF-1 release and activation of neutrophils and monocytes in recipients of autologous peripheral blood progenitor cells / K. Gębura, A. Butrym, M. Chaszczewska-Markowska, et al. // *Cytokine*. – 2019. – V. 116. – P. 38-47.
57. G-CSF as immune regulator in T cells expressing the G-CSF receptor: implications for transplantation and autoimmune diseases / A. Franzke, W. Piao, J. Lauber, et al. // *Blood*. – 2003. – V. 102, №2. – P. 734-739.
58. G-CSF for mobilizing transplanted bone marrow stem cells in rat model of Parkinson's disease / M. Safari, B. Jafari, S. Zarbakhsh, et al. // *Iranian journal of basic medical sciences*. – 2016. – V. 19, №12. – P. 1318.
59. G-CSF inhibits LFA-1-mediated CD4+ T cell functions by inhibiting Lck and ZAP-70 / S. Zhao, Z. Gu, L. Wang, et al. // *Oncotarget*. – 2017. – V. 8, № 31. – P. 51578.
60. G-CSF maintains controlled neutrophil mobilization during acute inflammation by negatively regulating CXCR2 signaling / B. Bajrami, H. Zhu, H.J. Kwak, et al. // *Journal of Experimental Medicine*. – 2016. – V. 213, №10. – P. 1999-2018.
61. G-CSF regulates macrophage phenotype and associates with poor overall survival in human triple-negative breast cancer / M. Hollmén, S. Karaman, S. Schwager, et al. // *Oncoimmunology*. – 2016. – V. 5, №3. – P. e1115177.
62. G-CSF-induced macrophage polarization and mobilization may prevent acute graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation / Q. Wen,

- Y. Kong, H.Y. Zhao, et al. // Bone marrow transplantation. – 2019. – V. 54, №9. – P. 1419-1433.
63. G-CSF-induced suppressor IL-10<sup>+</sup> neutrophils promote regulatory T cells that inhibit graft-versus-host disease in a long-lasting and specific way / S.M. Perobelli, A.C.T. Mercadante, R.G. Galvani, et al. // The Journal of immunology. – 2016. – V. 197, №9. – P. 3725-3734.
64. Glioblastoma-synthesized G-CSF and GM-CSF contribute to growth and immunosuppression: Potential therapeutic benefit from dapsone, fenofibrate, and ribavirin / R.E. Kast, Q.A. Hill, D. Wion, et al. // Tumor Biology. – 2017. – V. 39, №5. – P. 1010428317699797.
65. Gordon, S. Phagocytosis: an immunobiologic process / S. Gordon // Immunity. – 2016. – V. 44, №3. – P. 463-475.
66. Granulocyte colony-stimulating factor for the treatment of cardiovascular diseases: An update with a critical appraisal / D. D'Amario, A.M. Leone, J.A. Borovac, et al. // Pharmacological research. – 2018. – V. 127. – P. 67-76.
67. Granulocyte colony-stimulating factor impairs CD8<sup>+</sup> T cell functionality by interfering with central activation elements / C.E. Bunse, S. Tischer, J. Lahrberg, et al. // Clinical & Experimental Immunology. – 2016. – V. 185. – № 1. – P. 107-118.
68. Granulocyte colony-stimulating factor producing anaplastic carcinoma of the pancreas: Case report and review of the literature / S. Vinzens, J. Zindel, M. Zweifel, et al. // Anticancer research. – 2017. – V. 37, №1. – P. 223-228.
69. Granulocyte colony-stimulating factor prophylaxis improves survival and inflammation in a two-hit model of hemorrhage and sepsis / A. Bauhofer, W. Lorenz, F. Kohlert, et al. // Critical care medicine. – 2006. – V. 34, №3. – P. 778-784.
70. Granulocyte-colony stimulating factor controls neural and behavioral plasticity in response to cocaine / E.S. Calipari, A. Godino, E.G. Peck, et al. // Nature communications. – 2018. – V. 9, №1. – P. 1-14.
71. Granulocyte-colony stimulating factors as adjunctive therapy for diabetic foot infections / M. Cruciani, B.A. Lipsky, C. Mengoli, et al. // Cochrane Database of Systematic Reviews. – 2013, №8.

72. Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies / A. Cossarizza, H.D. Chang, A. Radbruch, et al. // *European journal of immunology*. – 2017. – V. 47, №10. – P. 1584-1797.
73. Hatfield K.J., Granulocyte colony-stimulating factor alters the systemic metabolomic profile in healthy donors / K.J. Hatfield, G.K. Melve, Ø. Bruserud // *Metabolomics*. – 2017. – V. 13, №1. – P. 2.
74. Hedrich C.M., Cell type-specific regulation of IL-10 expression in inflammation and disease / C.M. Hedrich, J.H. Bream // *Immunologic research*. – 2010. – V. 47, №1-3. – P. 185-206.
75. Henning A.N., Epigenetic control of CD8+ T cell differentiation / A.N. Henning, R. Roychoudhuri, N.P. Restifo // *Nature Reviews Immunology*. – 2018. – V. 18, №5. – P. 340.
76. Herrera S.C., JAK/STAT signaling in stem cells and regeneration: from Drosophila to vertebrates / S.C. Herrera, E.A. Bach // *Development*. – 2019. – V. 146, №2. – P. dev167643.
77. Hibbs M.L., Regulation of hematopoietic cell signaling by SHIP-1 inositol phosphatase: growth factors and beyond / M.L. Hibbs, A.L. Raftery, E. Tsantikos // *Growth Factors*. – 2018. – V. 36, №5-6. – P. 213-231.
78. High-dimensional phenotypic mapping of human dendritic cells reveals interindividual variation and tissue specialization / M. Alcántara-Hernández, R. Leylek, L.E Wagar, et al. // *Immunity*. – 2017. – V. 47, №6. – P. 1037-1050. e6.
79. High-dosage granulocyte colony stimulating factor treatment alters monocyte trafficking to the brain after experimental stroke / G. Weise, C. Pösel, K. Moeller, et al. // *Brain, behavior, and immunity*. – 2017. – V. 60. – P. 15-26.
80. Homodimeric cross-over structure of the human granulocyte colony-stimulating factor (GCSF) receptor signaling complex / T. Tamada, E. Honjo, Y. Maeda, et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2006. – V. 103, №9. – P. 3135-3140.
81. Horiguchi H., Acute exposure to cadmium induces prolonged neutrophilia along with delayed induction of granulocyte colony-stimulating factor in the livers of mice / H. Horiguchi, E. Oguma // *Archives of toxicology*. – 2016. – V. 90, №12. – P. 3005-3015.

82. Hu N., Role of Erk1/2 signaling in the regulation of neutrophil versus monocyte development in response to G-CSF and M-CSF / N. Hu, Y. Qiu, F. Dong // *Journal of Biological Chemistry*. – 2015. – V. 290, №40. – P. 24561-24573.
83. Human CD14<sup>dim</sup> monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors / J. Cros, N. Cagnard, K. Woollard, et al. // *Immunity*. – 2010. – V. 33, №3. – P. 375-386.
84. Human monocyte subsets and phenotypes in major chronic inflammatory diseases / T.S. Kapellos, L. Bonaguro, I. Gemünd, et al. // *Frontiers in immunology*. – 2019. – V. 10. – P. 2035.
85. Identification and in vitro characterization of novel nanobodies against human granulocyte colony-stimulating factor receptor to provide inhibition of G-CSF function / H. Bakherad, S.L.M. Gargari, Z. Sepehrizadeh, et al. // *Biomedicine & Pharmacotherapy*. – 2017. – V. 93. – P. 245-254.
86. Identification of IL-23p19 as an endothelial proinflammatory peptide that promotes gp130-STAT3 signaling / G. Espígol-Frigolé, E. Planas-Rigol, H. Ohnuki, et al. // *Science signaling*. – 2016. – V. 9, №419. – P. ra28-ra28.
87. Identification of low-level product-related variants in filgrastim products presently available in highly regulated markets / A. Hausberger, W. Lamanna, C., M. Hartinger, et al. // *BioDrugs*. – 2016. – V. 30, №3. – P. 233-242.
88. Identification of Toll-like receptor signaling inhibitors based on selective activation of hierarchically acting signaling proteins / S.K. Ippagunta, J.A. Pollock, N. Sharma, et al. // *Sci. Signal*. – 2018. – V. 11, №543. – P. eaaq1077.
89. Ikaros zinc finger transcription factors: Regulators of cytokine signaling pathways and CD4<sup>+</sup> T helper cell differentiation / M.D. Powell, K.A. Read, B.K. Sreekumar, et al. // *Frontiers in immunology*. – 2019. – V. 10.
90. IL-10 producing CD14<sup>low</sup> monocytes inhibit lymphocyte-dependent activation of intestinal epithelial cells by commensal bacteria / D. Haller, P. Serrant, G. Peruisseau, et al. // *Microbiology and immunology*. – 2002. – V. 46, №3. – P. 195-205.
91. IL-10: a multifunctional cytokine in viral infections / J.M. Rojas, M. Avia, V. Martín, et al. // *Journal of immunology research*. – 2017. – V. 2017.

92. IL-15 promotes activation and expansion of CD8<sup>+</sup> T cells in HIV-1 infection / S.A. Younes, M.L. Freeman, J.C. Mudd, et al. // *The Journal of clinical investigation*. – 2016. – V. 126, №7. – P. 2745-2756.
93. Imiquimod and interferon-alpha augment monocyte-mediated astrocyte secretion of MCP-1, IL-6 and IP-10 in a human co-culture system / M.D. Rizzo, R.B. Crawford, A. Bach, et al. // *Journal of neuroimmunology*. – 2019. – V. 333. – P. 576969.
94. Immunogenic cell death in cancer and infectious disease / L. Galluzzi, A. Buqué, O. Kepp, et al. // *Nature Reviews Immunology*. – 2017. – V. 17, №2. – P. 97.
95. Immunological principles guiding the rational design of particles for vaccine delivery / K.T. Gause, A.K. Wheatley, J. Cui, et al. // *ACS nano*. – 2017. – V. 11, №1. – P. 54-68.
96. Innate cell communication kick-starts pathogen-specific immunity / A. Rivera, M.C. Siracusa, G.S. Yap, et al. // *Nature immunology*. – 2016. – V. 17, №4. – P. 356.
97. Interferon receptor signaling pathways regulating PD-L1 and PD-L2 expression / A. Garcia-Diaz, D.S. Shin, B.H. Moreno, et al. // *Cell reports*. – 2017. – V. 19, №6. – P. 1189-1201.
98. Interleukin (IL)-2 is a key regulator of T Helper 1 and T Helper 2 cytokine expression in fish: functional characterization of two divergent IL2 paralogs in Salmonids / T. Wang, Y. Hu, E. Wangkahart, et al. // *Frontiers in immunology*. – 2018. – V. 9. – P. 1683.
99. Intracellular nucleic acid detection in autoimmunity / J.T. Crowl, E.E. Gray, K. Pestal, et al. // *Annual review of immunology*. – 2017. – V. 35. – P. 313-336.
100. JAK inhibition as a therapeutic strategy for immune and inflammatory diseases / D.M. Schwartz, Y. Kanno, A. Villarino, et al. // *Nature reviews Drug discovery*. – 2017. – V. 16, №12. – P. 843-862.
101. Jakubzick C.V., Monocyte differentiation and antigen-presenting functions / C.V. Jakubzick, G.J. Randolph, P.M. Henson // *Nature Reviews Immunology*. – 2017. – V. 17, №6. – P. 349-362.
102. Janeway C.A., Medzhitov R. Innate immune recognition / C.A. Janeway, R. Medzhitov // *Annual review of immunology*. – 2002. – V. 20. – P. 197-216.
103. Johnston R.B. An overview of the innate immune system / R.B. Johnston // *UpToDate*. Published. – 2017.

104. Jones S.A., Recent insights into targeting the IL-6 cytokine family in inflammatory diseases and cancer / S.A. Jones, B.J. Jenkins // *Nature Reviews Immunology*. – 2018. – V. 18, №12. – P. 773-789.
105. Kambayashi T., Atypical MHC class II-expressing antigen-presenting cells: can anything replace a dendritic cell? / T. Kambayashi, T.M. Laufer // *Nature Reviews Immunology*. – 2014. – V. 14, №11. – P. 719.
106. Keightley M.C., Splicing dysfunction and disease: the case of granulopoiesis / M.C. Keightley, G.J. Lieschke // *Seminars in cell & developmental biology*. – Academic Press, 2018. – V. 75. – P. 23-39.
107. Keratinocyte-Releasable Factors Stimulate the Expression of Granulocyte Colony-Stimulating Factor in Human Dermal Fibroblasts / M.J. Carr, Y. Li, A.M. Rezakhanlou, et al. // *Journal of cellular biochemistry*. – 2017. – V. 118, №2. – P. 308-317.
108. Koch, U. Mechanisms of T cell development and transformation / U. Koch, F. Radtke // *Annu Rev Cell Dev Biol*. – 2011. – V. 27. – P. 539-562.
109. Kramer A. Zur möglichen regenerativen Wirkung des hämatopoietischen Wachstumsfaktors G-CSF auf die Funktion peripherer Nerven nach traumatischer Schädigung. – 2017.
110. Leonard W.J., The  $\gamma c$  family of cytokines: basic biology to therapeutic ramifications / W.J. Leonard, J.X. Lin, J.J. O'Shea // *Immunity*. – 2019. – V. 50, №4. – P. 832-850.
111. Li Q., Erythropoietin Receptor Structural Domains / Q. Li, C.B. Kang // *Vitamins and hormones*. – Academic Press, 2017. – V. 105. – P. 1-17.
112. Liang W., The complex role of neutrophils in tumor angiogenesis and metastasis / W. Liang, N. Ferrara // *Cancer immunology research*. – 2016. – V. 4, №2. – P. 83-91.
113. Liao, W. Interleukin-2 at the crossroads of effector responses, tolerance, and immunotherapy / W. Liao, J.X. Lin, W.J. Leonard // *Immunity*. – 2013. – V.38, №1. – P. 13-25.
114. Liska M.G., Granulocyte-colony stimulating factor and umbilical cord blood cell transplantation: Synergistic therapies for the treatment of traumatic brain injury / M.G. Liska, I. dela Peña // *Brain circulation*. – 2017. – V. 3, №3. – P. 143.

115. Lokau J., Activating mutations of the gp130/JAK/STAT pathway in human diseases / J. Lokau, C. Garbers // *Advances in protein chemistry and structural biology*. – Academic Press, 2019. – V. 116. – P. 283-309.
116. Maj T., Rewiring regulatory T cells for tumour killing / T. Maj, W. Zou // *Nature biomedical engineering*. – 2019. – V. 3, №10. – P. 766-767.
117. Mannose-binding lectin and l-ficolin polymorphisms in patients with community-acquired pneumonia caused by intracellular pathogens / G. van Kempen, S. Meijvis, H. Endeman, et al. // *Immunology*. – 2017. – V. 151, №1. – P. 81-88.
118. Mature CD10<sup>+</sup> and immature CD10<sup>–</sup> neutrophils present in G-CSF-treated donors display opposite effects on T cells / O. Marini, S. Costa, D. Bevilacqua, et al. // *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. – 2017. – V. 129, №10. – P. 1343-1356.
119. McDermott D.H., WHIM syndrome: Immunopathogenesis, treatment and cure strategies / D.H. McDermott, P.M. Murphy // *Immunological reviews*. – 2019. – V. 287, №1. – P. 91-102.
120. Metcalf D. The colony-stimulating factors and cancer / D. Metcalf // *Nature Reviews Cancer*. – 2010. – V. 10, №6. – P. 425-443.
121. Modification of T cell responses by stem cell mobilization requires direct signaling of the T cell by G-CSF and IL-10 / K.P. MacDonald, L. Le Texier, P. Zhang et al. // *The Journal of Immunology*. – 2014. – V. 192, №. 7. – P. 3180-3189.
122. Modulation of JAK2, STAT3 and Akt1 proteins by granulocyte colony stimulating factor following carbon monoxide poisoning in male rat / M. Hashemzaei, M. Imen Shahidi, S.A. Moallem, et al. // *Drug and chemical toxicology*. – 2016. – V. 39, №4. – P. 375-379.
123. Molecular Dynamics Simulations Reveal Key Roles of the Interleukin-6 Alpha Receptor in the Assembly of the Human Interleukin-6 Receptor Complex / O. Schillinger, V. Panwalkar, B. Strodel, et al. // *The Journal of Physical Chemistry B*. – 2017. – V. 121, №34. – P. 8113-8122.
124. Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases / J. Yang, L. Zhang, C. Yu, et al. // *Biomarker research*. – 2014. – V. 2, №1. – P. 1.

125. Monocyte polarization: the relationship of genome-wide changes in H4 acetylation with polarization / Z. Zhang, L. Song, K. Maurer, et al. // *Genes Immun.* – 2011. – V. 12, №6. – P. 445-456.
126. Monocyte trafficking in acute and chronic inflammation / M.A. Ingersoll, A.M. Platt, S. Potteaux, et al. // *Trends in immunology.* – 2011. – V. 32, №10. – P. 470-477.
127. Morris R., The molecular details of cytokine signaling via the JAK/STAT pathway / R. Morris, N.J. Kershaw, J.J. Babon // *Protein Science.* – 2018. – V. 27, №12. – P. 1984-2009.
128. Mouchemore K.A., Neutrophils, G- CSF and their contribution to breast cancer metastasis / K.A. Mouchemore, R.L. Anderson, J.A. Hamilton // *The FEBS journal.* – 2018. – V. 285, №4. – P. 665-679.
129. Muraille E., TH1/TH2 paradigm extended: macrophage polarization as an unappreciated pathogen-driven escape mechanism? / E. Muraille, O. Leo, M. Moser // *Frontiers in immunology.* – 2014. – V. 5. – P. 603.
130. Murray P.J., Protective and pathogenic functions of macrophage subsets / P.J. Murray, T.A. Wynn // *Nature reviews immunology.* – 2011. – V. 11, №11. – P. 723.
131. Negishi H., The interferon (IFN) class of cytokines and the IFN regulatory factor (IRF) transcription factor family / H. Negishi, T. Taniguchi, H. Yanai // *Cold Spring Harbor perspectives in biology.* – 2018. – V. 10, №11. – P. a028423.
132. Nguyen-Jackson H.T., G-CSF receptor structure, function, and intracellular signal transduction / H.T. Nguyen-Jackson, H. Zhang, S.S. Watowich // *Twenty Years of G-CSF.* – Springer, Basel, 2012. – P. 83-105.
133. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood / L. Ziegler-Heitbrock, P. Ancuta, S. Crowe, et al // *Blood.* – 2010. – V. 116, №16. – P. e74-e80.
134. Noris, M. Overview of complement activation and regulation / M. Noris, G. Remuzzi // *Semin Nephrol.* 2013. – V. 33, №6. – P. 479-492.
135. Okamoto H., From insulin synthesis to secretion: Alternative splicing of type 2 ryanodine receptor gene is essential for insulin secretion in pancreatic  $\beta$  cells / H. Okamoto, S. Takasawa, Y. Yamamoto // *The international journal of biochemistry & cell biology.* – 2017. – V. 91. – P. 176-183.

136. Ouyang W., IL-10 family cytokines IL-10 and IL-22: from basic science to clinical translation / W. Ouyang, A. O'Garra // *Immunity*. – 2019. – V. 50, №4. – P. 871-891.
137. Panopoulos A.D., Granulocyte colony-stimulating factor: molecular mechanisms of action during steady state and 'emergency'hematopoiesis / A.D. Panopoulos, S.S. Watowich // *Cytokine*. – 2008. – V. 42, №3. – P. 277-288.
138. Paralogs of common carp granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) have different functions regarding development, trafficking and activation of neutrophils / F. Katakura, K. Nishiya, A.S. Wentzel, et al. // *Frontiers in immunology*. – 2019. – V. 10. – P. 255.
139. Parker B.S., Antitumour actions of interferons: implications for cancer therapy / B.S. Parker, J. Rautela, P.J. Hertzog // *Nature reviews Cancer*. – 2016. – V. 16, №3. – P. 131.
140. Pattern recognition receptors and the host cell death molecular machinery / G.P. Amarante-Mendes, S. Adjemian, L.M. Branco, // *Frontiers in immunology*. – 2018. – V. 9. – P. 2379.
141. Peng W. G-CSF treatment promotes apoptosis of autoreactive T cells to restrict the inflammatory cascade and accelerate recovery in experimental allergic encephalomyelitis / W. Peng // *Experimental neurology*. – 2017. – V. 289. – P. 73-84.
142. Peng W., Neuroprotective effects of G-CSF administration in microglia-mediated reactive T cell activation in vitro / W. Peng // *Immunologic research*. – 2017. – V. 65, №. 4. – P. 888-902.
143. Post-MI treatment with G-CSF and EPO-liposome with SLX repairs infarcted myocardium through EPC s mobilization and activation of prosurvival signals in rabbits / Y. Yamada, S. Minatoguchi, N. Endo, et al. // *Pharmacology Research & Perspectives*. – 2019. – V. 7, №1. – P. e00451.
144. Primary resistance to PD-1 blockade mediated by JAK1/2 mutations / D.S. Shin, J.M. Zaretsky, H. Escuin-Ordinas, et al. // *Cancer discovery*. – 2017. – V. 7, №2. – P. 188-201.

145. Probing the requirement for CD38 in retinoic acid-induced HL-60 cell differentiation with a small molecule dimerizer and genetic knockout / R.J. MacDonald, J.H. Shrimp, H. Jiang, et al. // *Scientific reports*. – 2017. – V. 7, №1. – P. 1-11.
146. Protection by and maintenance of CD4 effector memory and effector T cell subsets in persistent malaria infection / M.M. Opata, S.A. Ibitokou, V.H. Carpio, et al. // *PLoS pathogens*. – 2018. – V. 14, №4. – P. e1006960.
147. Rangarajan, S. T cell receptor bias for MHC: co-evolution or co-receptors? / S. Rangarajan, R.A. Mariuzza // *Cell Mol Life Sci*. – 2014. – V. 71, №16. – P. 3059-3068.
148. Rapid formulation assessment of filgrastim therapeutics by a thermal stress test / M. Alebouyeh, A. Tahzibi, S. Yaghoobzadeh, et al. // *Biologicals*. – 2016. – V. 44, №3. – P. 150-156.
149. Reengineering granulocyte colony-stimulating factor for enhanced stability / B. Bishop, D.C. Koay, A.C. Sartorelli, et al. // *Journal of Biological Chemistry*. – 2001. – V. 276, №36. – P. 33465-33470.
150. Regulation of granulocyte colony-stimulating factor receptor-mediated granulocytic differentiation by C-mannosylation / K. Otani, Y. Niwa, T. Suzuki, et al. // *Biochemical and biophysical research communications*. – 2018. – V. 498, №3. – P. 466-472.
151. Regulation of T-cell signaling by post-translational modifications in autoimmune disease / T. Kuwabara, Y. Matsui, F. Ishikawa, et al. // *International journal of molecular sciences*. – 2018. – V. 19, №3. – P. 819.
152. RIG-I uses an ATPase-powered translocation-throttling mechanism for kinetic proofreading of RNAs and oligomerization / S.C. Devarkar, B. Schweibenz, C. Wang, et al. // *Molecular cell*. – 2018. – V. 72, №2. – P. 355-368. e4.
153. Rodriguez P.C., Arginine metabolism in myeloid cells shapes innate and adaptive immunity / P.C. Rodriguez, A.C. Ochoa, A.A. Al-Khami // *Frontiers in immunology*. – 2017. – V. 8. – P. 93.
154. Role and analysis of monocyte subsets in cardiovascular disease / C. Weber, E. Shantsila, M. Hristov, et al. // *Thrombosis and haemostasis*. – 2016. – V. 116, №10. – P. 626-637.

155. Role of CD8 regulatory T cells versus Tc1 and Tc17 cells in the development of human graft-versus-host disease / A. Gutiérrez-Hoya, R. López-Santiago, J. Vela-Ojeda, et al. // *Journal of immunology research*. – 2017. – T. 2017.
156. Role of ceramide synthase 2 in G-CSF signaling and G-CSF-R translocation into detergent-resistant membranes / J. Kurz, J. Barthelmes, L. Blum, et al. // *Scientific reports*. – 2019. – V. 9, №1. – P. 1-14.
157. Role of the angiotensin-converting enzyme in the G-CSF-induced mobilization of progenitor cells / K. Kohlstedt, C. Trouvain, T. Frömel, et al. // *Basic research in cardiology*. – 2018. – V. 113, №3. – P. 18.
158. Role of the JAK/STAT signaling pathway in regulation of innate immunity in neuroinflammatory diseases / Z. Yan, S.A. Gibson, J.A. Buckley, et al. // *Clinical Immunology*. – 2018. – V. 189. – P. 4-13.
159. Rose-John S. Interleukin-6 family cytokines / S. Rose-John // *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. – 2018. – V. 10, №2. – P. a028415.
160. Ross S.H., Signaling and function of interleukin-2 in T lymphocytes / S.H. Ross, D.A. Cantrell // *Annual review of immunology*. – 2018. – V. 36. – P. 411-433.
161. Rossetti S., MiR-221-regulated KIT level by wild type or leukemia mutant RUNX1: a determinant of single myeloblast fate decisions that—collectively—drives or hinders granulopoiesis / S. Rossetti, M.J. Anauo, N. Sacchi // *Oncotarget*. – 2017. – V. 8, №49. – P. 85783.
162. Seledtsov, V.I. A balance between tissue-destructive and tissue-protective immunities: a role of toll-like receptors in regulation of adaptive immunity / V.I. Seledtsov, G.V. Seledtsova // *Immunobiology*. – 2012. – V. 217, №4. – P. 430-435.
163. Short-term regulation of FcγR-mediated phagocytosis by TLRs in macrophages: participation of 5-lipoxygenase products / C.D.S. Pinheiro, A.P.T. Monteiro, F.F. Dutra, et al. // *Mediators of inflammation*. – 2017. – V. 2017.
164. Singh V.K., Colony-stimulating factors for the treatment of the hematopoietic component of the acute radiation syndrome (H-ARS): a review / V.K. Singh, V.L. Newman, T.M. Seed // *Cytokine*. – 2015. – V. 71, №1. – P. 22-37.
165. STAT3 signaling in immunity / E.J. Hillmer, H. Zhang, H.S. Li, et al. // *Cytokine & growth factor reviews*. – 2016. – V. 31. – P. 1-15.

166. Strategies for empiric management of pediatric fever and neutropenia in patients with cancer and hematopoietic stem-cell transplantation recipients: a systematic review of randomized trials / P.D. Robinson, T. Lehrnbecher, R. Phillips, et al. // *Journal of Clinical Oncology*. – 2016. – V. 34, №17. – P. 2054-2060.
167. Structural basis of complement membrane attack complex formation / M. Serna, J.L. Giles, B.P. Morgan, et al. // *Nature communications*. – 2016. – V. 7, №1. – P. 1-7.
168. Sun J.C., Immunological memory within the innate immune system / J.C. Sun, S. Ugolini, E. Vivier // *The EMBO journal*. – 2014. – V. 33, №12. – P. 1295-1303.
169. Sweeten PAMPs: role of sugar complexed PAMPs in innate immunity and vaccine biology / R.S. Mahla, M.C. Reddy, D.V. Prasad, et al. // *Frontiers in immunology*. – 2013. – V. 4. – P. 248.
170. Systemic RNA delivery to dendritic cells exploits antiviral defence for cancer immunotherapy / L.M. Kranz, M. Diken, H. Haas, et al. // *Nature*. – 2016. – V. 534, №7607. – P. 396-401.
171. Szelag M., Advances in peptidic and peptidomimetic-based approaches to inhibit STAT signaling in human diseases / M. Szelag, J. Wesoly, H. AR Bluysen // *Current Protein and Peptide Science*. – 2016. – V. 17, №2. – P. 135-146.
172. Takata H., Functional heterogeneity of human effector CD8+ T cells / H. Takata, T. Naruto, M. Takiguchi // *Blood*. – 2012. – V. 119, №6. – P. 1390-1398.
173. Targeting few to help hundreds: JAK, MAPK and ROCK pathways as druggable targets in atypical chronic myeloid leukemia / S. Rocca, G. Carrà, P. Poggio, et al. // *Molecular cancer*. – 2018. – V. 17, №1. – P. 40.
174. The generation of human innate lymphoid cells is influenced by the source of hematopoietic stem cells and by the use of G-CSF/ F. Moretta, F. Petronelli, B. Lucarelli, et al. // *European journal of immunology*. – 2016. – V. 46, №5. – P. 1271-1278.
175. The light and the dark sides of Interleukin-10 in immune-mediated diseases and cancer / J. Geginat, P. Larghi, M. Paroni, et al. // *Cytokine & growth factor reviews*. – 2016. – V. 30. – P. 87-93.

176. The pro-and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6 / J. Scheller, A. Chalaris, D. Schmidt-Arras, et al. // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*. – 2011. – V. 1813, №5. – P. 878-888.
177. The role of IL-17 and related cytokines in inflammatory autoimmune diseases / T. Kuwabara, F. Ishikawa, M. Kondo, et al. // *Mediators of inflammation*. – 2017. – V. 2017.
178. The role of STAT3 in glioblastoma progression through dual influences on tumor cells and the immune microenvironment / N. Chang, S.H. Ahn, D.S. Kong, et al. // *Molecular and cellular endocrinology*. – 2017. – V. 451. – P. 53-65.
179. The roles of CSF s on the functional polarization of tumor-associated macrophages / P. Jeannin, L. Paolini, C. Adam, et al. // *The FEBS journal*. – 2018. – V. 285, №4. – P. 680-699.
180. The structural basis for class II cytokine receptor recognition by JAK1 / R. Ferrao, H.J. Wallweber, H. Ho, et al. // *Structure*. – 2016. – V. 24, №6. – P. 897-905.
181. Therapeutic targeting of the G-CSF receptor reduces neutrophil trafficking and joint inflammation in antibody-mediated inflammatory arthritis / I.K. Campbell, D. Leong, K.M. Edwards, et al. // *The Journal of Immunology*. – 2016. – V. 197, №11. – P. 4392-4402.
182. Toghraie F.S., Homology Modeling of an Alternative Splice Variant of Human Granulocyte Colony-Stimulating Factor, G-CSF Isoform D, and Study of Its Binding Properties by Molecular Docking / F.S. Toghraie, A. Ghaderi, A. Ramezani // *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*. – 2019. – P. 1-9.
183. Tompa A., Subsets of CD4+, CD8+, and CD25hi lymphocytes are in general not influenced by isolation and long-term cryopreservation / A. Tompa, A. Nilsson-Bowers, M. Faresjö // *The Journal of Immunology*. – 2018. – V. 201, №6. – P. 1799-1809.
184. Touw I.P., Granulocyte colony-stimulating factor and its receptor in normal myeloid cell development, leukemia and related blood cell disorders / I.P. Touw, G.J. van de Geijn // *Front Biosci*. – 2007. – V. 12, №1. – P. 800-15.
185. Transcriptional signature of human pro-inflammatory TH 17 cells identifies reduced IL10 gene expression in multiple sclerosis / D. Hu, S. Notarbartolo, T. Croonenborghs, et al. // *Nature communications*. – 2017. – V. 8, №1. – P. 1-14.

186. Trumpp A., Awakening dormant haematopoietic stem cells / A. Trumpp, M. Essers, A. Wilson // *Nature Reviews Immunology*. – 2010. – V. 10, №3. – P. 201-209.
187. Unique phenotypes and clonal expansions of human CD4 effector memory T cells re-expressing CD45RA / Y. Tian, M. Babor, J. Lane, et al. // *Nature communications*. – 2017. – V. 8, №1. – P. 1-13.
188. Van den Broek T., The full spectrum of human naive T cells / T. Van den Broek, J.A.M. Borghans, F. van Wijk // *Nature Reviews Immunology*. – 2018. – V. 18, №6. – P. 363-373.
189. Van Dyken S.J., Interleukin-4-and interleukin-13-mediated alternatively activated macrophages: roles in homeostasis and disease / S.J. Van Dyken, R.M. Locksley // *Annual review of immunology*. – 2013. – V. 31. – P. 317-343.
190. Vascular Morphogenesis in the Context of Inflammation: Self-Organization in a Fibrin-Based 3D Culture System / B.M. Rüger, T. Buchacher, A. Giurea, et al. // *Frontiers in physiology*. – 2018. – V. 9. – P. 679.
191. Vitamin D modulates the expression of HLA-DR and CD38 after in vitro activation of T-cells / S. Villegas-Ospina, W. Aguilar-Jimenez, S.M. Gonzalez, et al. // *Hormone molecular biology and clinical investigation*. – 2017. – V. 29, №3. – P. 93-103.
192. Wang X.J., Therapeutic use of filgrastim for established febrile neutropenia is cost effective among patients with solid tumors and lymphomas / X.J. Wang, W.X. Tong, A. Chan // *Clinical therapeutics*. – 2017. – V. 39, №6. – P. 1161-1170.
193. Wiggins B.G. Phenotypic and functional characterisation of CD4+ T cells in the human liver: дис. – University of Birmingham, 2018.
194. Wright C.R., Granulocyte colony-stimulating factor and its potential application for skeletal muscle repair and regeneration / C.R. Wright, A.C. Ward, A.P. Russell // *Mediators of inflammation*. – 2017. – V. 2017.
195. Würfel W. G-CSF and GM-CSF: Clinical Applications in Reproductive Medicine / W. Würfel // *In Vitro Fertilization*. – Springer, Cham, 2019. – P. 751-763.
196. Wynn T.A., Macrophages in tissue repair, regeneration, and fibrosis / T.A. Wynn, K.M. Vannella // *Immunity*. – 2016. – V. 44, №3. – P. 450-462.

197. Yatim N., Dying cells actively regulate adaptive immune responses / N. Yatim, S. Cullen, M.L. Albert // *Nature Reviews Immunology*. – 2017. – V. 17, №4. – P. 262.
198. Yong C. Enhancing adoptive immunotherapy: redirecting immune subsets and metabolic pathways: Дис. – 2017.
199. Yu H., Harnessing the power of regulatory T-cells to control autoimmune diabetes: overview and perspective / H. Yu, R. Paiva, R.A. Flavell // *Immunology*. – 2018. – V. 153, №2. – P. 161-170.
200. Zarour H.M. Reversing T-cell dysfunction and exhaustion in cancer. / H.M. Zarour // *Clin Cancer Res*. – 2016. – V. 22, №8. – P. 1856-64.
201. Zhang P., Interleukin-10 mediated immune regulation after stem cell transplantation: Mechanisms and implications for therapeutic intervention / P. Zhang, G.R. Hill // *Seminars in immunology*. – Academic Press, 2019. – P. 101322.
202. Zhu J., T helper 2 (Th2) cell differentiation, type 2 innate lymphoid cell (ILC2) development and regulation of interleukin-4 (IL-4) and IL-13 production / J. Zhu // *Cytokine*. – 2015. – V. 75, №1. – P. 14-24.
203. Ziegler-Heitbrock L., Blood monocytes and their subsets: established features and open questions / L. Ziegler-Heitbrock // *Frontiers in immunology*. – 2015. – V. 6. – P. 423.