

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение  
высшего профессионального образования «Балтийский федеральный университет  
имени Иммануила Канта»

На правах рукописи

Меняйло Максим Евгеньевич  
**ИНТЕРЛЕЙКИН-8 В РЕГУЛЯЦИИ АДАПТИВНОГО  
ИММУНОГЕНЕЗА**

03.03.01 – физиология

Диссертация  
на соискание ученой степени кандидата  
медицинских наук

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

Калининград - 2018

## ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ .....</b>	<b>3</b>
<b>ВВЕДЕНИЕ .....</b>	<b>5</b>
<b>ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....</b>	<b>11</b>
1.1. Естественные механизмы иммунной защиты.....	11
1.2. Адаптивные механизмы иммунной защиты .....	16
1.2.2. Моноциты/макрофаги в адаптивных иммунных реакциях .....	17
1.2.3. Адаптивный антигензависимый лимфопоз .....	20
1.3. Интерлейкин-8 в системе хемокинов, регулирующих иммуногенез .....	26
1.4. Заключение.....	34
<b>ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ .....</b>	<b>34</b>
2.1. Объект и материал исследования .....	35
2.2. Методы исследования .....	35
2.2.1. Выделение моноклеарных клеток из периферической крови.....	37
2.2.2. Выделение CD14 <sup>+</sup> и CD3 <sup>+</sup> клеток .....	38
2.2.3. Подсчет CD14 <sup>+</sup> и CD3 <sup>+</sup> клеток, определение их чистоты и жизнеспособности. ....	39
2.2.4. Культивирование CD14 <sup>+</sup> и CD3 <sup>+</sup> клеток. ....	39
2.2.5. Проточная цитофлуориметрия моноцитов/макрофагов .....	41
2.2.6. Проточная цитофлуориметрия Т-лимфоцитов .....	41
2.2.7. Определение концентраций про- и противовоспалительных цитокинов .....	42
2.2.8. Методы статистического анализа данных .....	42
<b>ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ .....</b>	<b>43</b>
3.1. Чистота и жизнеспособность CD14 <sup>+</sup> и CD3 <sup>+</sup> клеток. ....	44
3.2. Влияние IL-8 на функциональные свойства моноцитов/макрофагов. ....	46
3.2.1. Влияние IL-8 на поверхностные свойства моноцитов/макрофагов.....	46
3.2.2. Влияние IL-8 на секрецию цитокинов моноцитами/макрофагами.....	52
3.3. Влияние IL-8 на Т-клеточный адаптогенез.....	55
3.3.1. Влияние активации и IL-8 на экспрессию рецептора к IL-8 на Т-лимфоцитах и на Т-клеточную продукцию IL-8.....	55
3.3.2. Прямое влияние IL-8 на субпопуляционный состав Т-лимфоцитов .....	63
3.3.3. Прямое влияние IL-8 на активацию Т-лимфоцитов .....	68
3.3.4. Влияние IL-8 на Т-клеточную продукцию цитокинов .....	82
<b>ОБСУЖДЕНИЕ .....</b>	<b>85</b>
<b>ВЫВОДЫ .....</b>	<b>91</b>
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....</b>	<b>92</b>

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

CXCL8/IL-8 – интерлейкин 8 (interleukin-8)

IL – интерлейкин (interleukin)

Мц – моноциты

Мф – макрофаги

NF-κB – транскрипционный ядерный фактор «каппа би» (nuclear factor kappa B)

CXCR1 – α-рецептор интерлейкина-8 (C-X-C chemokine receptor type 1)

CXCR2 – β-рецептор интерлейкина-8 (C-X-C chemokine receptor type 2)

PI3K – фосфоинозитид-3-киназа (Phosphoinositide 3-kinase)

PLC – фосфолипаза C (phospholipase C)

PKC – протенкиназа C (protein kinase C)

PKB/Akt – протеинкиназа B (protein kinase B)

МАРК – митоген-активированная протеинкиназа (mitogen-activated protein kinase)

CD45RA – высокомолекулярная изоформа CD45

CD197/CCR7 –рецептор C-C хемокина 7

CD25 – α субъединица рецептора интерлейкина 2

CD38 – мультифункциональный эктофермент

CD119 – рецептор 1 к интерферону гамма

CD124 – рецептор к интерлейкину 4

TNF-α – фактор некроза опухоли α (tumor necrosos factor α)

CD3 – корецептор Т-клеточного рецептора

CD14 – мембранный белок, экспрессированный на клетках миелоидного ряда

CD4<sup>+</sup> – популяция Т-клеток, несущие молекулу CD4 (CD4-позитивные)

CD4<sup>-</sup> – популяция Т-клеток, не экспрессирующие молекулу CD4 (CD4-негативные)

CD16 – низкоаффинный Fc-рецептор (Fc-гаммаRIII)

Ig – иммуноглобулин (immunoglobulin)

ДК – дендритные клетки

fMLP – внутриклеточный пептид (N-formylmethionyl-leucyl-phenylalanine receptor)

PAMP – патоген ассоциированный молекулярный паттерн (Pathogen-associated molecular pattern)

PRR – паттерн распознающий рецептор (pattern recognition receptor)

IRF – регуляторный фактор интерферона (interferon regulatory factor)

MyD88 – цитозольный адаптерный белок (myeloid differentiation primary response gene (88))

TIR – внутриклеточный адаптерный белок (toll-interleukin 1 receptor)

MHC – главный комплекс гистосовместимости (major histocompatibility complex)

CCL19 – C-Схемокин 19 (chemokine (C-C motif) ligand 19)

CCL21 – C-C хемокин 21 (chemokine (C-C motif) ligand 21)

TLR – Toll-подобный рецептор (Toll-like receptor)

IFN – интерферон (interferon)

TGF- $\beta$  – трансформирующий ростовой фактор- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ )

АПК - антиген-презентирующие клетки

Th 1/2 – Т-хелперы  $\frac{1}{2}$  типа (T-helper  $\frac{1}{2}$ )

ЛПС – липополисахарид

MALT – лимфоидная ткань (mucosal-associated lymphoid tissue)

CD40 – костимулирующий белок АПК

CD154 (CD40L) –лиганд CD40

B7 – костимулирующая молекула дендритных клеток

CD28 – костимулятор активации Т-клеток

LRR – богатые лейцином последовательности (leucine-rech repeat)

IRF – регуляторный фактор интерферона (interferon regulatory factor)

FoxP3 – белок, вовлеченный в иммунные реакции, транскрипционный фактор (forkhead box P3)

HLA - лейкоцитарный антиген человека (human leukocyte antigen)

TCR – антигенраспознающий рецептор Т-лимфоцитов (T-cell receptor)

## ВВЕДЕНИЕ

### **Актуальность темы исследования и степень ее разработанности**

Воспаление лежит в основе широкого спектра физиологических и патологических процессов, направленных на первичную элиминацию патогена и на восстановление гомеостаза организма (Medzhitov R., 2008; Черешнев А.А., 2001). Эффективность адаптивного иммунного ответа зависит от адекватной и своевременной реакции многокомпонентной иммунной системы организма на антиген (Chaplin D.D., 2010). Цитокины и хемокины играют ключевую роль в автономном механизме регуляции, как воспаления, так и адаптивных иммунных процессов (Кетлинский С.А., Симбирцев А.С., 2008; Zhang J.M., An J., 2007). Интерлейкин-8 (IL-8) - относится к группе CXС хемокинов, состоит из 72 и 77 аминокислот, имеет молекулярную массу 8-10 кДа. Ген IL-8 располагается в 4 хромосоме между 4q12 и 4q21 (Brat D.J. et al., 2005). В продукции IL-8 участвуют моноциты/макрофаги (Мц/Мф), фибробласты, лимфоциты, клетки эндотелия и гладкой мускулатуры (Bickel M., 1993; Hedges J.C. et al., 2000). Секреция IL-8 регулируется белками-активаторами, фактором транскрипции NF-κВ, провоспалительными цитокинами и стероидными гормонами. (Waugh D.J.J., Wilson C., 2008). IL-8 распознается рецепторами CXCR1 и CXCR2, которые экспрессируются на нейтрофилах, Мц/Мф и Т-лимфоцитах (Dixit N., Simon S.I., 2012; Becker S. et al., 1994; Lippert U. et al., 2004). CXCR1 и CXCR2 являются G-белок-связанными рецепторами, которые, после контакта с IL-8 способствуют активации фосфотидил-инозитол-3-киназы (PI3K) и фосфолипазы-С (PLC), что приводит к активации протеинкиназы В (PKB/Akt) и протеинкиназы С (PKC), мобилизации ионов кальция и MAPK каскадов. Эти реакции оказывают влияние на белковый синтез и регулируют активность различных транскрипционных факторов (Casilli F. et al., 2005; Waugh D.J.J., Wilson C., 2008). CXCR1 и CXCR2 различаются по степени экспрессии и аффинностью к IL-8, CXCR1 связывает только IL-8, тогда как CXCR2 связывает также некоторые другие α-хемокины (Nasser M.W. et al., 2009; Raghuwanshi S.K. et al., 2012). IL-8 индуцирует

хемотаксис гранулоцитов, Мц/Мф и лимфоцитов в очаг воспаления. IL-8 активирует гранулоциты и стимулирует их дегрануляцию в очаге воспаления, а также способствует выработке цитокинов мононуклеарными клетками (Zheng M. et al., 1998; Köhidai L., Csaba G., 1998; de Oliveira S. et al., 2013).

Иммунорегуляторная роль IL-8, не ограничивается стимуляцией миграции иммунокомпетентных клеток и активацией врожденных эффекторных иммунных функций. Есть основания предполагать, что IL-8 способен прямо влиять на функциональную активность Мц/Мф и Т-лимфоцитов, и тем самым, оказывать значимое регуляторное воздействие на адаптивный иммуногенез не только на ранних, но и на поздних этапах его развития. Мц/Мф играют важную роль в инициации вторичных иммунных реакций. Анализ поверхностных маркеров CD16 (низкоаффинный Fc-рецептор), CD119 (рецептор IFN- $\gamma$ ), CD124 (рецептор IL-4), CD197 (C-C-рецептор хемокина 7) на Мц/Мф дает возможность определить их активационный статус и направленность их функциональной активности. Хелперную направленность, силу и продолжительность антиген-индуцированных иммунных реакций определяют антиген-специфические Т-лимфоциты. Анализ экспрессии поверхностных маркеров CD45RA (общий лейкоцитарный антиген) и CD197 на Т-лимфоцитах позволяет выделить наивные Т-лимфоциты, Т-клетки памяти и эффекторные Т-клетки (Зурочка А.А., и др., 2013; Кудрявцев И.В и др., 2014; Zhu J. et al., 2010). Экспрессия CD25 ( $\alpha$ -цепь рецептора IL-2) и CD38 (циклическая ADP рибозогидролаза) молекул характеризует активационный статус Т-клеток.

Большая значимость IL-8 в генерации воспаления вызывает живой интерес у многих исследователей. Однако, до сих пор, исследования были преимущественно сосредоточены на роли IL-8 в регуляции врожденного иммунитета. Предполагается, что IL-8 не только участвует в регуляции локальных и системных воспалительных иммунных реакций, но и может воздействовать на генерацию долговременной иммунной памяти, и таким, образом, играть значимую роль в адаптивном иммуногенезе. Это влияние может опосредоваться прямыми эффектами IL-8 как на функции Мц/Мф, так и на Т-клеточный

иммуногенез. Подтверждению (или опровержению) этой закономерности и посвящена данная работа.

**Цель работы** - исследовать прямые эффекты IL-8 на активацию и функциональные свойства моноцитов/макрофагов и Т-лимфоцитов человека.

В соответствии с указанной целью решались следующие **задачи**:

1. Охарактеризовать прямые эффекты IL-8 на активационный статус моноцитов/макрофагов.
2. Оценить влияние IL-8 на моноцитарно/макрофагальную продукцию IL-10, IL-6, IL-1 $\beta$  и TNF- $\alpha$ .
3. Охарактеризовать экспрессию рецептора к IL-8 на покоеющихся и активированных Т-клетках.
4. Исследовать прямые эффекты IL-8 на активацию Т-клеточных субпопуляций.
5. Оценить влияние IL-8 на продукцию Т-лимфоцитами провоспалительных (IFN- $\gamma$ , IL-2) и противовоспалительных цитокинов (IL-4, IL-10).

### **Научная новизна**

Впервые показано, что IL-8, добавленный в культуру Мц/Мф вместе с ЛПС способен заметно увеличивать среди активированных Мц/Мф количество клеток, экспрессирующих CD119 и снижать содержание клеток, экспрессирующих CD124. Представлены данные, свидетельствующие о том, что IL-8 может содействовать миграции вовлеченных в иммуногенез Мц/Мф в лимфоидные органы и, тем самым, способствовать генерализации и интенсификации адаптивных иммунных процессов. Впервые показано, что активация Т-лимфоцитов сопровождается приростом клеток, экспрессирующих рецептор IL-8 (CXCR1, CD181), среди наивных и терминально дифференцированных CD4-позитивных (CD4<sup>+</sup>) Т-клеток и снижением таких клеток среди CD4-позитивных Т-лимфоцитов эффекторной памяти. Экзогенный IL-8 способен поддерживать жизнеспособность эффекторных CD4-позитивных и CD4-негативных (CD4<sup>-</sup>) Т-клеток и за счет этого снижать

относительное количество наивных Т-лимфоцитов. Также впервые показана способность IL-8 избирательно снижать, оцениваемую по экспрессии CD25, активацию высокодифференцированных CD197-негативных Т-клеток, которые утратили способность мигрировать в лимфоидные органы и подвергаться там размножению. Установлено, что IL-8 усиливает продукцию активированными Т-клетками IL-2 и снижает секрецию IL-10.

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

Полученные фундаментальные данные впервые четко очерчивают значимость IL-8 в механизме регуляции адаптивного иммуногенеза. Показано, что IL-8 является как активатором эффекторных иммунных функций, так и, за счет прямого влияния на Мц/Мф и Т-клетки оказывает позитивное влияние на формирование иммунной памяти. С практической точки зрения, воздействия, направленные на модуляцию секреции или регуляцию биологической активности IL-8, могут найти применение в лечении широкого спектра заболеваний, в основе которых лежат иммунопатологические расстройства.

Результаты диссертационной работы используются в учебном процессе в центре медицинских биотехнологий БФУ им. И.Канта.

### **Методология и методы диссертационного исследования**

Согласно поставленным задачам, были выбраны современные высокоинформативные методы исследования, которые позволяют детально охарактеризовать функциональное состояние иммунокомпетентных клеток. В качестве объекта исследования использовались первичные культуры Мц/Мф и Т-лимфоцитов, полученные из взвеси мононуклеарных клеток периферической венозной крови здоровых доноров.

### **Основные методы исследования**

1. Выделение мононуклеарных клеток (МНК) методом градиентного центрифугирования на фиколле.



2. Позитивная магнитная колоночная сепарация (получение CD14 и CD3-позитивных клеток из взвеси МНК условно здорового донора).
3. Культуральные методы исследования.
4. Оценка жизнеспособности и функциональной активности клеток. Определение мембранных маркеров (CD4, CD3, CD25, CD38, CD197, CD45RA, CD14, CD16, CD119, CD124) методом проточной цитофлуориметрии.
5. Оценка концентрации цитокинов (IL-10, IL-4, IL-2, IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ ) в супернатантах клеточных культур.
6. Статистический анализ результатов.

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

1. IL-8 играет значимую роль в аутокринной и паракринной регуляции функциональной активности моноцитов/макрофагов. Он поддерживает провоспалительную (M1) активность Мц/Мф и их миграцию в лимфоидные органы.
2. IL-8 вовлечен в паракринную и аутокринную регуляцию ростовой, дифференцировочной и функциональной активности разных Т-клеточных субпопуляций. IL-8 препятствует развитию избыточных Т-клеточных реакций на периферии, а также содействует развитию адаптивных Т-клеточных процессов, формирующих иммунную память.

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

Высокая степень достоверности полученных результатов основывается достаточным объемом экспериментального материала, использованием современных методов (проточная цитофлуориметрия, иммуномагнитная сепарация, культуральные методы, иммуноферментный анализ) исследования и высокотехнологичного оборудования, а также адекватных критериев для статистической обработки результатов.

Основные положения диссертации докладывались и обсуждались на XV Всероссийском научном форуме с международным участием им. Академика В.И. Иоффе «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге» (г. Санкт-Петербург, 2015 г.); 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 с международным участием конференции «Научные биомедицинские технологии: от фундаментальных исследований до внедрения» (г. Пермь, 2016 г.); VII Всероссийском симпозиуме с международным участием «Актуальные вопросы тканевой и клеточной трансплантологии» (г. Астрахань, 2017 г.); XXIII съезде физиологического общества им. И.П. Павлова (г. Воронеж, 2017 г.).

### **Публикации**

По материалам диссертации опубликовано 14 научных работ, из них 5 полнотекстовых статей в ведущих рецензируемых журналах и изданиях, определенных ВАК РФ и 9 статей и тезисов в материалах конференций и симпозиумов.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертация изложена на 115 страницах машинописного текста и состоит из введения, четырех глав, выводов и списка использованной литературы. Работа иллюстрирована 67 рисунками и 3 таблицами. Библиографический указатель включает 234 источника (22 отечественных и 212 иностранных).

### **Личный вклад автора**

Автор принимал непосредственное участие в разработке дизайна и планировании исследования. Результаты получены, проанализированы и обобщены в выводах и положениях автором лично.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Основная способность иммунной системы заключается в поддержании постоянства внутренней среды и целостности организма посредством удаления чужеродных агентов и генетически модифицированных клеток. Общепринятым является разделение иммунитета на неспецифический (врожденный) и адаптивный (приобретенный) (Ярилин А.А., 2010; Хаитов Р.М., 2016; Janeway C.A. et al., 2001).

### 1.1. Естественные механизмы иммунной защиты

Врожденный (естественный, наследственный) иммунитет – это генетически закрепленная невосприимчивость организма к микробам и другим патогенным воздействиям, которая сформировалась вне зависимости от антигенной специфичности патогена (Мальцев В.Н., Иванов А.А., 2016; Литвицкий П.Ф., Синельникова Т.Г., 2009).

Главной стратегией врожденного иммунитета является не распознавание каждого возможного антигена, а фокусировка на нескольких высоко консервативных структурах, присутствующих в больших группах микроорганизмов. Этими структурами являются патоген-ассоциированные молекулярные образы (PAMP- pathogen-associated molecular pattern), которые распознаются соответствующими рецепторами врожденной системы (PRR-pattern recognition receptor) (Меджитов Р., Джаневей Ч., 2004; Janeway C.A., 1989). PAMP представлены бактериальными липополисахаридами, пептидогликанами, маннанами, липотейхоевой кислотой, бактериальной ДНК, двухспиральной РНК, а также глюканами. У всех PAMP, не зависимо от химического строения есть общие свойства (Janeway C.A., 1992; Medzhitov R., Janeway C.A., 1997), что делает возможным их распознавание небольшим количеством разных рецепторов. Все PAMP образуются только микробами, а не их хозяином, следовательно, при взаимодействии с рецептором происходит передача сигнала клеткам о наличии в

организме именно инфекции. Так как PAMP являются жизненно важными для патогенов, они генетически консервативны и не исчезают в процессе эволюции. Разные группы микроорганизмов могут нести сходные PAMP (Меджитов Р., Джаневей Ч., 2004), и это делает врожденный иммунитет эффективным в защите против разных патогенов.

Рецепторы врожденной иммунной системы экспрессируются на всех иммунокомпетентных клетках. В зависимости от выполняемых функций, PRR разделены на три класса: секретируемые, эндоцитозные и сигнальные рецепторы. Секретируемые PRR по своей функции являются опсонинами, которые помечают патогенные клетки для последующего распознавания системой комплемента и фагоцитами, например, маннансвязывающий лектин, который связывается с микробными углеводами и инициирует лектиновый путь активации комплемента (Epstein J. et al., 1996; Fraser I.P. et al., 1998). Эндоцитозные PRR находятся на клеточной поверхности фагоцитов. После связывания с PAMP, опосредуют поглощение патогена и его доставку к лизосомам. После разрушения, происходит процессинг белков патогена, образовавшиеся, в результате чего пептиды презентруются молекулам главного комплекса гистосовместимости (МНС) на поверхности Мф. Основным представителем эндоцитозных PRR является маннозный рецептор Мф, он высокоспецифичен к углеводам микроорганизмов с большим числом манноз и опосредует их фагоцитоз (Fraser I.P. et al., 1998). Макрофагальный рецептор-мусорщик выступает в качестве компонента вывода патогенов из кровообращения (Suzuki H. et al., 1997; Thomas C.A. et al., 2000). Сигнальные PRR после контакта с PAMP приводят к активации различных сигнальных путей, приводящих к экспрессии разнообразных генов иммунного ответа (Меджитов Р., Джаневей Ч., 2004). К ним относятся Toll-подобные рецепторы (TLR), NOD-подобные рецепторы. Существует 10 вариантов TLR у человека, они относятся к трансмембранным рецепторам первого типа, состоящих из 18-25 копий богатых лейцином повторностей (LRR) и TIR доменов (Herrin B.R., Cooper M.D., 2010). LRR домен располагается во внеклеточной части молекулы TLR, состоит из 24-29 аминокислотных остатков (Ярилин А.А., 2010).

Последовательность цитоплазматического домена TIR по структуре схожа с внутриклеточным доменом рецептора IL-1 (Keith F.J., Gay N.J., 1990). В широком смысле слова, TLR можно разделить на две группы: TLR1, 2, 4, 5 и 6 экспрессируются на плазматической мембране, их функция заключается в определении бактериальных, грибковых и протозойных продуктов. TLR 3, 7 и 9 экспрессируются на мембране эндосом, LRR обращены в просвет, а TIR-домены направлены в цитозоль, их роль заключается в определении вирусных нуклеиновых кислот (Kang J.Y., Lee J.O., 2011). Все TLR, за исключением TLR3 осуществляют передачу сигнала через MyD88 к NF-κB, IRF и MAPK p38 (O'Neill L.A.J., Bowie A.G., 2007). TLR2 и TLR4 для взаимодействия с MyD88 используют мостиковый адаптер Mal. TLR3 проводит сигнал до NF-κB через Trif и IRF3. TLR4 может также проводить сигнал через Trif с помощью мостового адаптера Tram (Kawai T., Akira S., 2006). Активация TLR приводит к запуску NF-κB сигнального пути, приводящего к секреции различных цитокинов и костимуляторов, которые вовлечены в процессы адаптивного иммунитета (Medzhitov R., Janeway C.A., 1997).

К гуморальным факторам врожденного иммунитета относят систему комплемента, белки острой фазы, биогенные амины, липидные медиаторы, цитокины. Система комплемента является одним из основных механизмов, посредством которого происходит первичное распознавание и элиминация патогена (Walport M.J., 2001; Walport M.J. 2001 (2)). Она состоит из 35 мембранных и плазменных белков (Noris M., Remuzzi G., 2013). Активация системы может осуществляться непосредственно патогенными микроорганизмами или опосредовано через антитела, связанными с антигенами. В зависимости от типов патогенов, активацию комплемента можно осуществить 3-мя различными путями: классическим, альтернативным и лектин-зависимым (Abbas A.K. et al., 2010). Данный процесс приводит к запуску каскада реакций, происходящих на поверхности патогена, генерирующего активацию компонентов с различными эффекторными функциями (Nauta A.J. et al., 2003). Активированная система комплемента генерирует три основных типа эффекторов: (1)

анафилатоксины (C3a и C5a), которые являются мощными провоспалительными молекулами, они притягивают и активируют лейкоциты посредством взаимодействия с G-белок связанными рецепторами C3aR и C5aR соответственно; (2) опсонины (C3b, iC3b и C3d), покрывают поверхность клеток мишеней для более эффективного фагоцитоза; (3) мембран-атакующий комплекс (MAC, C5b-9), непосредственно лизирует целевые (опсонизированные) патогены или поврежденные клетки (Botto M. et al., 2009; Noris M., Remuzzi G., 2013).

Иммуноглобулины (Ig) формируют существенную часть белков крови. Они обеспечивают пожизненную защиту от инфекционных агентов. Ig важны для правильной опсонизации бактерий и последующего распознавания специфическим Fc-рецептором на поверхности фагоцитов (Elluru, S.R. et al., 2015). Существуют несколько подтипов Ig, которые проявляют специфические функции. Некоторые подклассы IgG связываются с различными Fc-рецепторами. Нормальные нейтрофилы периферической крови экспрессируют FcγRII (CD32) и FcγRIIIb (CD16) и не экспрессируют FcγRI (CD64), который обнаруживается на Мц. Однако, при системных инфекциях и сепсисе, нейтрофилы начинают экспрессировать CD64. Таким образом, исследование экспрессии FcγRI на нейтрофилах используют при анализе бактериальных инфекций (Fjaertoft G. et al., 2007; Venet F. et al., 2011). Большинство фагоцитов, включая нейтрофилы, экспрессируют специфический рецептор для IgA (FcαR или CD89). Наличие специфических IgA антител приводит к инициации FcR реакции, сравнимой с IgG-FcRII ответом. Но в отличие от IgG, IgA не активирует систему комплемента (Hogarth P.M., Pietersz G.A., 2012; Radaev S., Sun P., 2002).

Фагоцитоз – процесс поглощения других клеток, фрагментов клеток и микроорганизмов специализированными клетками, что приводит к лизису и элиминации, например, мертвых клеток после апоптоза, патогенов, бактерий (Gordon S., 2016). Эффективность фагоцитоза зависит от размера, формы частиц, их способностью к деформации, а также биологических параметров (Dalia A.B., Weiser J.N., 2011). Большой размер бактерии, естественные изменения в клеточной морфологии, опосредованная антителами агглютинация, способствуют

комплемент зависимой элиминации патогена (Dalia A.B., Weiser J.N., 2011; Pacheco P. et al., 2013).

Основными классами фагоцитарных клеток врожденной иммунной системы являются гранулоциты, Мц/Мф и дендритные клетки (ДК) (Silva M.T., Correia-Neves M., 2012; Segal A.W. et al., 1980). Ключевым типом клеток, вовлеченных в раннюю стадию взаимодействия с патогенами, являются нейтрофилы. Нейтрофилы способны поглощать до 50 бактерий, в результате чего, значительная площадь поверхности интернализуется при сохранении размера и формы клетки. Попаданию нейтрофилов в зону воспаления способствует хемокин-IL-8, который в основном продуцируется тканевыми Мф (Солодовникова О.Н., Молочный В.П., 2012). На поверхности бактерий присутствуют хемотаксические пептиды, называемые fMLP, они также действуют как хемоаттрактанты для нейтрофилов. Помимо этого, C5a и fMLP запускают важный процесс у нейтрофилов, называемый кислородным взрывом, который направлен на уничтожение патогенных микроорганизмов (Bogdan C. et al., 2000). Основным компонентом данного процесса является ферментный комплекс, называемый никотинамидадениндинуклеотидфосфат-оксидазой (NADPH, НАДФ). Данный комплекс также присутствует в Мф, он активируется либо G-белок-связанными рецепторами, которые распознают fMLP или C5a, либо в процессе фагоцитоза (Rezende F. et al., 2016). Конечный кислородный радикал, образующийся в нейтрофилах и Мф, представляет собой оксид азота. Он продуцируется ферментативной синтазой оксида азота, которая индуцируется цитокинами, например, IFN- $\gamma$  (Burgner D. et al., 1999; Klebanoff S.J. et al., 2013).

Мц/Мф являются основной популяцией фагоцитов, присутствующих практически во всех тканях организма. У людей 90% циркулирующих Мц представляют собой классическую популяцию, которая экспрессирует CD14 – корецептор для PRR. Другая популяция Мц - экспрессирует не только CD14, но и CD16, участвует в поддержании целостности эндотелия и не дифференцируется в тканевые Мф. Мф являются относительно долгоживущими клетками, они

вовлекаются в фагоцитоз и презентацию антигенов Т-лимфоцитам (Aderem A., Underhill D.M., 1999).

ДК обладают не только уникальной способностью индуцировать первичные иммунные ответы. Они также способны оказывать регуляторное влияние на врожденный иммунитет (Merad M. et al., 2013).

## **1.2. Адаптивные механизмы иммунной защиты**

Как уже было замечено, ДК играют ключевую роль в инициации первичных адаптивных иммунных реакций. ДК делят на классические (кДК), плазмацитоидные (пДК) и моноцитарные ДК (моДК). кДК специализируются на обработке антигена, также могут эффективно презентировать эндогенные и экзогенные антигены вместе с комплексами МНС-I и МНС-II. Особенностью кДК является их расположение в тканях, где происходит постоянный контакт с антигенами (Forster R. et al., 2012). кДК после взаимодействия с антигеном мигрируют в Т-зону лимфатических узлов, где контактируют с наивными Т-клетками (Banchereau J., Steinman R.M., 1998). Миграция кДК является CCR7 зависимой (Forster R. et al., 1999). кДК также могут использовать CCL19 и CCL21 – те же самые хемокины, что и Т-клетки. пДК присутствуют главным образом в крови и лимфоидных тканях, экспрессируют низкие уровни МНС-II и костимулирующих молекул, а также низкие уровни интегрина CD11c. Они также экспрессируют небольшой диапазон PRR, которые включают TLR7 и TLR9. После распознавания чужеродных нуклеиновых кислот, клетки начинают производить большое количество IFN-типа I и приобретают способность презентировать чужеродные антигены компонентам адаптивного иммунитета (Reizis B. et al., 2011; Reizis B., 2010).

Инициация адаптивного иммунного ответа происходит после перегрузки патогеном врожденных защитных механизмов (недостаточной эффективности врожденного иммунитета) (Murphy K., Weaver C., 2016). В основе адаптивного иммунитета лежит реактивность Т- и В-лимфоцитов. Зрелые рециркулирующие



Т-клетки, которые еще не встречались с их специфическими антигенами, обозначают как наивные Т-клетки. Для участия в адаптивном иммунном ответе, наивная Т-клетка должна распознать специфичный антиген, представленный на мембране в виде комплекса с продуктом МНС (Koch U., Radtke F., 2011). Контакт с данным комплексом индуцирует пролиферацию, дифференцировку Т-клеток. В результате этого процесса формируются Т-клетки центральной памяти, Т-клетки эффекторной памяти и терминально-дифференцированные Т-эффекторы (Meniailo M.E. et al., 2017). В то время как врожденная иммунная система полагается на неспецифические рецепторы распознавания патогенов, адаптивная иммунная система использует репертуар высокоспецифических рецепторов (Ярилин А.А., 2010; Rangarajan S., Mariuzza R.A., 2014). Клональная экспансия антиген-специфических лимфоцитов усиливает защиту от повторного заражения патогеном, экспрессирующим соответствующий антиген и формирует иммунную память (Farber D.L. et al., 2014; Sun J.C. et al., 2014).

### **1.2.2. Моноциты/макрофаги в адаптивных иммунных реакциях**

Неоднородность Мц/Мф обусловлена их мембранным фенотипом и функциональными особенностями. Общепринято деление Мц в зависимости от экспрессии на их поверхности низкоаффинного рецептора Fcγ CD16 и корецептора липополисахарида CD14 на две группы клеток: CD14<sup>hi</sup>/CD16<sup>-</sup>, CD14<sup>+</sup>/CD16<sup>+</sup> (Hiesmayr M.J. et al., 1999; Ziegler-Heitblock L., 2007). Клетки первого типа – классические Мц – представляют большинство Мц. Они отличаются от других Мц по форме и размеру (более крупные и с высокой плотностью). Они экспрессируют особые паттернраспознающие и скавенджер-рецепторы, которые опосредуют фагоцитоз разных микроорганизмов. Также клетки с фенотипом CD14<sup>hi</sup>/CD16<sup>-</sup> имеют высокую фагоцитарную и бактерицидную активность, они секретируют полный спектр провоспалительных цитокинов и экспрессируют на своей поверхности FcγR1 (CD64), хемотаксические рецепторы и β2-интегрины. (CD11b и CD18) (Ярилин А.А., 2010;

Хаитов Р.М., 2016; Zhou J. et al., 2015; Ziegler-Heitbrock L. et al., 2010; Ziegler-Heitbrock L., Hofer T.P.J., 2013; Grage-Griebenow E. et al., 2001; Moniuszko M. et al., 2009). Клетки с фенотипом  $CD14^+/CD16^+$  экспрессируют на своей поверхности МНСII, обладают слабой фагоцитарной, но выраженной антиген-презентирующей активностью, секретируют  $TNF-\alpha$ . Миграция Мц в ткани сопровождается их превращением в разнообразные формы Мф и ДК. (Ziegler-Heitbrock L. et al., 2010; Hiesmayr M. et al., 1999; Moniuszko M. et al., 2009).

Мф делятся на резидентные и воспалительные. Резидентные Мф, не связаны с воспалением, они возникают в результате спонтанной миграции Мц из кровотока в ткани. (Ziegler-Heitbrock L. et al., 2010) Основная роль резидентных Мф состоит в поддержании гомеостаза, а также выполнению ряда иммунорегуляторных и морфогенетических функций, не связанных с воспалительным процессом. Они участвуют в разрушении старых клеток, а также выступают в роли антигенпрезентирующих клеток (АПК). Хемокином для резидентных Мф является фракталин (Ярилин А.А., 2010).

Воспалительные Мф формируются из Мц, мигрировавших в воспалительный очаг из кровотока под действием хемокинов. Эти Мф обладают высокой фагоцитарной активностью, продуцируют цитокины и гуморальные вещества, важные для развития и поддержания воспаления. Мц/Мф способны вырабатывать цитокины семейства  $IL-1$ , другие провоспалительные цитокины ( $TNF-\alpha$ ,  $IL-6$ ,  $IL-12$ ,  $IL-23$ ,  $IL-27$ ), а также иммуносупрессорные цитокины ( $IL-10$ ,  $TGF-\beta$ ) (Симбирцев А.С., 2004). Кроме того, Мц/Мф являются основными продуцентами провоспалительных хемокинов в иммунной системе, включая  $IL-8$  (Ziegler-Heitbrock L. et al., 2010).

Вовлечение Мф в адаптивный иммуногенез неразрывно ассоциируется с процессом их активации. Классическая (M1) активация Мф требует два основных сигнала, которые предоставляют Т-хелперы 1 (Th1). Один сигнал опосредуется  $IFN-\gamma$ , другой – экспрессированным на мембране CD40L, или присутствующим в микроокружении липополисахаридом (ЛПС). Th1 клетки также секретируют лимфотоксин, который может заменить CD40L в M1 активации Мф. M1 Мф

обладают высокой противомикробной эффекторной функцией, они продуцируют оксид азота и TNF- $\alpha$  (Murray, P.J., Wynn T.A., 2011). CD8 Т-клетки также способны продуцировать IFN- $\gamma$  и могут стимулировать макрофагальную презентацию антигенных молекул в комплексе с молекулами МНС класса I. М1 Мф характеризуются повышенной экспрессией молекул МНСII, костимулирующей молекулой ДК - B7, CD40 и рецепторов TNF, что делает клетку более эффективной при презентации антигена к Т-клеткам и более чувствительной к CD40L и TNF- $\alpha$ . Кроме того, М1 Мф секретируют IL-12, который стимулирует Т-клеточную продукцию IFN- $\gamma$  (Чурова Е.Г. и др., 2016; Murray P.J. et al., 2014; Stout R.D. et al., 1996). Цитокины и хемокины, секретируемые самими М1 Мф, также важны при рекрутировании в иммуногенез других Мц (Stout R.D. et al., 1996).

В отличие от классически активированных М1 Мф, которые дифференцируются после взаимодействия с Th1 клетками и являются активаторами воспаления, Мф М2 участвуют в элиминации внеклеточных патогенов. Они также способствуют ремоделированию и репарации тканей. М1 и М2 Мф различаются по метаболизму аргинина. В то время, как М1 Мф экспрессируют NO-синтазу, которая вырабатывает оксид азота, М2 Мф экспрессируют аргиназу-1, которая продуцирует орнитин и пролин из аргинина. Орнитин увеличивает сократительную способность слизистых гладких мышц и способствует ремоделированию и репарации тканей (Saenz S.A. et al., 2010; Van Dyken S.J., Locksley R.M., 2013). М2 Мф участвуют в процессах элиминации паразитов и репарации поврежденных тканей, которая произошла в результате деятельности этих паразитов. Для образования коллагена требуется пролин, который вырабатывается при активации аргиназы-1. Таким образом М2 Мф могут играть значимую роль в образовании гранулем (Maizels R.M. et al., 2009; Liang, H.E. et al., 2012).

### 1.2.3. Адаптивный антигензависимый лимфопоз

Адаптивные иммунные реакции инициируются во вторичных лимфоидных органах – лимфатических узлах, селезенке и лимфоидных тканях слизистой (MALT). Условия, создаваемые данными тканями направлены на обеспечение взаимодействия Т и В-клеток с их специфическими антигенами – независимо от того, доставлен ли антиген ДК, либо он находится в свободной форме. Процессированные АПК антигенные пептиды, представленные, на мембране в комплексе с продуктами МНС I или II класса, запускают Т-клеточные реакции, тогда как антигенные детерминанты, экспрессированные на интактной антигенной молекуле, индуцируют В-клеточные реакции. Последующее взаимодействие антиген-реактивных Т- и В-лимфоцитов в лимфоидных органах – ключевой элемент в адаптивном иммуногенезе (Howard C.J. et al., 2004).

Наивные Т-клетки непрерывно рециркулируют из кровотока в лимфатические узлы, селезенку и MALT и обратно в кровь (Yoshino M. et al., 2003). Это позволяет им ежедневно контактировать с тысячами ДК и взаимодействовать с комплексами пептид-МНС на поверхности этих клеток (Itano A.A., Jenkins M.K., 2003). Из-за высокой скорости рециркуляции и обилия ДК, каждая наивная Т-клетка имеет высокую вероятность встретить антигены любого патогена (Caux C. et al., 2000). Через несколько часов после попадания в лимфоузел, наивные Т-клетки, не встретившие специфический антиген, выходят из лимфоидной ткани и снова поступают в кровоток, где они продолжают рециркулировать через эфферентные лимфатические узлы, MALT или через кровь в селезенку (Mackay C.R. et al., 1988). Когда наивная Т-клетка узнает свой специфический антиген на поверхности активированной ДК, она перестает мигрировать и остается в зоне Т-клеток, где она пролиферирует, подвергается клональной экспансии и дифференцировки, что приводит к образованию Т-клеток эффекторов и клеток памяти с такой же специфичностью к антигену (Yoshino M. et al., 2003; Picker L.J. Butcher E.C., 1993) В конце этого периода, большинство Т-эффекторов выходит из лимфатического органа и вновь попадает в кровоток, по

которому они мигрируют в места инфекции. Некоторые клетки – эффекторы, которые предназначены для взаимодействия с В-клетками, мигрируют в В-зоны, где участвуют в иммунном ответе в герминативном центре лимфатического узла. Точность и эффективность, с которой Т-клетки распознают антиген, очень высока, такая эффективность имеет решающее значение для инициации адаптивного иммунитета (Steptoe R.J. et al., 1999).

Доставка антигена из места проникновения в лимфоидную ткань активно стимулируется врожденным иммунитетом. Воспалительная реакция увеличивает скорость поступления плазмы крови в инфицированные ткани и, таким образом, увеличивает поступление внеклеточной жидкости, в лимфу принимая вместе с ней свободные антигены, которые переносятся в лимфоидные ткани (Miller M.J. et al., 2003; Germain R.N. et al., 2006). Контактирующие с антигеном ДК могут активироваться посредством взаимодействия их TLR с PRR, а также цитокинами, продуцируемыми в ответ на тканевое повреждение (Schlienger K. et al., 2000). Активированные ДК мигрируют в лимфатический узел, где они презентируют антигенные детерминанты и экспрессируют костимулирующие молекулы, необходимые для полномасштабной активации наивных антиген-специфических Т-клеток (Martín-Fontecha A. et al., 2009). Мф, которые содержатся в большинстве тканей, включая лимфоидную ткань, и В-клетки, которые расположены в основном в лимфоидной ткани, могут быть также активированы с помощью PRR для экспрессии костимуляторных молекул и активизации антигенпрезентирующей функции (Thery C., Amigorena S., 2001). Считается, что ДК эффективны в индукции как первичных, так и вторичных иммунных Т-клеточных реакций (Weisheit C.K. et al., 2015). Тогда, как В-клетки и Мф преимущественно специализируются на взаимодействии с Т-клетками, которые были уже ранее примированы ДК (Joffre O.P. et al., 2012; Chistiakov D.A. et al., 2015). Активированные ДК эффективно связываются с наивными Т-клетками через взаимодействие между гетеродимерным интегрином LFA-1 (рецептор к ICAM-1) и CD2 (рецептор к LFA-3) на Т-клетке и молекулами клеточной адгезии ICAM-1, ICAM-2 и CD58 (LFA-3) на ДК. Следует иметь в виду, что большинство

контактов Т-клеток с АПК не приводит к узнаванию антигена. В этом случае Т-клетка способна отделяться от АПК для последующей миграции через лимфоидную ткань, в конце концов, покидая ее, чтобы вновь войти в кровь и продолжить циркуляцию (Gunzer M. et al., 2000). Для активации Т-лимфоцита и его клональной экспансии необходимы 2 сигнала. Первый сигнал генерируется в результате взаимодействия комплекса молекул МНС/антигенный пептид с рецептором Т-клеток. (Bour-Jordan, H 2002). Корецепторы CD4 или CD8 стабилизируют это взаимодействие (Chen L., Flies D.B., 2013). Второй сигнал обеспечивается мембранной костимуляцией CD28, ICOS, CD40L(CD154). Активация Т-клеток приводит к дифференцировке, пролиферации и секреции цитокинов (IL-2, IL-6) в результате реализуются их эффекторные функции (Bour-Jordan H., Bluestone J.A., 2002; Smith-Garvin J.E. et al., 2009). Т-клеточная активация запускает синтез факторов транскрипции NFAT, AP-1 и NF-κB, которые связываются с промотерной областью гена IL-2 в наивных Т-клетках, для активации его транскрипции (Dolmetsch R.E. et al., 1997).

Другим рецептором для молекулы B7 является CTLA-4 (CD152), который связан с CD28. CTLA-4 связывает молекулу B7 примерно в 20 раз более сильно, чем CD28, но его эффективность заключается в том, чтобы ингибировать, а не активировать Т-клетку. CTLA-4 не содержит ITIM мотива (иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив) и участвует в ингибировании активации Т-клеток, конкурируя с CD28 для взаимодействия с молекулами B7, экспрессируемыми АПК (Greenwald R.J. et al., 2005).

Т-клетки делятся на два больших класса, один из которых несет на поверхности корецептор CD8, а другой – корецептор CD4. Все CD8<sup>+</sup> клетки дифференцируются в цитотоксические CD8<sup>+</sup> Т-лимфоциты (ЦТЛ), которые осуществляют уничтожение клеток мишеней. Они важны для защиты от внутриклеточных патогенов, особенно вирусов. Вирус-инфицированные клетки презентуют фрагменты вирусных белков в виде пептида с комплексом МНСI и данный пептид распознается ЦТЛ (Seder R.A., Ahmed R., 2003; Weninger W. et al., 2002). В отличие от CD8, CD4 Т-лимфоциты дифференцируются в несколько

субпопуляций эффекторных Т-клеток, которые управляют различными иммунными функциями. Основными функциональными подгруппами являются Th1, Th2, Th17, Tfh (Т-хелпер фолликулярный) и регуляторные Т-клетки – Treg (Якушина В.Д., и др., 2013). Субпопуляции Th1, Th2 и Th17 вызываются различными классами патогенов и определяются на основе различных групп цитокинов, которые они продуцируют (Хайдуков С.В., Зурочка А.В., 2011; Murphy K.M., Reiner S.L., 2002). По мере развития иммунного ответа, какая-либо из этих субпопуляций становится преобладающей, в зависимости от особенностей патогена и условий микроокружения (King C., 2009; Murphy K.M., Reiner S.L., 2002). Th1 клетки – характеризуются продукцией IFN- $\gamma$ , тогда как Th2 – продуцируют IL-4, IL-5, IL-13. Клетки Th17 названы так, потому что они продуцируют цитокины IL-17A и IL-17F, а также IL-22. Клетки Tfh развиваются совместно с клетками Th1 и Th2 или Th17, их основная функция – помощь В-клеткам в синтезе различных изотипов Ig. Клетки Treg обладают иммунорегуляторной функцией и способствуют поддержанию толерантности к антигенам, которые они распознают (Crotty S., 2011).

Очень условно, считается, что Th1 обладают провоспалительными свойствами и эффективны в борьбе против внутриклеточных патогенов и опухолей, тогда как Th2 являются противовоспалительными и в большей степени нацелены на борьбу с внеклеточными патогенами (Bluestone J.A., Abbas A.K., 2003). Th17 обычно индуцируются в ответ на внеклеточные бактерии и грибы и усиливают нейтрофильные воспалительные реакции. Важная роль отводится этим клеткам в механизме развития аутоиммунных расстройств (Littman D.R., Rudensky A.Y., 2010; Basu R. et al., 2013).

Функция Treg заключается в подавлении Т-клеточных ответов, а не в их стимуляции. Treg играют важную роль в предупреждении и сдерживании аутоиммунных расстройств (Чурина Е.Г., и др., 2014; Кононова Т.Е., и др., 2015). В настоящее время существуют две основные популяции Treg. Первая группа включает клетки, которые выполняют свою функцию только в тимусе – естественные или тимус-производные Treg (nTreg, tTreg). Другая группа клеток –

находится на периферии, известна как индуцированные или периферически-полученные Treg (iTreg и pTger) соответственно (Чурина Е.Г., и др., 2011; Nurieva R.I., Chung Y., 2010).

Предопределяющим фактором развития наивных CD4 Т-клеток в ту или иную эффекторную субпопуляцию определяется балансом цитокинов, который также интегрирован с TCR и костимуляторным сигналингом во время прайминга (O'Shea, J.J., Paul W.E., 2010). Развитие Th1 индуцируется при преобладании в микроокружении цитокинов IFN- $\gamma$  и IL-12, которые стимулируют внутриклеточный сигнальный путь STAT-JAK. Различные члены семейства JAK и STAT активируются различными цитокинами. Каждый из эффекторных путей зависит от определённой схемы активации STAT, определяющих направление дифференцировки, в результате которой формируется профиль экспрессии генов зрелых эффекторных Т-клеток (Szabo S.J. et al., 2003). Для развития Th1, основными активаторами транскрипции являются STAT1 и STAT4, они последовательно активируются интерферонами (IFN- $\alpha$  1 типа и IFN- $\beta$ ; или IFN- $\gamma$  2 типа) и IL-12 соответственно. Активированные врожденные лимфоидные клетки (ILC), такие как NK-клетки (естественные киллеры), также могут быть важными источниками IFN- $\gamma$ . Наконец, сами клетки, Th1 также могут продуцировать IFN- $\gamma$ , таким образом, усиливая сигнал для дифференцировки большего количества Th1 клеток – положительная обратная связь (Szabo S.J. et al., 2003; Nath I. et al., 2000).

Активация STAT1 интерфероном, индуцирует в активированных наивных CD4 Т-клетках экспрессию другого транскрипционного фактора T-bet, который включает гены IFN- $\gamma$  и индуцибельный компонент рецептора IL-12, IL-12R $\beta$ 2 (другой компонент рецептора IL-12R $\beta$ 1, уже экспрессируется на наивных Т-клетках). Эти Т-клетки теперь подвержены превращению в Th1 клетки и могут быть дополнительно активированы IL-12, продуцируемым ДК и Мф для индукции передачи сигналов STAT4. STAT4 дополнительно активирует экспрессию T-bet и завершает программирование развития Th1. Благодаря своей центральной роли в развитии Th1, T-bet иногда называют главным регулятором дифференцировки Т-клеток (Romagnani S., 1999; León B. et al., 2014).



Для развития Th2 необходим IL-4. Когда антиген-активированная наивная Т-клетка встречается с IL-4, ее рецептор активирует STAT6, который способствует экспрессии транскрипционного фактора GATA3. GATA3 является мощным активатором генов, кодирующих несколько цитокинов, продуцируемых клетками Th2, такими, как IL-4 и IL-13. GATA3 также индуцирует свою собственную продукцию, тем самым, стабилизируя дифференцировку Th2 через внутриклеточную положительную обратную связь. Первоначальный источник IL-4 – эозинофилы, базофилы и тучные клетки. Также, IL-4 могут продуцировать ILC группы 2, предполагается, что такие клетки также могут дифференцироваться в Th2 (Reese T.A., 2007; Zhu J., 2015).

Клетки Th17 возникают под действием IL-6 и TGF- $\beta$ . Развитие Th17 происходит при участии STAT3, который активируется IL-6 (Basu R. et al., 2013). Развивающиеся Th17 клетки экспрессируют рецептор для IL-23. В дифференцировке Th17 клеток играет роль ROR $\gamma$ t – рецептор ядерных гормонов, который стабилизирует развитие Th17 клеток (Littman D.R., Rudensky A.Y., 2010).

Развитие В-лимфоцитов определяется последовательными стадиями сборки и экспрессии функциональных антигенных рецепторных генов. Успешная перегруппировка генов на каждой стадии развития лимфоцитов приводит к образованию белковой цепи, которая служит сигналом для перехода клетки на следующую стадию. Мембранно-связанная форма Ig на поверхности В-клеток служит в качестве рецептора для антигена и известна как В-клеточный рецептор (BCR) (Schroeder H.W., Cavacini L., 2010; Surova E., Jumaа E., 2014).

Когда зрелый рецептор Ig экспрессируется на поверхности клетки, незрелые В-клетки становятся толерантны к собственным антигенам. Этот процесс начинается в костном мозге и продолжается в течение короткого времени после того, как незрелые В-клетки эмигрируют в периферию. Секретируемая форма Ig с такой же антигенной специфичностью представляет собой антитело, продуцируемое терминально-дифференцированными В-клетками-плазмокластами и плазматическими клетками (Harwood N.E., Batista F.D., 2009).

Ig характеризуются двумя функциями – специфическое связывание с патогеном или его продуктами, которые вызывают иммунный ответ и – рекрутинг других клеток и молекул для уничтожения связанного с антителом патогена (Wang W. et al., 2007). Ig обеспечивают иммунную защиту за счет набора эффекторных консервативных молекул, которые могут активировать и фиксировать комплемент, а также связываться с Fc-рецепторами на поверхности гранулоцитов, Мц, тромбоцитов и других компонентов иммунной системы (Sawa T. et al., 2014; Wang W. et al., 2007).

### **1.3. Интерлейкин-8 в системе хемокинов, регулирующих иммуногенез**

Хемокины – это небольшие белки массой 8-12 кДа, которые индуцируют направленный хемотаксис клеток, приводящий к их перемещению к источнику хемокина (Luster A.D., 2002). Рецепторы хемокинов представляют собой связанные с G-белком структуры. Мономерные хемокины состоят из индивидуального N-концевого участка, N-петли и сердцевинного домена, включающего  $\beta$ -складчатый участок, над которым расположена C-концевая  $\alpha$ -спираль. Выделяют мембранные и секретируемые формы хемокинов (Rossi D., Zlotnik A., 2000; Kufareva I. et al., 2015).

Обычно, в биологической жидкости хемокины представлены в форме димеров, реже тетрамеров. Существует разделение хемокинов на группы за счет взаимного расположения остатков цистеина. Всего в молекуле имеется 4 остатка цистеина, образующего две дисульфидные связи (Skelton N.J. et al., 1999; Kufareva I. et al., 2015). В хемокинах группы CX<sub>3</sub>C,  $\alpha$ -остатки цистеина разделены любым аминокислотным остатком. В другой группе хемокинов, обозначаемых CC ( $\beta$ -хемокины) – остатки цистеина следуют друг за другом. Выделяют еще C ( $\gamma$ ) и CX<sub>3</sub>C ( $\delta$ ) – хемокины. C-хемокины имеют 2 остатка цистеина, один из которых расположен вблизи N-конца (Stievano L. et al., 2004). Рецепторы для одной группы сходны по строению, но отличаются от рецепторов для хемокинов другой группы. Хемокины разных групп различаются спектром мишеней, CC-хемокины

привлекают в очаг воспаления Мц и лимфоциты, но не нейтрофилы, а СХС-хемокины – нейтрофилы, лимфоциты, но не Мц. Однако на Мц также экспрессируются рецепторы CXCR1, которые связываются с СХС-хемокинами, в том числе и с IL-8. Среди СХС-хемокинов дополнительно выделяют 2 подгруппы, в зависимости от наличия в их молекуле трипептидной последовательности ELR. Она имеется у первых восьми хемокинов (CXCL1-CXCL8) и отсутствует у остальных CXCL9-CXCL18). Наличие этой последовательности обуславливает способность  $\alpha$ -хемокинов стимулировать ангиогенез (Luster A.D., 2002; Matsukawa, A 2000).

Выделяют 10 рецепторов для СС-хемокинов, 7 рецепторов для СХС-хемокинов и по 1 рецептору для двух других групп. По функциональной роли выделяют гомеостатические и провоспалительные хемокины. Гомеостатические участвуют в распределении клеток по тканям и лимфоидным органам. Остальные хемокины относят к группе провоспалительных – они отвечают за активацию клеток и привлечение их в очаг воспаления (Тотолян А.А., 2001; Kirkaldy A.A. et al., 2003; Damås J.K. et al., 2009). Гомеостатические – секретируются постоянно стромальными, эндотелиальными, ДК, и в меньшей степени лимфоцитами. Они определяют миграцию клеток иммунной системы в процессе их созревания, в частности – заселение тимуса лимфоидными клетками предшественниками, направление миграции тимоцитов внутри тимуса и эмиграцию Т-лимфоцитов в периферические отделы иммунной системы и направление миграции ДК на разных этапах их созревания (Le Y. et al., 2004; Graham G.J., Locati M., 2013).

Сигналы, индуцируемые хемокинами, вызывают изменения клеточной адгезии и в цитоскелете клетки, что приводит к направленной миграции. Роль воспалительных хемокинов в рекрутинге клеток двоякая. Во-первых, они действуют на лейкоциты, при перемещении по эндотелиальным клеткам, способствуют стабильному межклеточному связыванию, вызывая конформационные изменения в молекулах адгезии (интегрины) (Graham G.J., Locati M., 2013). Эти конформационные изменения позволяют интегринам связываться с их лигандами на эндотелиальных клетках, что позволяет лейкоциту

проникать через стенки кровеносных сосудов. Во-вторых, хемокины направляют миграцию лейкоцитов вдоль градиента хемокиновых молекул, связанных с внеклеточным матриксом и поверхностью эндотелиальных клеток. Увеличение концентрации этого градиента происходит ближе к месту проникновения патогена (Cyster, J.G., 2000; Shortman K., Liu Y.J., 2002).

Таким образом, инфекция или физические повреждение тканей индуцируют образование градиентов хемокина, которые могут направлять фагоциты и лимфоциты в места, где они необходимы. Следует заметить, что хемокины не действуют самостоятельно, они нуждаются в вазоактивных медиаторах и цитокинах, такие как TNF- $\alpha$ , для индукции экспрессии молекул адгезии на эндотелиальных клетках (Scapini P. et al., 2000).

Существует группа бактериальных хемоаттрактантов, участвующих в реакциях врожденного иммунитета. Наиболее известным является пептид N-формил-метионил-лейцил-фенилаланил (fMLP). Он задействован в механизме синтеза белка у бактерий. Также он может выступать в роли PAMP. На поверхности практически всех миелоидных клеток присутствует рецептор для этого пептида. В результате связывания fMLP с рецептором происходит активация клетки и стимулирование её миграции по градиенту концентрации пептида. Таким образом, хемотаксис, обусловленный fMLP, - прямая реакция лейкоцитов на попадание в организм бактерий (Ebrahimzadeh, P.R. et al., 2000).

Другой группой хемотаксических факторов являются фрагменты компонентов комплемента (C3a, C5a), лейкотриены и цитокины. Данные компоненты продуцируются тучными клетками, базофилами, эозинофилами, нейтрофилами и Мц. Их рецепторы являются родопсинподобными молекулами. Хемокиновой активностью также обладают продукты расщепления факторов свертывания крови, фибринолиза, нейропептиды, фрагменты Ig и т.д (Schraufstatter I. U. et al., 2009).

Существует хемокин-зависимая миграция Т- и В-клеток по соответствующим зонам вторичных лимфоидных органов (Ansel K.M., Cyster J.R., 2001; Cyster J.G., 2000). Осуществление локализации Т-клеток в Т-зону

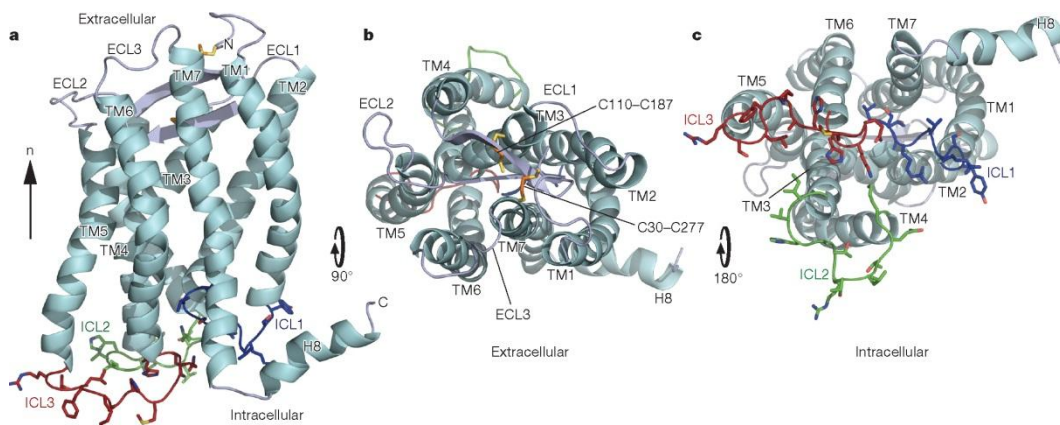
лимфатических узлов зависит от двух хемокинов – CCL19 (MIP-3 $\beta$ ) и CCL21 (вторичный лимфоидный хемокин SLC). Оба хемокина связываются с рецептором CCR7, который экспрессируется Т-клетками. Источниками данных хемокинов являются стромальные клетки Т-зон лимфатических узлов и интердигитальные ДК (Cyster J.G., 1999; Cyster J.G. et al., 2000). Подобно Т-клеткам циркулирующие В-клетки экспрессируют CCR7, который первоначально направляет их в лимфатические узлы. В-клетки также конститутивно экспрессируют хемокиновый рецептор CXCR5, что способствует притягиванию к фолликулам лиганда для этого рецептора, CXCL13 (Ansel K.M., Cyster J.R., 2001). CD4 Т-клетки, называемые фолликулярными хелперами (Tfh, follicular helper T cells), способны после их активации антигеном, также экспрессировать CXCR5, что позволяет им входить в В-клеточные фолликулы для участия в формировании зародышевых центров (Cyster, J.G. et al., 2000; Cyster, J.G. 2000).

IL-8, также известный, как лиганд CXС (CXCL) 8, является небольшим растворимым белком и относится к семейству CXС хемокинов (Rossi D., Zlotnik A., 2000). У семейства CXС хемокинов присутствует одна аминокислота под названием «X», которая располагается между двумя цистеинами и образуется из генного кластера, располагающегося в хромосоме между участками q12 и q21 (Modi W.S. et al., 1990). IL-8 первоначально был охарактеризован как фактор, мобилизирующий нейтрофилы, секретируемый активированными Мц/Мф (Walz A. et al., 1987; Schroder J.M. et al., 1987; Yoshimura T. et al., 1987). Позднее было показано, что многие другие типы клеток, включая фибробласты, лимфоциты, нейтрофилы, эндотелиальные клетки и различные нормальные и злокачественные эпителиальные клетки также способны взаимодействовать с этим фактором (Уразова О.И. и др., 2007; Kitadaix Y. et al., 1998; Venkatakrishnan G. et al., 2000; Inoue K. et al., 2000; Freund A. et al., 2000).

Также было продемонстрировано участие IL-8 в ангиогенезе. Этим свойством обладает фрагмент Glu-Leu-Arg, который располагается перед N-концевым остатком цистеина. (Strieter R.M. et al., 1995). Биологические эффекты IL-8 опосредуются через два класса родопсинподобных (A) рецепторов,

связанных с гуаниновым белком (GPCR): CXCR1 (IL-8RA) и CXCR2 (IL-8RB) (Sprenger H., Lloyd A.R., Meyer R.G. et al., 1994). Гены, кодирующие CXCR1 и CXCR2, расположены в непосредственной близости друг от друга во 2-ой хромосоме (2q34-35) (Lloyd A. et al., 1993). Ген CXCR1 состоит из двух экзонов, разделенных интроном, тогда, как CXCR2 состоит из трех экзонов, разделенных двумя интронами (Sprenger H., Lloyd A.R., Lautens L.L. et al., 1994). Эти рецепторы гомологичны по аминокислотам на 77% и сохраняют общие структурные особенности, что повышает вероятность того, что они могут быть продуктами дупликации генов (Ahuja S.K. et al., 1992).

Как и другие GPCR, CXCR1 и CXCR2 имеют структуру, пронизывающую мембрану  $\alpha$ -спирализированными участками 7 раз. Вне клетки они заканчиваются N-концом с тремя петлями, внутри клетки - C-концом и тремя петлями (Kobilka B.K., 2007). N-конец участвует в распознавании и связывании хемокина-лиганда, петли C-конца, связаны с G-белками (белки, связывающие гуаниннуклеотиды) **рисунок 1.**



**Рисунок 1** Трехмерная структура CXCR1  
голубой цвет – спирали, пронизывающие мембрану (TM1-TM7 H8)  
серый цвет – внеклеточные петли ECL1-ECL3  
внутриклеточные петли – синий (ICL1), зеленый (ICL2), красный (ICL3)  
а – вид сбоку  
б – вид с внеклеточной стороны  
с – вид с внутриклеточной стороны  
(адаптировано из Park S.H., 2012)

Хемокин связывается с N-концевой частью рецептора с помощью домена сердцевины. CXCR1 активируется IL-8 и гранулоцитарным хемотаксическим белком 2 (GCP-2)/CXCL6. Исследования фосфолипидных бислоев показывают,

что клеточная мембрана также важна для опосредованного связывания IL-8 с N-концевыми остатками CXCR1 (Park S.H. et al., 2011). CXCR2 может активироваться не только IL-8, но и многими другими CXC хемокинами, такими как GRO- $\alpha$ /CXCL1, GRO- $\beta$ /CXCL2, GRO- $\gamma$ /CXCL3, CXCL5, GCP-2 и нейтрофилактивирующим белком-2 – NAP-2/CXCL7 (Rajagopalan L., Rajarathnam K., 2004).

CXCR1 и CXCR2 связываются с гетеродимерными G-белками, которые состоят из  $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\gamma$  субъединиц (Waugh D.J., Wilson C., 2008). Связывание лиганда катализирует на G $\alpha$  субъединице обмен гуанозиндифосфата (ГДФ) на гуанозинтрифосфат (ГТФ), что приводит к высвобождению этой субъединицы от комплекса G $\beta\gamma$  и выходом ее в цитозоль (Stillie R. et al., 2009). Субъединицы G $\alpha$  и G $\beta\gamma$  последовательно активируют множество сигнальных путей, которые имеют различные эффекты в зависимости от типа клетки. Имеются три основных сигнальных пути: (1) фосфатидилинозитол-3-киназный/Akt (PI3K/Akt) и митоген-активированный протеинкиназный MAPK, (2) ассоциированный с активацией PLC/PKC и внеклеточных сигнально-регулируемых путей, (3) активация нерецепторных тирозинкиназ и Rho-GTP-аз (Knall C. et al., 1996; Knall C. et al., 1997; Cohen-Hillel E. et al., 2006; Schraufstatter I.U. et al., 2001; Britschgi A. et al., 2012). Нет единого мнения о том, какая из субъединиц ответственна за запуск того или иного каскада. Известно, что основной субъединицей является G $\beta\gamma$ , а G $\alpha$  участвует в запуске тех же каскадов, однако ее функция является вспомогательной.

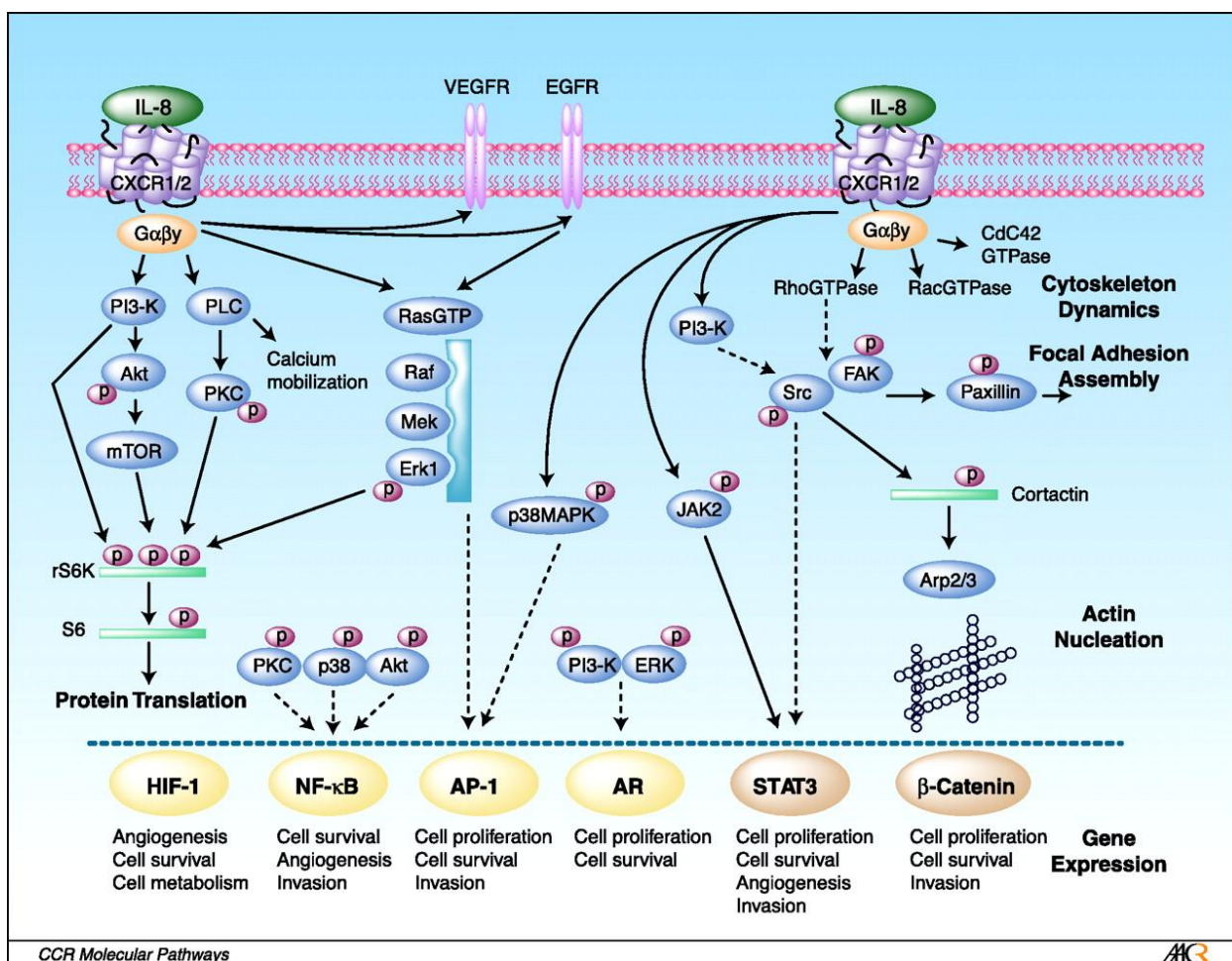
Активация PI3K осуществляется нисходящим (от CXCL8) внутриклеточным сигнальным путем. PI3K является одной из основных мишеней гетеротримерных G $\alpha$  и  $\beta\gamma$  субъединиц. Данная липид/протеинкиназа была идентифицирована как одна из основных систем, запускающая хемотаксис нейтрофилов, что приводит к фосфорилированию субстрата серин/треонин киназы PKB/Akt (Knall C. et al., 1997). Увеличение экспрессии и активности Akt наблюдается при многих формах рака. Также установлена его роль в модуляции выживаемости клеток и ангиогенезе (Strieter R.M. et al., 1995; Jiang B.H., Liu L.Z., 2008). IL-8-

опосредованная передача сигнала также регулирует активность сигнального каскада митоген-активированной протеинкиназы (МАРК), которая представляет собой ряд сериновых/треониновых киназ. Специфичность субстрата этих киназ приводит к активации отдельных сигнальных каскадов – Raf-1/MAP/ERK киназы 1/Erk каскада. Также показано, что передача сигнала IL-8 индуцирует активацию классического сигнального каскада МАРК с последующим фосфорилированием Erk1/2, обнаруженным как в нейтрофилах (Knall C. et al., 1996), так и в раковых клетках (MacManus C.F. et al., 2007; Venkatakrishnan G. et al., 2000; Luppi F. et al., 2007). В нейтрофилах активность PI3K является ключевым промежуточным звеном в связывании рецепторов IL-8 с МАРК (Knall C. 1996). Однако имеются исследования, где показано, что IL-8 трансактивирует рецептор эпидермального фактора роста, способствующего последующей активации МАРК, опосредованной через активацию рецептор-связывающего белка фактора роста 2/SOS (Venkatakrishnan G. et al., 2000; Luppi F. et al., 2007). Активация МАРК сигналинга ассоциируется с эффектами клеточной пролиферации и их повышенной выживаемости (Glynn P.C. et al., 2002; Li A. et al., 2003).

Связывание IL-8 с Gα запускает активацию PLC (Richardson R.M. et al., 1998). PLC способствует превращению связанных с мембраной липидов в диацилглицерин и в инозитолтрифосфат, что приводит к мобилизации ионов кальция и активации изоформ РКС. Добавление IL-8 к нейтрофилам индуцирует фосфорилирование множества изоформ РКС, включая РКСα, РКСβ1, РКСβ2, которые запускают секреторные процессы, респираторный взрыв и опосредованную Мак-1 адгезию этих клеток. (Takami M. et al., 2002; Nasser M.W. et al., 2005). Было показано, что активация CXCR1, но не CXCR2 активирует новую РКС-изоформу – РКСε, которая участвует в снижении чувствительности передачи сигналов через CXCR2 (Takami M. et al., 2002). Кроме того, IL-8 вызывает фосфорилирование рецептора фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR-2) в эндотелиальных клетках, регулируя, таким образом, проницаемость эндотелиального барьера (Petreaca M.L. et al., 2007).



Вместе с активацией нерецепторных тирозинкиназ, происходит процесс запуска небольших мономерных GTP-аз семейства Rho, которые являются ключевыми регулятором актинового цитоскелета, который ответственен за поддержание и изменение формы клеток. Было показано, что CXCR1 рецептор избирательно активирует Rho GTP-азу, CXCR2 – RacGTP-азу на эндотелиальных клетках (Schraufstatter I.U. et al., 2001) и, таким образом, способствует полимеризации актинового цитоскелета и его ретракции (рисунок 2).



**Рисунок 2** Передача сигнала после контакта с IL-8. Схематическая диаграмма, иллюстрирующая различные сигнальные пути, которые запускаются в ответ на стимуляцию CXCR1 и/или CXCR2 IL-8.

После активации IL-8 гетеротримерного G-белка, происходит запуск первичных эффектор PI3K или PLC, что приводит к активации сигнальных каскадов Akt, PKC, мобилизации кальция и/или MAPK. Эти сигнальные пути способствуют трансляции белков (слева) и регулируют активность различных транскрипционных факторов (снизу). Желтым цветом обозначены факторы транскрипции, активность которых регулируется именно после контакта с IL-8. Пунктирные линии, предполагаемые пути, через которые происходит IL-8 опосредованная регуляция активности транскрипционных факторов. Кроме того, сигналинг активирует членов семейства RhoGTP-азы и активирует ряд нерецепторных тирозинкиназ (например, родственные

киназы Src и FAK), которые регулируют архитектуру клеточного цитоскелета и его взаимодействие с окружающей внеклеточной средой. (Адаптировано из Waugh D.J.J., Wilson C., 2008).

IL-8 выделяется в ответ на воспалительные раздражители почти всеми типами клеток. Помимо связывания с IL-8, CXCR1 и CXCR2 обладают различными физиологическими свойствами. По сравнению с CXCR2, CXCR1, как правило, более устойчив к десенсибилизации. Это важно для регуляции противомикробных иммунных реакций (Sabroe I., Whyte M.K.B., 2007). Конститутивное образование гомо и гетеродимеров CXCR1 и CXCR2 (Wilson S. et al., 2005) также предполагает активное взаимодействие между этими двумя рецепторами. Чрезмерное воспаление, вызванное рекрутированием нейтрофилов, способствует развитию ХОБЛ, астмы, воспалительных заболеваний кишечника и болезни Крона. Кроме того, через CXCR1, IL-8 способствует росту опухолей, таких как рак предстательной железы, рак молочной железы, колоректальный рак и меланома (Shamaladevi N. et al., 2009). Отсюда, блокада секреции или биологической активности IL-8 может стать терапевтической опцией в лечении ряда заболеваний, в том числе тех, стандартное лечение, которых является малоэффективным (Ginestier C. et al., 2010).

#### **1.4. Заключение**

Резюмируя вышесказанное, следует отметить, что значимость IL-8 в генерации воспаления вызывает живой интерес у многих исследователей. Однако основная часть исследований преимущественно сосредоточена на роли IL-8 в регуляции врожденного иммунитета. Тем не менее, есть основания предполагать, что IL-8 не только участвует в регуляции локальных и системных воспалительных иммунных реакций, но и может воздействовать на генерацию долговременной иммунной памяти, и таким, образом, играть значимую роль в адаптивном иммуногенезе. Это влияние может опосредоваться прямыми эффектами IL-8 как на функции Мц/Мф, так и на Т-клеточный иммуногенез. Подтверждению (или опровержению) этой закономерности и посвящена данная работа.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

### 2.1. Объект и материал исследования

В основу работы положены результаты комплексного исследования 42 условно здоровых доноров (мужчин и женщин в возрасте от 21 до 40 лет).

*Критериями исключения* из исследования являлись: возраст моложе 21 года и старше 40 лет; период обострения хронических воспалительных заболеваний; инфекционные, онкологические, аутоиммунные, наследственные и психические болезни; алкогольная и наркотическая зависимости.

Материалом для исследования служила венозная кровь (20 мл), взятая стандартным методом из локтевой вены с помощью стандартных вакуумных систем «BD VACUTAINER™» («Greiner-bio-one», Австрия) с гепарином 20 Ед/мл.

Разрешение на проведение исследования получено в локальном этическом комитете (№ 7 от 10 марта 2015 г.).

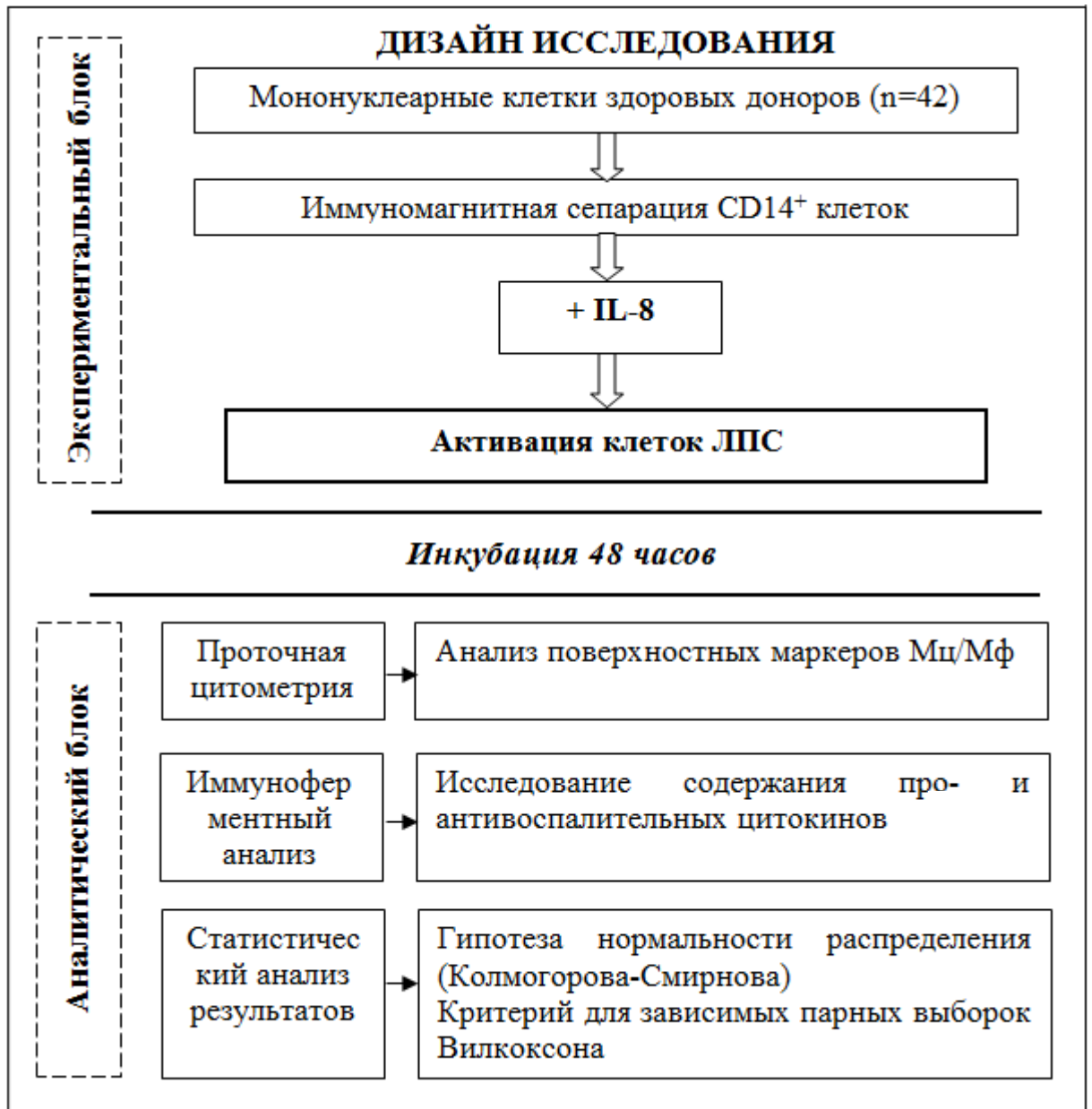
Все экспериментальные исследования проводились на базе Центра медицинских биотехнологий БФУ им. И. Канта (руководитель – доктор медицинских наук, профессор, Селедцов В.И.).

### 2.2. Методы исследования

Согласно поставленным целью и задачами был предложен алгоритм проведения экспериментального блока, который позволяет оценить роль IL-8 в регуляции адаптивного иммуногенеза.

Были использованы две модели исследования:

- **моноцитарно/макрофагальная** модель предназначена для исследования прямого влияния IL-8 на активацию и функциональные свойств Мц/Мф (**рисунок 3**).



**Рисунок 3.** Дизайн исследования Мц/Мф модели

- **Т-клеточная модель** позволяет оценивать прямые эффекты IL-8 на активацию и функциональные свойства Т-лимфоцитов (**рисунок 4**).



**Рисунок 4.** Дизайн исследования Т-лимфоцитарной модели

### 2.2.1. Выделение мононуклеарных клеток из периферической крови

Выделение мононуклеарных клеток (МНК) проводили посредством центрифугирования в градиенте плотности фиколл-урографин (Ficoll-Paque™ PREMIUM sterile solution, GE Healthcare, США), плотность  $1,077 \pm 0,001$  g/ml. Полученную венозную гепаринизированную кровь смешивали с фосфатно-солевым буфером, содержащими 0,5% бычьего сывороточного альбумина «MiltenyiBiotec», Германия), в соотношении 1:1. Затем, разведенную кровь

наслаивали на градиент фиколл-урографина в соотношении 1:3 и центрифугировали 45 минут при 1500 об/мин на центрифуге («Eppendorf» Centrifuge 5702R, Германия) при комнатной температуре. Образовавшиеся на разделе сред кольцо моноклеарных клеток собирали с помощью автоматической пипетки в стерильную пробирку и отмывали 2 раза большим объемом фосфатно-солевого буфера, последовательно ресуспендируя и центрифугируя каждый раз в течение 15 мин при 1500 об/мин.

После удаления супернатанта, полученный осадок клеток суспендировали в фосфатно-солевом буфере и далее использовали МНК для выделения Т-лимфоцитов и Мц/Мф.

### **2.2.2. Выделение CD14<sup>+</sup> и CD3<sup>+</sup> клеток**

Для получения монокультур CD14<sup>+</sup> или CD3<sup>+</sup> клеток из взвеси МНК, был использован метод позитивной колоночной иммуномагнитной сепарации, в основе которого лежит технология MACS (magnetic-activated cell sorting, «MiltenyiBiotec», Германия). Метод основывается на использовании суперпарамагнитных частиц MACS MicroBeads, конъюгированных с высокоспецифичными моноклональными антителами (АТ) к молекулам CD14 или CD3 (Miltenyi Biotec, Германия). Добавление частиц к взвеси клеток приводило в высокоаффинному связыванию с находящимися на поверхности клеток молекулами CD14 или CD3. Частицы MicroBeads биodeградируемые и не вызывают реакции со стороны клеток. После внесения частиц в клеточную суспензию, клетки помещали в колонки MACS, имеющие ферромагнитный матрикс. Сепаратор MACS генерирует сильное магнитное поле для фиксации клеток, нагруженных MicroBeads, сохраняя их жизнеспособность. Не связавшиеся с частицами клетки удаляли промывочным буфером. После изъятия колонки из магнитного поля, связавшиеся с частицами клетки, вымывали с помощью поршня. Выделенные CD14<sup>+</sup> или CD3<sup>+</sup> клетки помещали в среду TexMacс.

### **2.2.3. Подсчет CD14<sup>+</sup> и CD3<sup>+</sup> клеток, определение их чистоты и жизнеспособности**

Подсчет клеток осуществляли на автоматическом счётчике частиц (Z2, Beckman coulter, США). Для этого, небольшое количество выделенных клеток разводили в PBS (Amresco LLC, США) и в автоматическом режиме осуществляли их подсчет с учетом разведения.

Для определения чистоты выделенной популяции и её жизнеспособности, клетки инкубировали с флуорохром-конъюгированными АТ, специфичными к CD14 или CD3 (eBioscience, США) и раствором PI (пропидиум иодид) (eBioscience, США). Анализ проводили на проточном цитофлуориметре (BD Accuri<sup>®</sup> C6 Flow Cytometer, BD Biosciences, США) с использованием программного обеспечения C6Flow Plus. Пропидиум иодид является флуоресцентным красителем, который избирательно проникает через мембрану мертвых клеток. Подсчет чистоты и оценку жизнеспособности CD14<sup>+</sup> и CD3<sup>+</sup> клеток проводили до и после культивирования.

### **2.2.4. Культивирование CD14<sup>+</sup> и CD3<sup>+</sup> клеток**

Полученные методом положительной селекции CD14<sup>+</sup> Мц/Мф помещали в 24-х луночный планшет в концентрации  $1,0-1,5 \times 10^6$  кл/мл и культивировали в среде TexMACS (Miltenyi Biotec), содержащей  $5,0 \times 10^{-5}$  M2-Меркаптоэтанола (Acros Organics, США) во влажной атмосфере с 5% CO<sub>2</sub>, при 37°C в течение 24 часов. В качестве активатора Мц/Мф использовали бактериальный ЛПС из *Salmonella typhi* (Пирогенал, МЕДГАМАЛ ФНИЦЭМ им. Н.Ф. ГАМАЛЕИ, Россия) в концентрации 1 мкг/мл. Рекомбинантный IL-8 (Miltenyi Biotec) добавляли в пробы в концентрациях (0,01; 0,1; 1,0; 10,0 нг/мл) вместе с активатором. Использовали следующие варианты культивирования Мц/Мф:

- 1) клетки без активатора;
- 2) клетки без активатора + IL-8 (10,0 нг/мл);

- 3) клетки с активатором (ЛПС);
- 4) клетки с активатором + IL-8 (0,01 нг/мл);
- 5) клетки с активатором + IL-8 (0,1 нг/мл);
- 6) клетки с активатором + IL-8 (1,0 нг/мл);
- 7) клетки с активатором + IL-8 (10,0 нг/мл).

После культивирования, клетки использовали для цитометрического исследования, в супернатантах определяли содержание цитокинов.

Выделенные CD3<sup>+</sup> Т-клетки культивировали в 24-луночных планшетах (объем клеток 1мл, концентрация 1,0-1,5 x 10<sup>6</sup> кл/мл) в бессывороточной среде TexMACS (Miltenyi Biotec, Германия), содержащей 5,0 x 10<sup>-5</sup> M2-Меркаптоэтанола (Acros Organics, США), в течение 48 часов во влажной атмосфере с 5% CO<sub>2</sub>, при 37°C.

Для активации Т-клеток использовали частицы, конъюгированные с человеческими антителами к CD2/CD3/CD28 (T Cell Activation/Expansion Kit, MACS Miltenyi Biotec, Германия). Комплекс имитирует функции антигенпрезентирующей клетки (образование иммунного синапса), активирующей Т-лимфоциты. Рекомбинантный IL-8 (Miltenyi Biotec) добавляли в клеточные пробы в концентрациях (0,01; 0,1; 1,0; 10,0 нг/мл) вместе с активатором. Были использованы следующие варианты культивирования Т-лимфоцитов:

- 1) клетки без активатора;
- 2) клетки без активатора + IL-8 (10,0 нг/мл);
- 3) клетки с активатором (анти CD2/CD3/CD28);
- 4) клетки с активатором + IL-8 (0,01 нг/мл);
- 5) клетки с активатором + IL-8 (0,1 нг/мл);
- 6) клетки с активатором + IL-8 (1,0 нг/мл);
- 7) клетки с активатором + IL-8 (10,0 нг/мл).

После 48-часового культивирования, получившийся надосадок отбирали для последующего определения содержания цитокинов методом иммуноферментного анализа. Клетки после отмывки обрабатывали мечеными



флуорохромами антителами и анализировали экспрессию мембранных молекул методом проточной цитофлуориметрии.

### **2.2.5. Проточная цитофлуориметрия моноцитов/макрофагов**

Эффекты IL-8 на активацию Мц/Мф оценивали по изменению количества клеток, экспрессирующих маркеры CD14, CD16, CD119, CD124, CD197. Для проточной цитометрии применяли моноклональные антитела, конъюгированные с флуоресцентными метками: CD14-PerCP (eBioscience, США), CD16-FITC, CD119-PE, CD124-APC и CD197-PE/AF488 (BioLegend, США). Настройку цветовой компенсации проводили с помощью одноцветных контролей. Для выставления границ зоны позитива и учета неспецифического связывания использовали неокрашенный контроль и изотип контроля (Iso IgG2a, κ - APC, PE, AF488 и Iso IgG1, κ – PE, BioLegend, США). Результаты оценивали на проточном цитофлуориметре (Accuri C6, BD Biosciences, США). Анализ полученных данных проводили в программе CSampler Software (BD Biosciences, США).

### **2.2.6. Проточная цитофлуориметрия Т-лимфоцитов**

После культивирования Т-клетки тщательно отмывали. Анализ проводили в пластиковых пробирках (2 мл). Для предотвращения неспецифического связывания АТ применяли блокатор Fc-рецепторов, согласно инструкции (Miltenyi Biotec). Для идентификации мембранных молекул использовали коктейль АТ, конъюгированных с флуоресцентной меткой: анти-CD4-PerCP, анти-CD181-FITC (eBioscience, США), анти-CD197-PE, анти-CD45RA-APC (BD Pharmingen, США), анти-CD25-FITC и анти-CD38-AF488 (BioLegend, США). Все манипуляции проводили согласно инструкциям производителей. Для выставления границ зоны позитива использовали неокрашенные контроли. Для повышения точности и учета неспецифического связывания антител при гейтировании использовали изотип-контроли (ISO MOPC-21 IgG1, κ; ISO MPC-11, IgG2b, κ) и

FMO-контроли (Fluorescence minus one). Результаты оценивали на проточном цитофлуориметре (Accuri C6, BD Biosciences, США). Анализ полученных данных проводили в программе CSampler Software (BD Biosciences, США). Идентифицировали следующие Т-клеточные субпопуляции: наивные клетки ( $CD45RA^+CD197^+$ ), Т-клетки центральной памяти ( $CD45RA^-CD197^+$ ), эффекторные Т-клетки ( $CD45RA^-CD197^-$ ) и терминально-дифференцированные эффекторы ( $CD45RA^+CD197^-$ ). Клетки, не имеющие молекулы CD4 ( $CD4^-$  клетки), приравнивали к  $CD8^+$  клеткам, поскольку исследовалась чистая популяция  $CD3^+$  клеток. Среди Т-клеток также идентифицировали клетки, экспрессирующие CD181 (рецептор к IL-8), CD197 (С-С-рецептор хемокина 7), CD25 ( $\alpha$ -цепь рецептора IL-2), и CD38 (циклическая ADP рибозогидролаза).

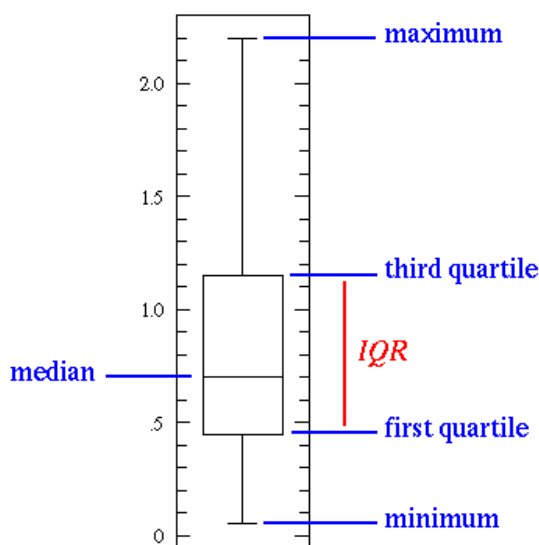
### **2.2.7. Определение концентраций про- и противовоспалительных цитокинов**

Для определения концентраций исследуемых цитокинов в культурах  $CD14^+$  и  $CD3^+$  клеток использовали метод твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) с применением наборов с адсорбированными в ячейках планшета антителами к IL-10, IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  (при анализе  $CD14^+$  клеток) и IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10 (при анализе  $CD3^+$  клеток) («Вектор Бест» Россия). Выполнение ИФА осуществляли на автоматическом иммуноферментном анализаторе («ChemWell 2910», Awareness Technology, inc., США). Настройку программы для проведения ИФА составляли, основываясь на алгоритме, предложенным производителем тест систем.

### **2.2.8. Методы статистического анализа данных**

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы IBM SPSS Statistics 20 (Statistical Package for the Social Sciences, США). Оценку полученных результатов проводили методами статистического описания и

проверки статистических гипотез. Анализ выборки проводили на основе гипотезы нормальности распределения (Колмогорова-Смирнова). В качестве средневыворочной характеристики использовали медиану (M), первый и третий квартили ( $Q_1$ - $Q_3$ ). Для оценки статистической достоверности исследуемых выборок использовали непараметрический критерий Вилкоксона для зависимых выборок, не подчиняющихся нормальному закону распределения. Различия между выборками считались значимыми при уровне  $p < 0,05$ . В работе данные представлены в виде диаграмм (ящик с усами, box plot), отражающих одномерное распределение вероятностей. Диаграмма такого вида показывает медиану, первый и третий квартили, а также максимальное и минимальное значение выборки. На **рисунке 5** показан пример диаграммы такого вида.



**Рисунок 5.** Диаграмма ящик с усами с составляющими.

maximum – максимальное значение выборки;

third quartile – третий квартиль ( $Q_3$ );

median – медиана (Me);

first quartile – первый квартиль ( $Q_1$ );

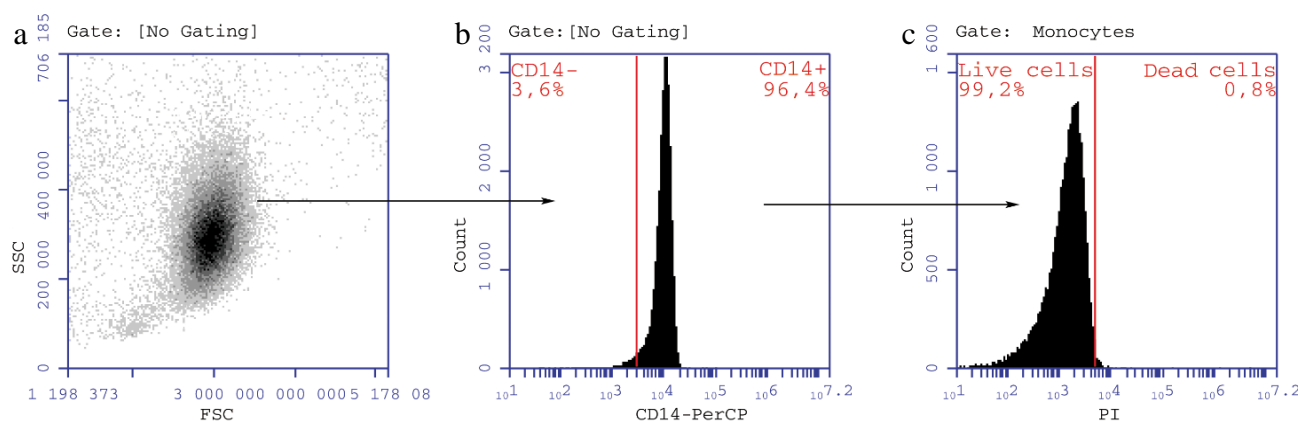
minimum – минимальное значение выборки;

IQR – межквартильный размах ( $Q_1$ - $Q_3$ ).

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

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

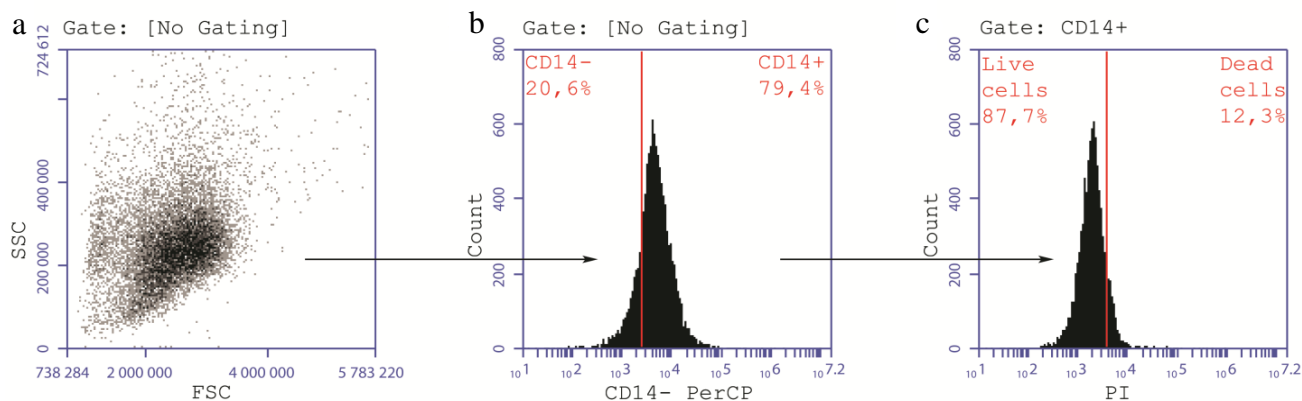
Чистота выделенных из МНК методом магнитной сепарации CD14<sup>+</sup> клеток составляла 98,8 (97,8-99,3) %, их жизнеспособность была на уровне 95,4 (94,0-99,5) %. Данную и последующие оценки проводили на проточном цитофлуориметре с визуализацией в виде точечных графиков и гистограмм (плотов) (рисунок 6).



**Рисунок 6.** Жизнеспособность и чистота выделенных из МНК Мц/Мф.

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

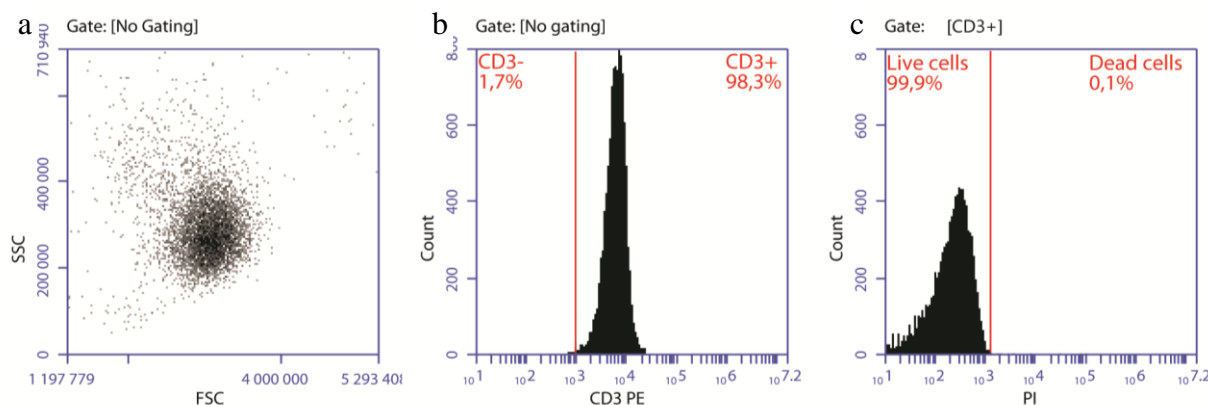
Культивирование клеток 24 часа с ЛПС приводило к достоверному снижению жизнеспособности клеток примерно на 15%. Добавление IL-8 к клеткам существенно не влияло на клеточную жизнеспособность (рисунок 7).



**Рисунок 7.** Жизнеспособность Мц/Мф их после активации.

- a) распределение клеток по прямому (FSC) и боковому (SSC) светорассеянию;
- b) содержание  $CD14^+$  клеток;
- c) жизнеспособность клеток, оцениваемая по окрашиванию PI: зона позитива – мертвые, зона негатива – живые.

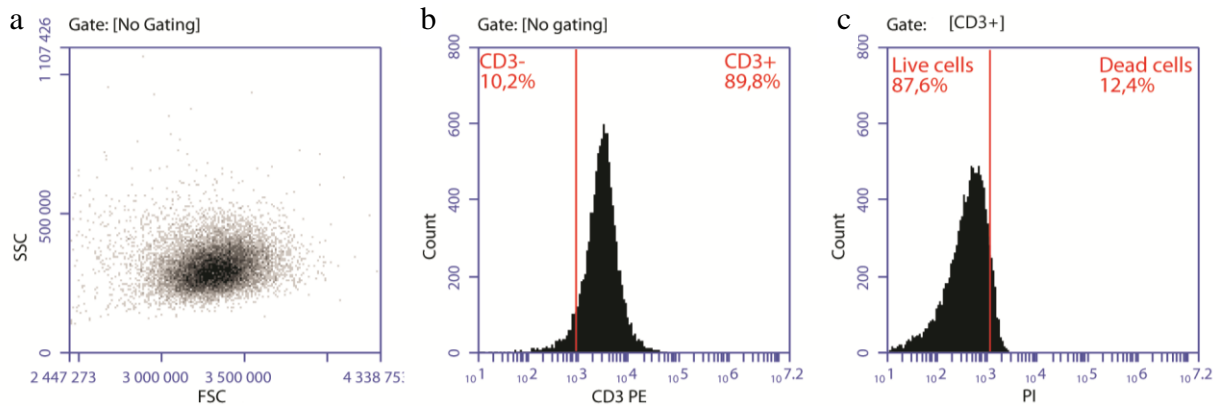
Чистота выделенных из МНК методом магнитной сепарации  $CD3^+$  клеток составляла 99,0 (98,6-99,5) %, их жизнеспособность была не менее 95%. (**рисунок 8**).



**Рисунок 8.** Жизнеспособность и чистота популяции  $CD3^+$  клеток до культивирования.

- a) распределение клеток по прямому (FSC) и боковому (SSC) светорассеянию;
- b) содержание  $CD3^+$  клеток;
- c) жизнеспособность клеток, оцениваемая по окрашиванию PI: зона позитива – мертвые, зона негатива – живые.

Общее количество клеток и их жизнеспособность также оценивали после культивирования. Добавление IL-8 не оказывало значимого воздействия на изменение чистоты и жизнеспособности активированных  $CD3^+$  клеток, значения соответствовали контрольной пробе с активатором. Общее количество клеток при одинаковых условиях культивирования значительно снижалось после инкубации (48 часов). Также отмечалось достоверное снижение (примерно на 17%) жизнеспособности Т-лимфоцитов после культивирования (**рисунок 9**).



**Рисунок 9.** Жизнеспособность и чистота Т-лимфоцитов после активации.

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

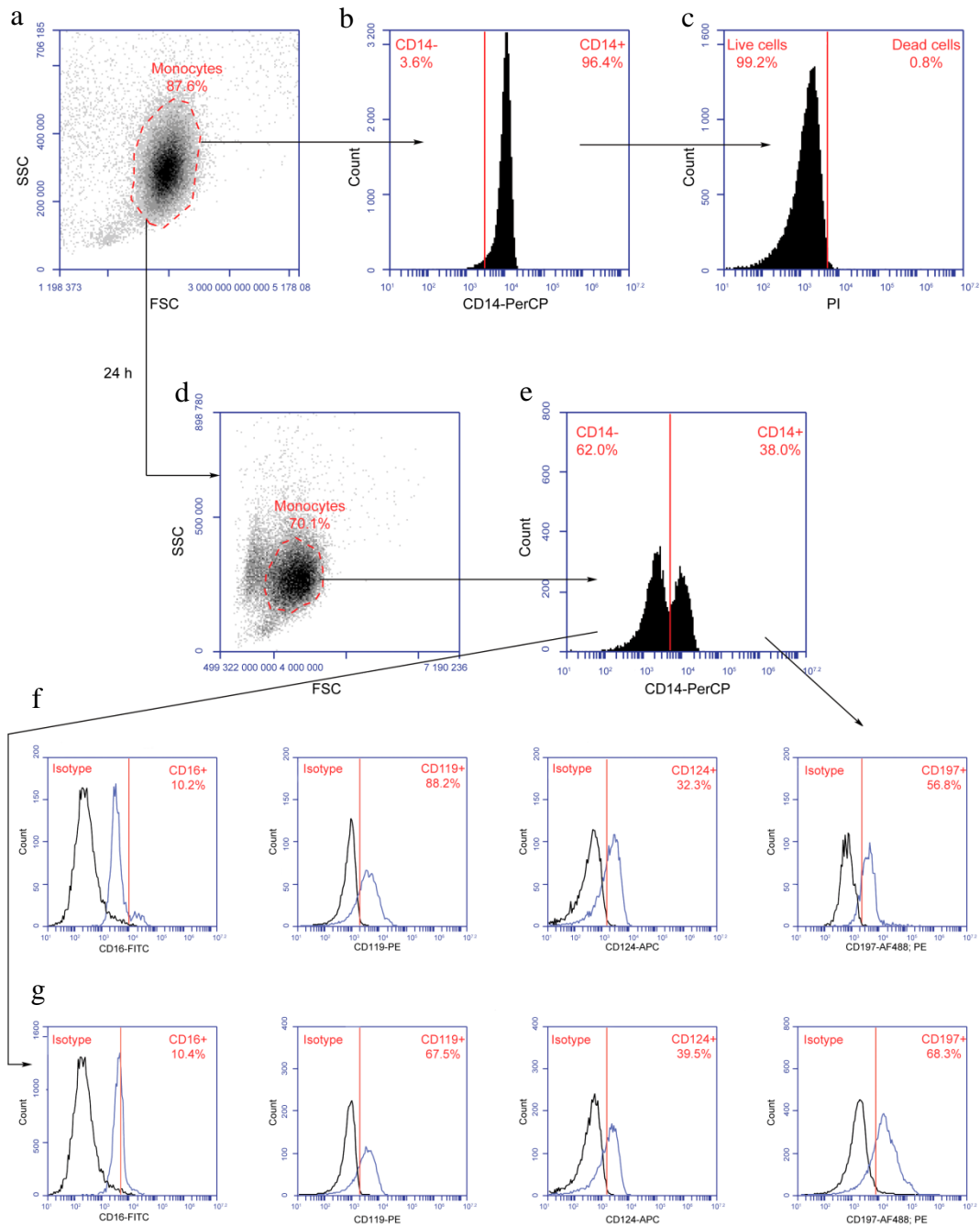
б) содержание CD3<sup>+</sup> клеток;

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

### 3.2. Влияние IL-8 на функциональные свойства моноцитов/макрофагов

#### 3.2.1. Влияние IL-8 на поверхностные свойства моноцитов/макрофагов

На рисунке 10 представлена использованная стратегия гейтирования Мц/Мф.

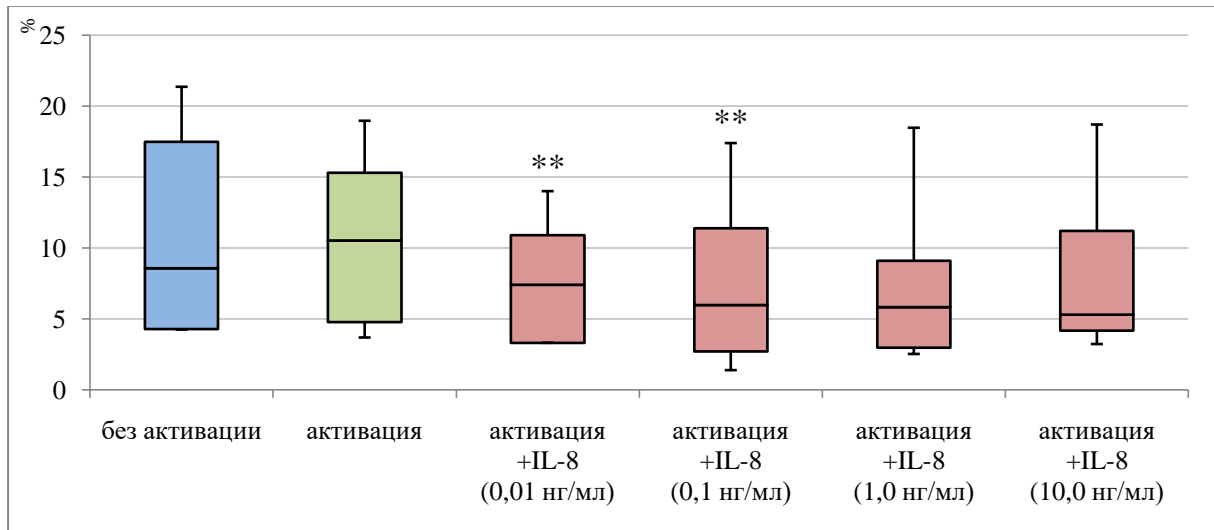


**Рисунок 10** Алгоритм цитометрического анализа Мц/Мф.

- а) распределение клеток по прямому (FSC) и боковому (SSC) светорассеянию до инкубации;  
 б) содержание CD14<sup>+</sup> клеток до инкубации;  
 в) жизнеспособность клеток, определяемая по окрашиванию PI: зона позитива – мертвые, зона негатива – живые;  
 г) распределение клеток по прямому (FSC) и боковому (SSC) светорассеянию после инкубации 24 часа;  
 д) идентификация CD14<sup>+</sup> и CD14<sup>-</sup> клеток;  
 е) содержание CD16<sup>+</sup>, CD119<sup>+</sup>, CD124<sup>+</sup>, CD197<sup>+</sup> клеток из CD14-позитивных Мц/Мф;  
 з) содержание CD16<sup>+</sup>, CD119<sup>+</sup>, CD124<sup>+</sup>, CD197<sup>+</sup> клеток из CD14-негативных Мц/Мф.

Количество CD14<sup>+</sup>/CD16<sup>+</sup> Мц/Мф исходно было равным 8,6 (4,3-17,5)%.  
 Добавление ЛПС к Мц/Мф не приводило к каким-либо изменениям уровня

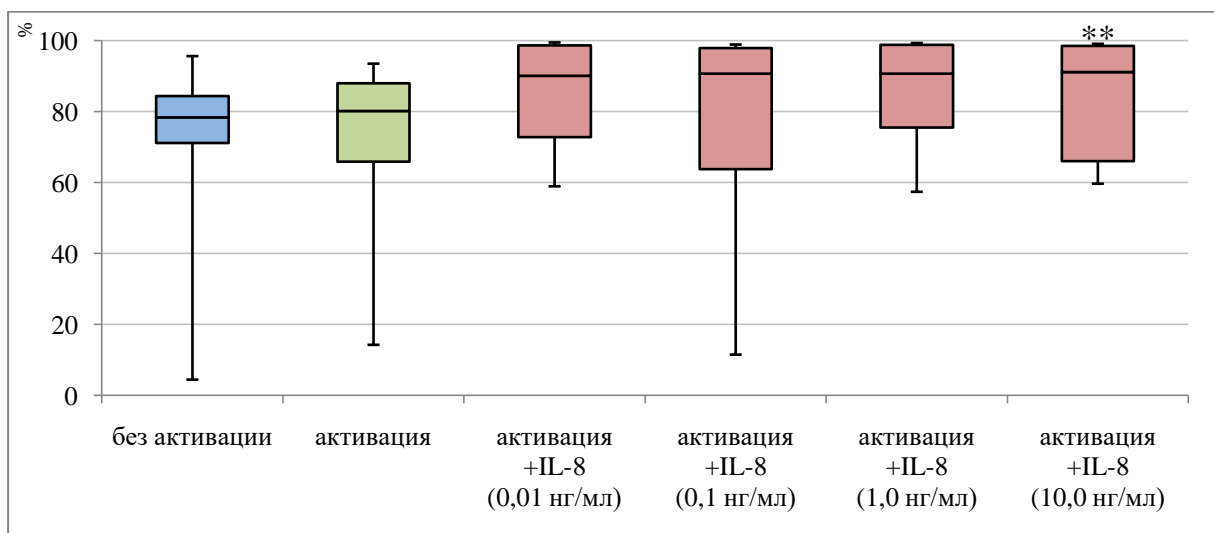
CD14<sup>+</sup>/CD16<sup>+</sup> клеток. IL-8 в концентрациях 0,01 нг/мл и 0,1 нг/мл вызывал снижение количества CD14<sup>+</sup>/CD16<sup>+</sup> среди активированных Мц/Мф (**Рисунок 11**).



**Рисунок 11.** Количество (%) CD14<sup>+</sup>/CD16<sup>+</sup> Мц/Мф.

\*\*  $p < 0,05$  – в сравнении с пробой с активатором.

CD119 является  $\alpha$ -цепью рецептора к IFN- $\gamma$ . Связывание данного рецептора с соответствующим цитокином приводит к классической провоспалительной (M1) активации Мц/Мф (Martinez F.O., Gordon S., 2014; Tau G., 1999). При культивировании выделенных CD14<sup>+</sup> Мц/Мф с ЛПС, происходила стабилизация количества CD14<sup>+</sup>/CD119<sup>+</sup> клеток на уровне 80,15 (65,9-88,0)%. Добавление IL-8 приводило к увеличению количества CD14<sup>+</sup>/CD119<sup>+</sup> клеток, однако, статистически значимым, данное изменение было только при инкубации с максимальной концентрацией данного хемокина (10,0 нг/мл) (**рисунок 12**).

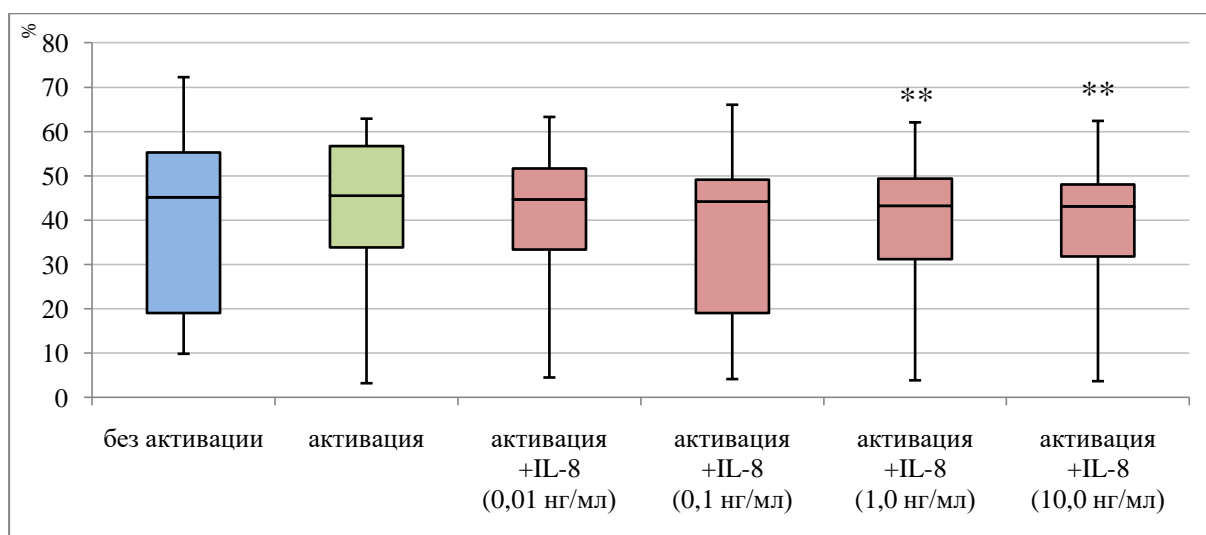


**Рисунок 12.** Количество (%) CD14<sup>+</sup>/CD119<sup>+</sup> Мц/Мф.



\*\*  $p < 0,05$  – в сравнении с пробой с активатором.

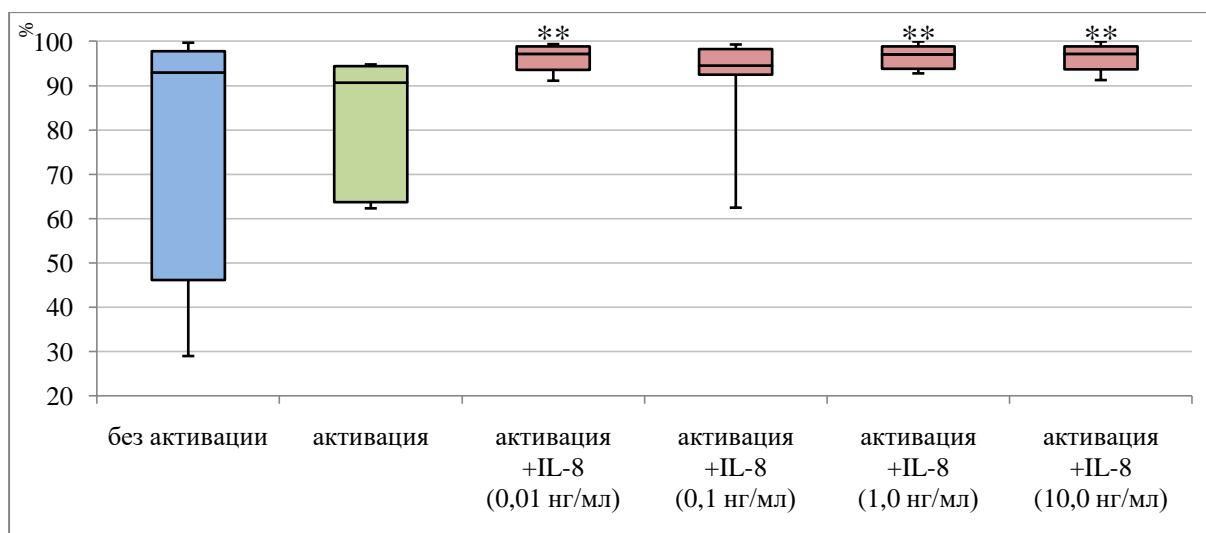
Молекула CD124 относится к 1 типу рецепторов IL-4. Связывание этого рецептора с соответствующим лигандом способствует M2 альтернативной активации Мц/Мф, которая ослабляет их воспалительную активность (Martinez F.O., Gordon S., 2014; Nelms K., 1999). Активация Мц/Мф не влияла на количество  $CD14^+/CD124^+$  клеток. Тем не менее, добавление к активированным клеткам IL-8 в концентрациях 1,0 и 10,0 нг/мл приводило к снижению числа  $CD14^+/CD124^+$  Мц/Мф (рисунок 13).



**Рисунок 13.** Количество (%)  $CD14^+/CD124^+$  Мц/Мф.

\*\*  $p < 0,05$  – в сравнении с пробой с активатором.

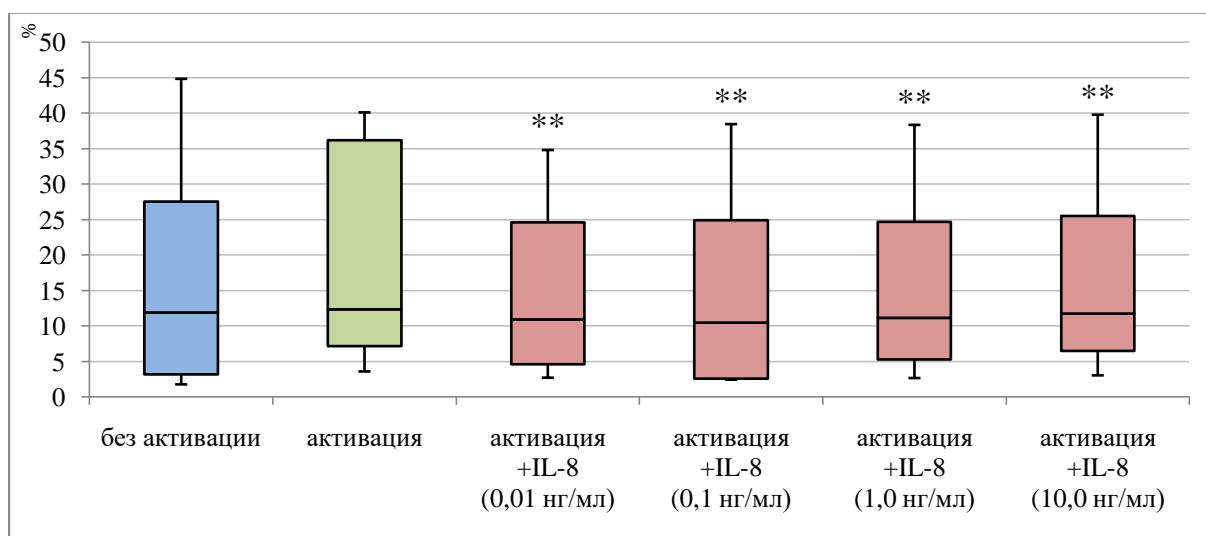
Активация Мц/Мф существенно не изменяла количество  $CD14^+/CD197^+$  клеток. Вместе с тем, IL-8 в трех концентрациях (0,01; 1,0; 10,0 нг/мл) вызывал достоверное увеличение содержания  $CD197^+$  клеток среди активированных Мц/Мф (рисунок 14).



**Рисунок 14.** Количество (%) CD14<sup>+</sup>/CD16<sup>+</sup> Мц/Мф.

\*\*  $p < 0,05$  – в сравнении с пробой с активатором.

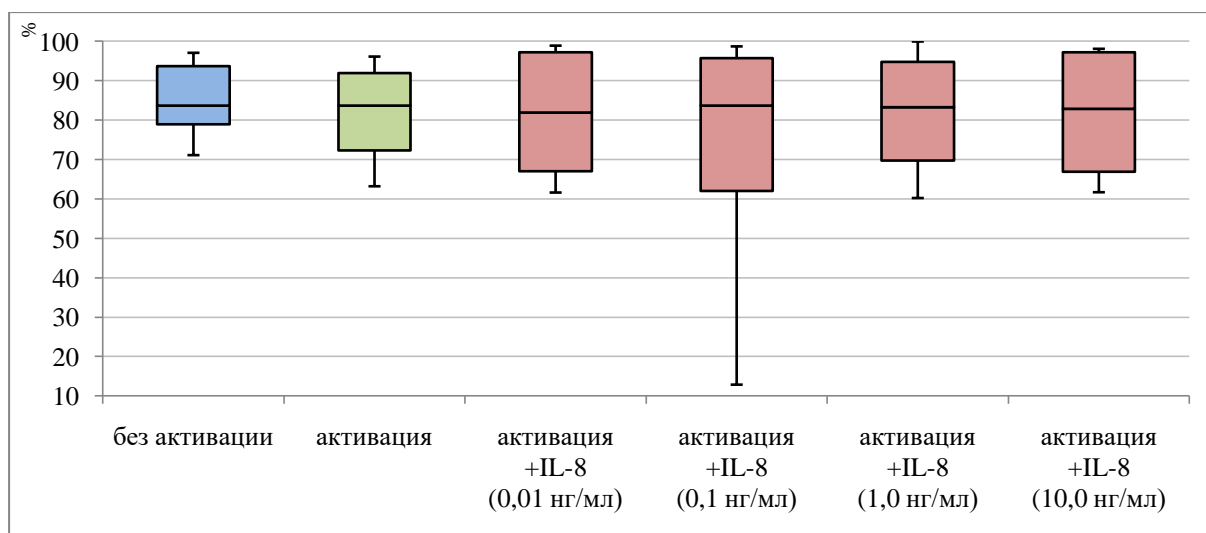
Активация Мц/Мф не оказывала значимого влияния на количество CD14<sup>-</sup>/CD16<sup>+</sup> клеток. В то же время, IL-8 обладал способностью снижать число CD14<sup>-</sup>/CD16<sup>+</sup> клеток среди активированных Мц/Мф (**рисунок 15**).



**рисунок 15.** Количество (%) CD14<sup>-</sup>/CD16<sup>+</sup> Мц/Мф.

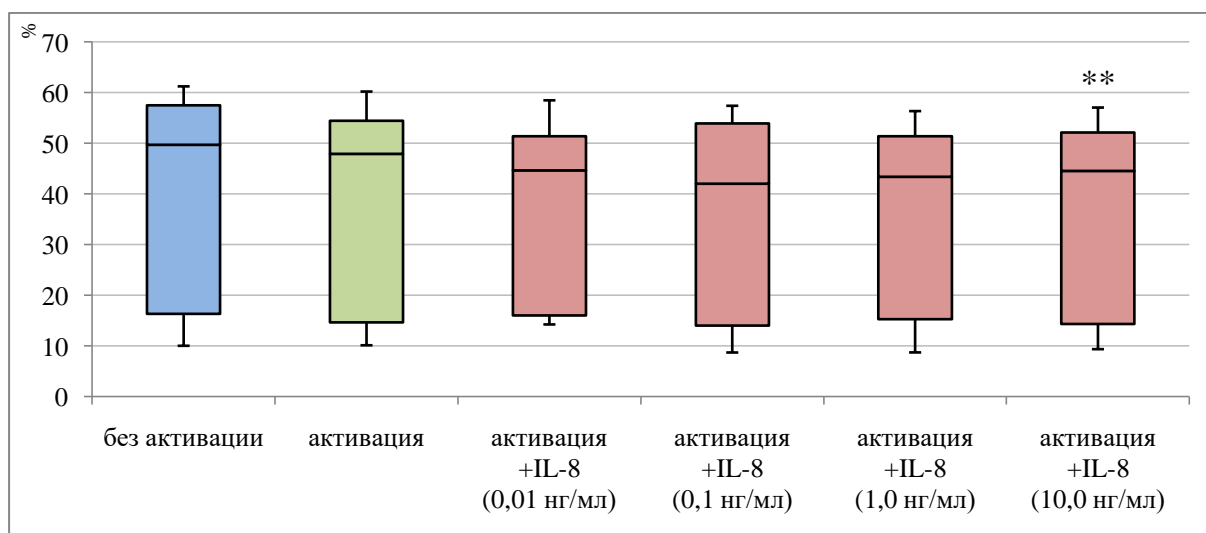
\*\*  $p < 0,05$  – в сравнении с пробой с активатором.

Как показано на **рисунок 16**, ни ЛПС, ни IL-8 не оказывали существенного влияния на уровни CD14<sup>-</sup>/CD119<sup>+</sup> клеток.



**Рисунок 16.** Количество (%)  $CD14^-/CD119^+$  Мц/Мф.

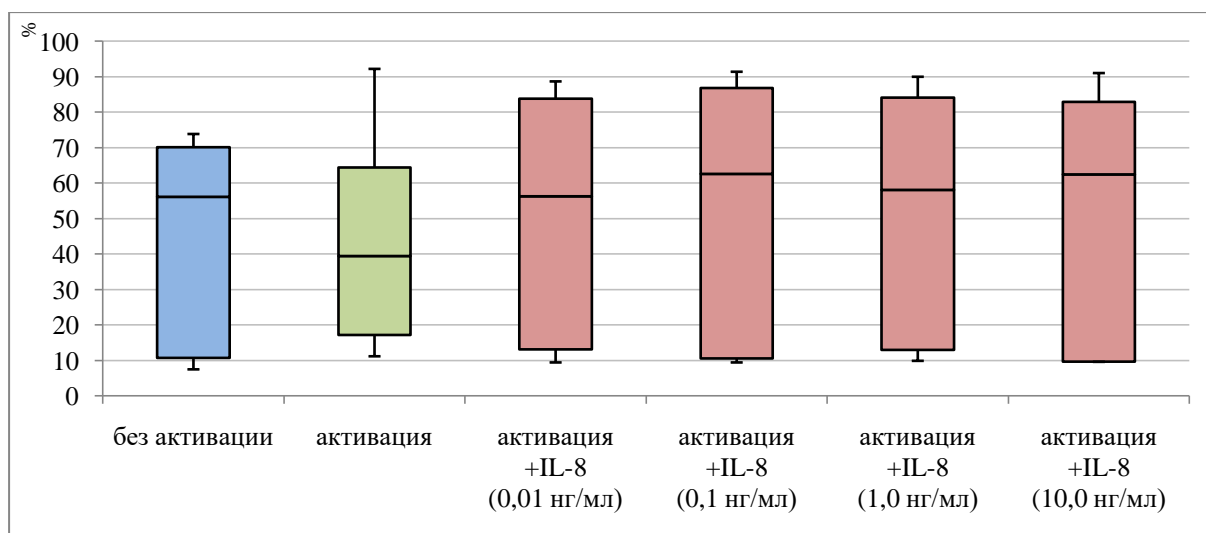
Исходное количество  $CD14^-/CD124^+$  клеток в контрольных образцах составило 49,8 (16,3-57,5) %. Добавление ЛПС не оказывало значимого влияния на уровень  $CD14^-/CD124^+$  клеток. Как показано на **рисунке 17** IL-8 при максимальной концентрации снижал число активированных  $CD14^-/CD124^+$  среди Мц/Мф.



**Рисунок 17.** Количество (%)  $CD14^-/CD124^+$  Мц/Мф.

\*\*  $p < 0,05$  – в сравнении с пробой с активатором.

Данные **рисунка 18** свидетельствовали об отсутствии влияния ЛПС и IL-8 на количество  $CD14^-/CD197^+$  клеток.

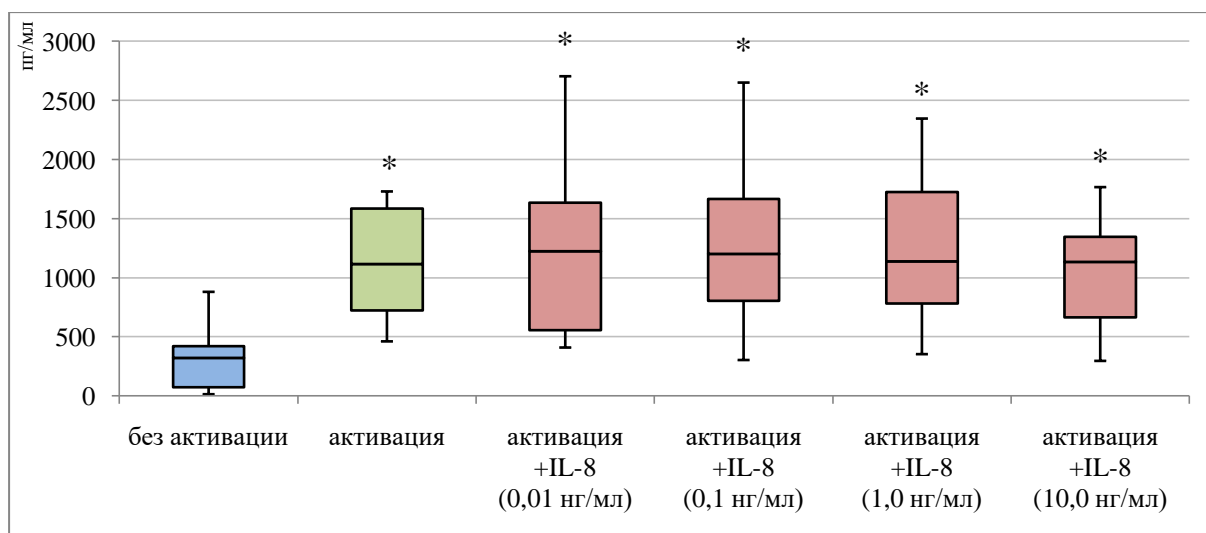


**Рисунок 18.** Количество (%) CD14<sup>+</sup>/CD197<sup>+</sup> Мц/Мф.

Таким образом, полученные данные указывают на способность IL-8 повышать чувствительность Мц/Мф к действию IFN- $\gamma$  и усиливать их миграцию в лимфоидные органы.

### 3.2.2. Влияние IL-8 на секрецию цитокинов Мц/Мф

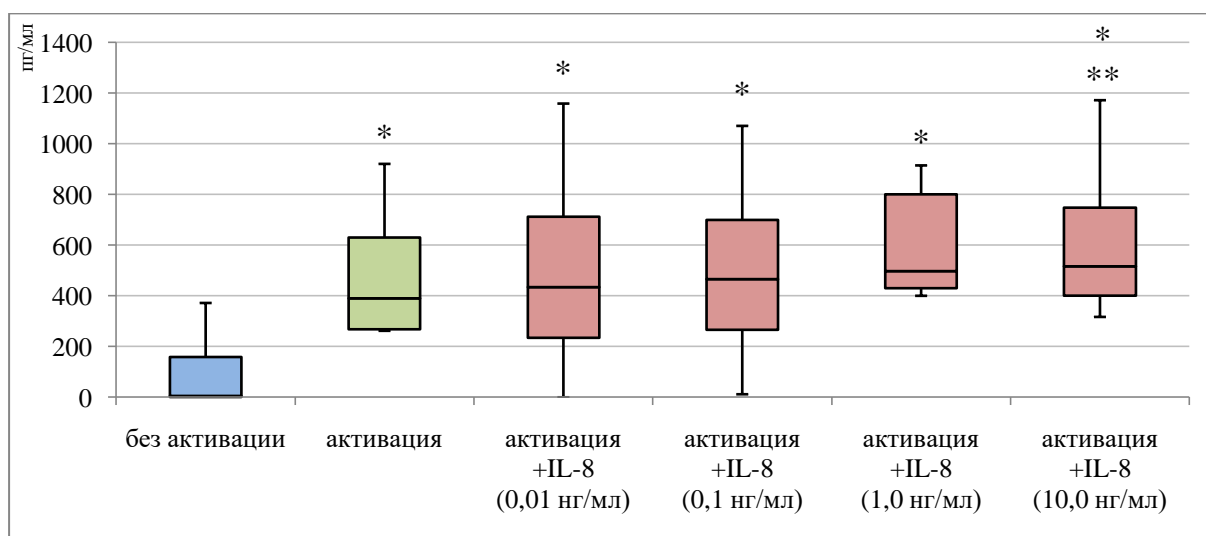
TNF- $\alpha$  – провоспалительный цитокин, синтезируется Мц/Мф, участвует в активации лейкоцитов, стимулирует продукцию ряда других провоспалительных цитокинов (Pfeffer К., 2003). Продукция TNF- $\alpha$  неактивированными Мц/Мф соответствовала уровню 320,8 (74,2-421,6) пг/мл. Активация Мц/Мф усиливала продукцию TNF- $\alpha$  до 1114,3 (722,2-1586,4) пг/мл. При этом IL-8 не оказывал достоверного влияния на продукцию этого цитокина, осуществляемую CD14<sup>+</sup> Мц/Мф (рисунок 19).



**Рисунок 19.** Продукция (пг/мл) TNF- $\alpha$  Мц/Мф.

\*  $p < 0,05$  – в сравнении с пробой без активатора.

IL-1 $\beta$  – провоспалительный цитокин является медиатором воспалительного ответа, продуцируются активированными Мц/Мф, вовлечен в процессы пролиферации, активации и апоптоза лимфоцитов (Duque G.A., Descoteaux A., 2014). Исходно концентрация IL-1 $\beta$  составляла 5,7 (0-157,6) пг/мл. Активация увеличивала продукции IL-1 $\beta$  до 390,0 (267,6-631,2) пг/мл. Как показано на **рисунке 20**, IL-8 в максимальной концентрации 10,0 нг/мл оказывал значимое позитивное влияние на клеточную продукцию IL-1 $\beta$ .

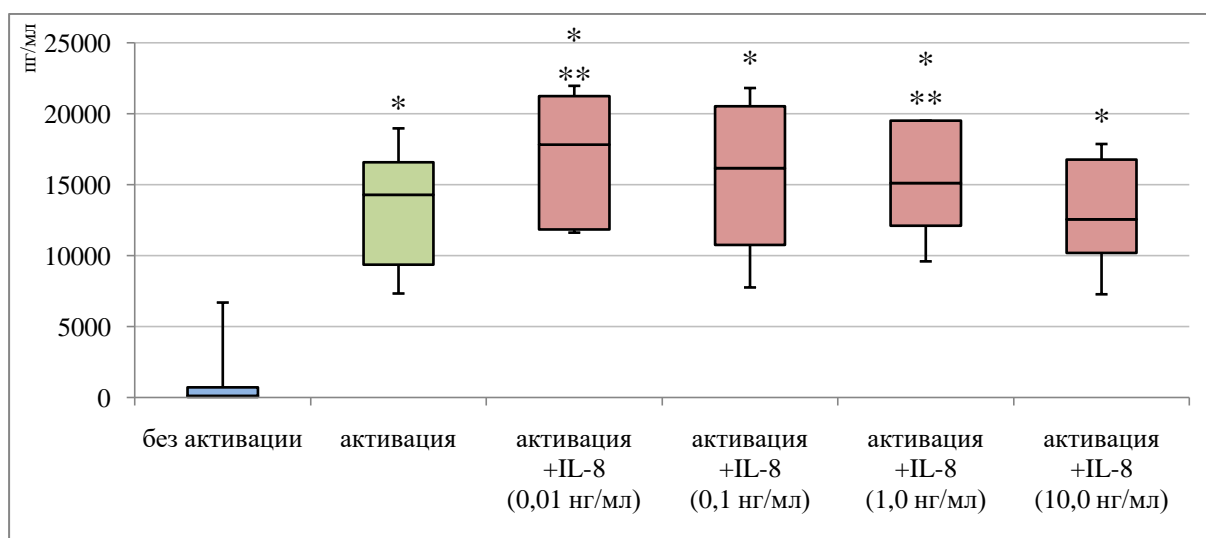


**рисунок 20.** Продукция Мц/Мф IL-1 $\beta$  (пг/мл).

\*  $p < 0,05$  – в сравнении с пробой без активатора;

\*\*  $p < 0,05$  – в сравнении с пробой с активатором.

IL-6 может оказывать как противо-, так и провоспалительное действие. Он синтезируется активированными Мф и Т-клетками (Duque G.A., Descoteaux A., 2014). Исходно содержание IL-6 в интактных культурах Мц/Мф было равным 124,0 (36,0-733,5) пг/мл. Культивирование Мц/Мф с ЛПС увеличивало продукцию IL-6 до 14314,0 (9382,5-16584,0) пг/мл. Как показано на **рисунке 21**, IL-8 оказывал стимулирующее действие на продукцию IL-6, однако, его действие было статистически достоверным только при концентрациях 0,01 и 1,0 нг/мл.

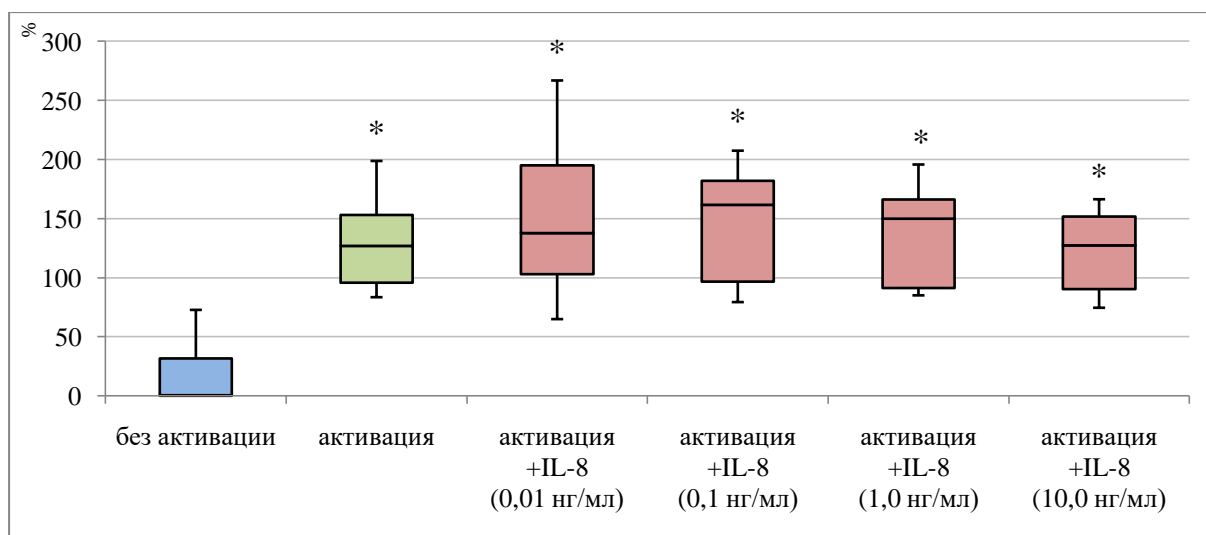


**рисунк 21.** Продукция Мц/Мф IL-6 (пг/мл).

\*  $p < 0,05$  – в сравнении с пробой без активатора;

\*\*  $p < 0,05$  – в сравнении с пробой с активатором.

IL-10 является противовоспалительным цитокином. Он снижает секрецию цитокинов, продуцируемых Th1 клетками (Couper K.N. et al., 2008). Продукция IL-10 неактивированными клетками составляла 0,8 (0-31,6) пг/мл. ЛПС стимулировал продукцию IL-10 до 126,8 (95,9-152,9) пг/мл. Как показано на **рисунке 22**, IL-8 не оказывал значимого влияния на продукцию IL-10.



**Рисунок 22.** Продукция Мц/Мф IL-10 (пг/мл).

\*  $p < 0,05$  – в сравнении с пробой без активатора.

Таким образом, полученные данные указывают на способность IL-8 потенцировать осуществляемую активированными Мц/Мф продукцию провоспалительных цитокинов.

### 3.3. Влияние IL-8 на Т-клеточный адаптогенез

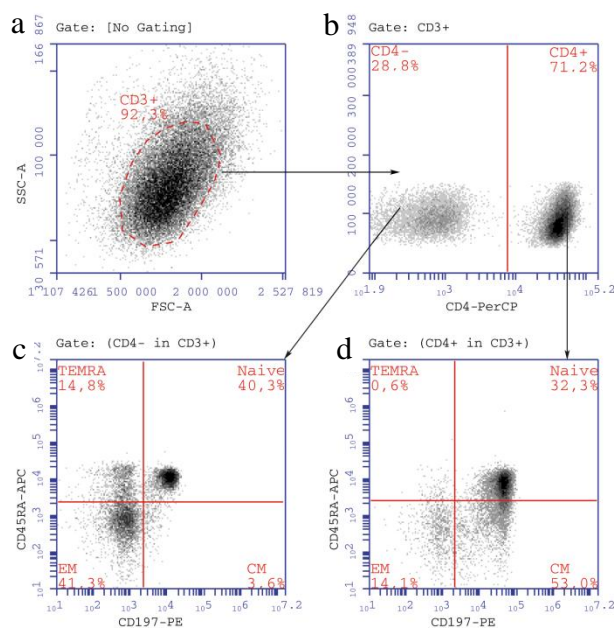
#### 3.3.1. Влияние активации и IL-8 на экспрессию рецептора к IL-8 на Т-лимфоцитах и на Т-клеточную продукцию IL-8

Первоначально установили, что активация Т-клеток приводила к повышению концентрации IL-8 в культуральных супернатантах с 141,7 (50,0-120,0) пг/мл до 303,3 (200,0-236,0) пг/мл. Эти данные предполагают вовлеченность IL-8 в аутокринную регуляцию функциональной активности Т-лимфоцитов. Далее исследовали мембранную экспрессию рецептора IL-8 (CD181) на Т-клеточных субпопуляциях.

CD45RA изоформа молекулы семейства CD45 – общелейкоцитарного антигена. Наивные Т-лимфоциты экспрессируют большую изоформу CD45 – CD45RA. Активированные Т-клетки памяти экспрессируют короткую изоформу CD45RO (Arlettaz L. et al., 1999).

CD197 (CCR7, СС-рецептор хемокина 7) экспрессируется на ДК, наивных Т и В-лимфоцитах, Т-регуляторных и на Т-клетках центральной памяти (Förster R. et al., 2008). Регулирует хоуминг Т-клеток во вторичные лимфоидные органы, такие как лимфатические узлы и селезенка.

На основе определения мембранной экспрессии молекулы CD4, Т-лимфоциты относили к  $CD4^+$  (CD4-позитивным) и  $CD4^-$  (CD4-негативным) клеткам. Среди них по наличию или отсутствию молекул CD45RA и CD197 идентифицировали Т-клетки с наивным фенотипом ( $CD45RA^+CD197^+$ ), Т-лимфоциты центральной памяти ( $CD45RA^-CD197^+$ ), эффекторные Т-клетки ( $CD45RA^+CD197^-$ ) и терминально-дифференцированные эффекторные Т-лимфоциты ( $CD45RA^+CD197^-$ ) (рисунок 23).



**Рисунок 23.** Идентификация субпопуляций Т-клеток.

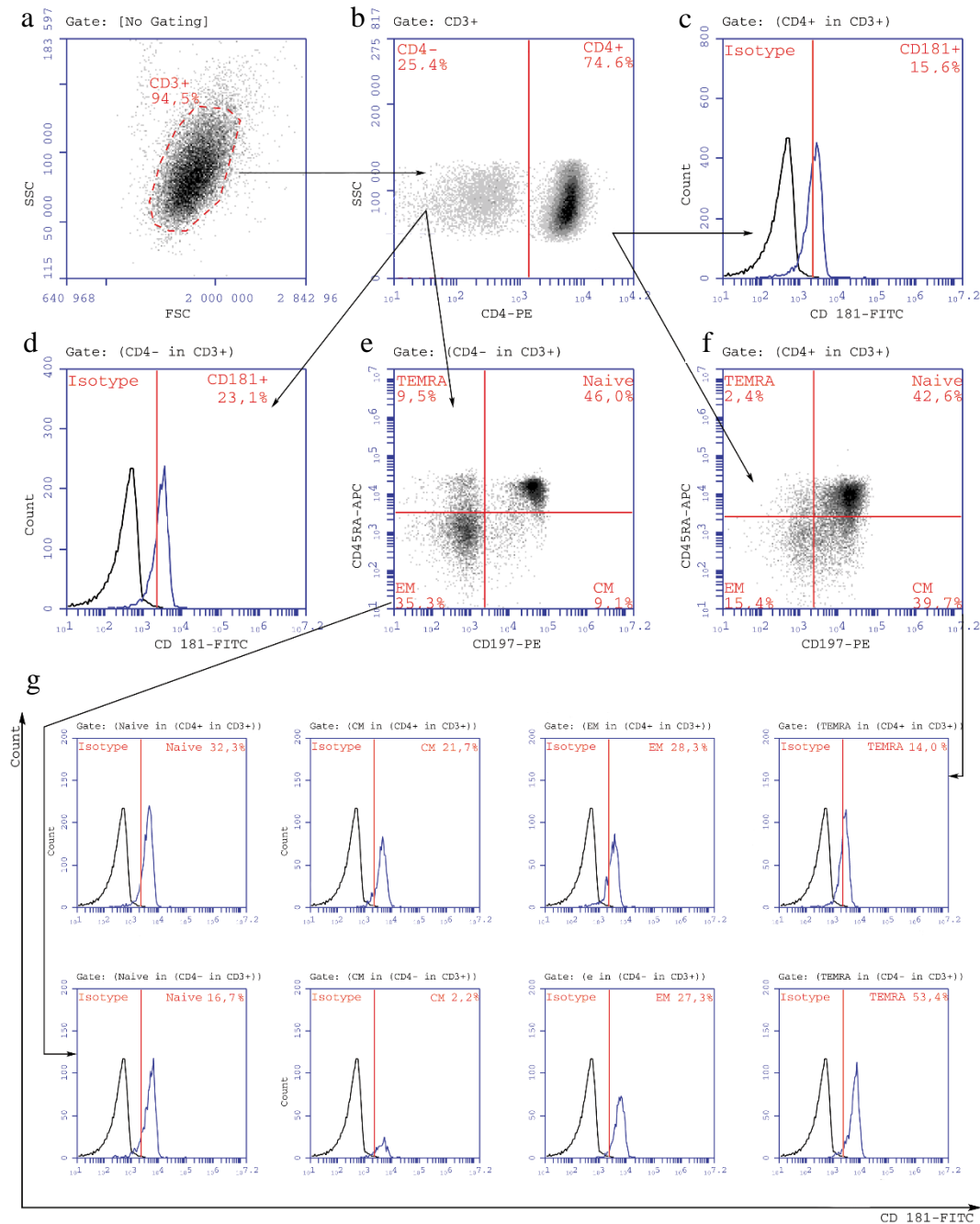
- a) распределение клеток по прямому (FSC) и боковому (SSC) светорассеянию;
- b) определение CD4-позитивных и CD4-негативных Т-клеток по уровню экспрессии молекулы CD4;
- c) определение субпопуляций среди CD4-позитивных Т-клеток по уровню экспрессии молекул CD197 и CD45RA;
- d) определение субпопуляций среди CD4-негативных Т-клеток по уровню экспрессии молекул CD197 и CD45RA.

Рецептор к IL-8 (IL-8RA, CD181, CXCR1) является G-белок связанным рецептором, с высоким сродством к IL-8 – главному медиатору иммунных и воспалительных реакций. CXCR1 присутствует на поверхности нейтрофилов, Мц/Мф, Т-лимфоцитов. Взаимодействие IL-8 с его рецептором приводит к



активации внутриклеточных сигнальных путей, что приводит к миграции клеток мишеней в очаг воспаления (Raghuwanshi S.K. et al., 2012).

На рисунке 24 представлен разработанный алгоритм цитометрического анализа для определения количества  $CD181^+$  Т-клеток при различных условиях культивирования.

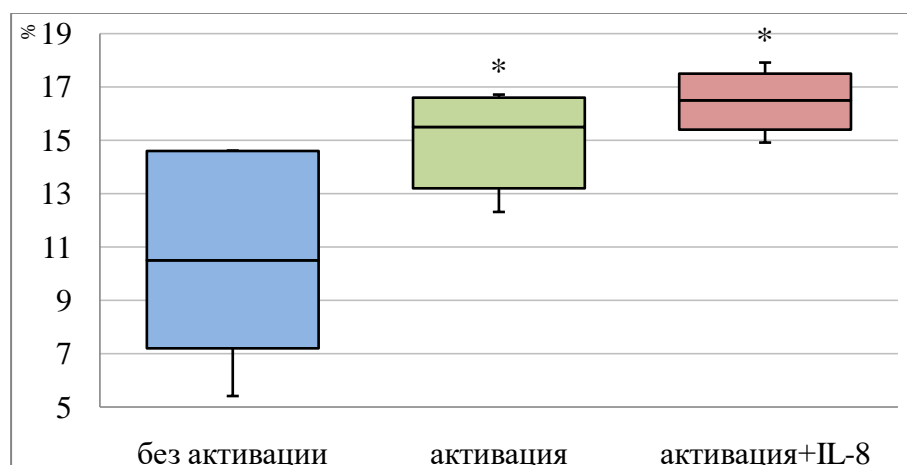


**Рисунок 24.** Алгоритм цитометрического анализа Т-лимфоцитов при определении  $CD181^+$  клеток

- а) распределение клеток по прямому (FSC) и боковому (SSC) светорассеянию;
- б) идентификация CD4-позитивных и CD4-негативных клеток. Зона позитива и зона негатива, соответственно.
- с) содержание  $CD181^+$  лимфоцитов среди CD4-позитивных клеток;

- d) содержание  $CD181^+$  лимфоцитов среди  $CD4$ -негативных клеток
- e) идентификация наивных Т-клеток, Т-лимфоцитов центральной памяти, Т-клеток эффекторной памяти и терминально-дифференцированных Т-эффекторов среди  $CD4$ -негативных клеток по экспрессии молекул  $CD197$  и  $CD45RA$ ;
- f) идентификация наивных Т-клеток, Т-лимфоцитов центральной памяти, Т-клеток эффекторной памяти и терминально-дифференцированных Т-эффекторов клеток среди  $CD4$ -позитивных клеток;
- g) содержание  $CD181^+$  лимфоцитов среди наивных Т-клеток, Т-лимфоцитов центральной памяти, Т-клеток эффекторной памяти и терминально-дифференцированных Т-эффекторов в  $CD4$ -позитивной и  $CD4$ -негативной Т-субпопуляциях.

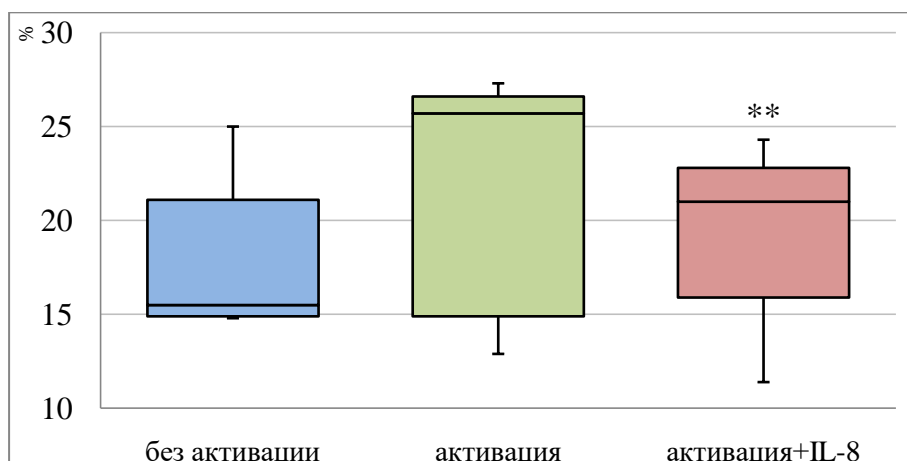
Первоначально было установлено, что  $IL-8$  во всех исследованных концентрациях не оказывал значимого влияния на содержание  $CD181^+$  клеток среди неактивированных Т-лимфоцитов (данные не представлены). Поэтому, далее представлены пробы, в которые  $IL-8$  был добавлен в максимальной концентрации – 10 нг/мл. Относительное количество  $CD181^+$  клеток среди суммарной популяции активированных  $CD4$ -позитивных Т-лимфоцитов составляло 15,5 (13,2-16,6) %, что статистически значимо больше количества таких клеток 10,5 (7,2-14,6) % среди неактивированных Т-лимфоцитов. Как показано на **рисунке 25**, добавление  $IL-8$  не оказывало существенного влияния на этот процесс.



**рисунок 25.** Количество (%)  $CD181^+$  клеток среди популяции  $CD4$ -позитивных Т-лимфоцитов.  
\*  $p < 0,05$  – в сравнении с пробами без активатора.

В пробах без активации, относительное количество интактных  $CD4$ -негативных Т-клеток, несущих на своей поверхности  $CXCR1$  было равным 15,5 (14,9-21,1) %. Т-клеточная активация приводила лишь к статистически недостоверному увеличению  $CD181^+/CD4^-$  Т-лимфоцитов до 25,7 (14,9-26,6) %.

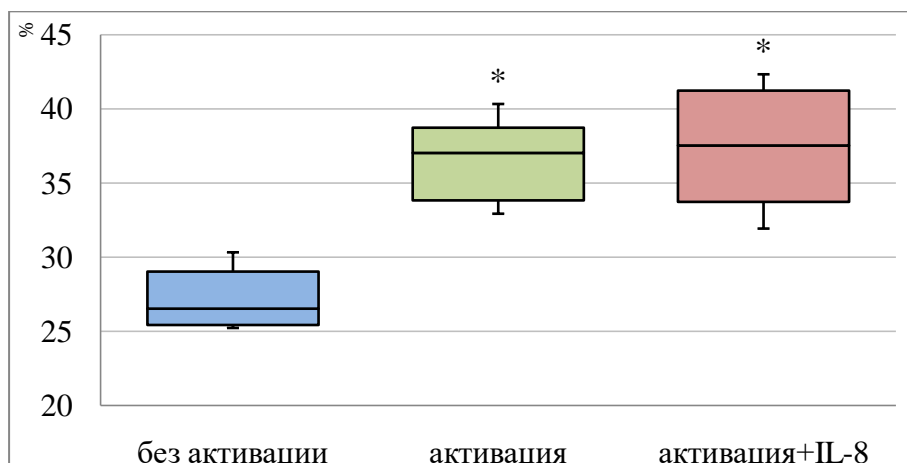
Вместе с тем, как показано на **рисунке 26**, добавление IL-8 к активируемым Т-клеткам приводило к значимому снижению относительного числа CD181<sup>+</sup> клеток среди CD4-негативных Т-лимфоцитов.



**Рисунок 26.** Содержание (%) CD181<sup>+</sup> клеток среди CD4-негативных Т-лимфоцитов

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

В популяции CD4-позитивных наивных Т-лимфоцитов, Т-клеточная активация сопровождалась увеличением количества CD181<sup>+</sup> клеток с 26,5 (25,4-29,0) % до 37,0 (33,8-38,7) %. Относительное число CD181<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>/CD45RA<sup>+</sup>/CD197<sup>+</sup> Т-клеток не изменялось при добавлении IL-8 (**рисунк 27**).

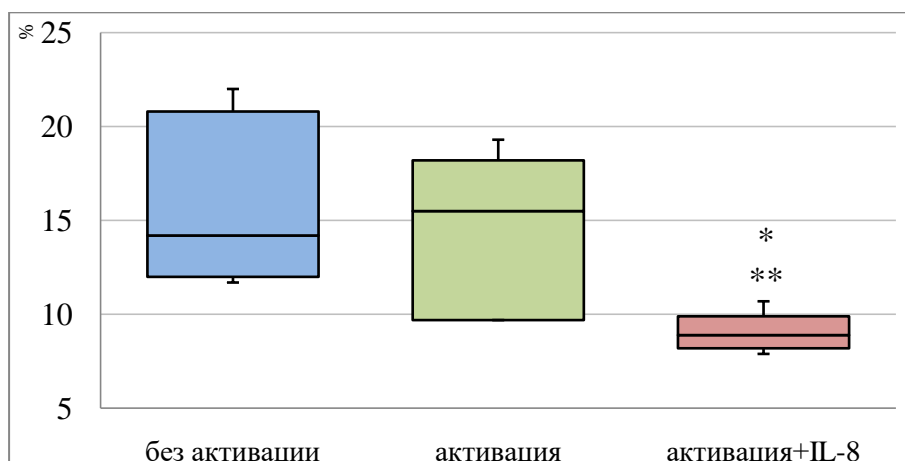


**Рисунок 27.** Содержание (%) CD181<sup>+</sup> клеток среди CD4-позитивных наивных Т-лимфоцитов.

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

В пробах без активации, относительное количество наивных CD4-негативных Т-лимфоцитов, несущих на своей поверхности CD181, было равным 14,2 (12,0-20,8) %. Т-клеточная активация не приводила к статистически достоверным изменениям количества CD181<sup>+</sup> клеток среди CD4-негативных наивных Т-

лимфоцитов – 15,5 (9,7-18,2) %. Добавление IL-8 в активационные пробы приводило к достоверному снижению числа CD181<sup>+</sup> CD4-негативных наивных Т-лимфоцитов (**рисунок 28**).

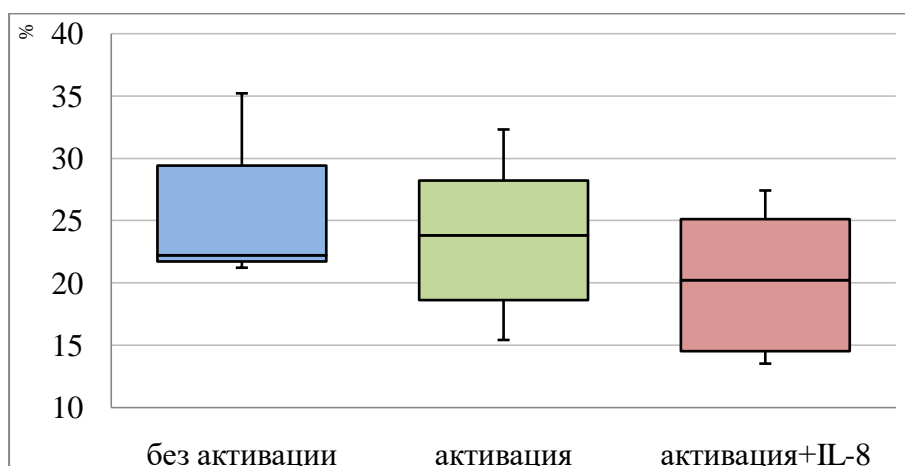


**Рисунок 28.** Содержание (%) CD181<sup>+</sup> клеток среди CD4-негативных наивных Т-лимфоцитов.

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

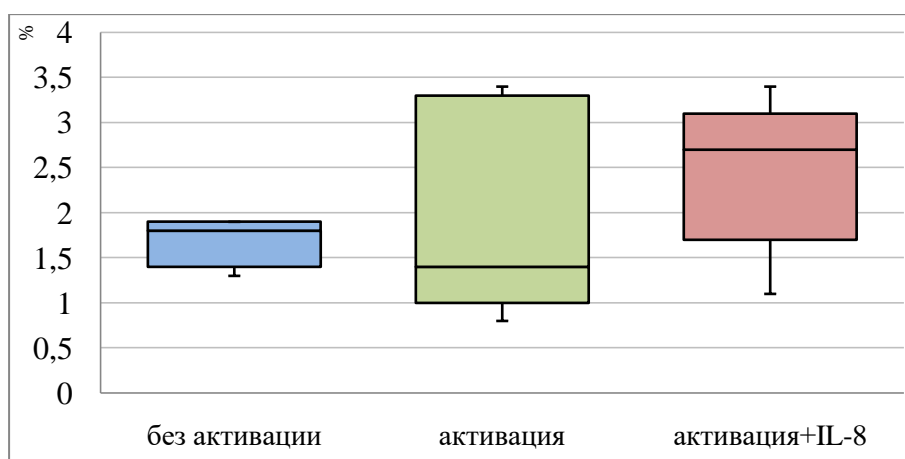
\*\*  $p < 0,05$  – в сравнении с пробой с Т-клеточной активацией.

Интересно, что как Т-клеточная активация, так и IL-8 не оказали значимого влияния на экспрессию молекулы CXCL8 (CD181) среди CD4<sup>+</sup> Т-клеток центральной памяти (**рисунок 29**).



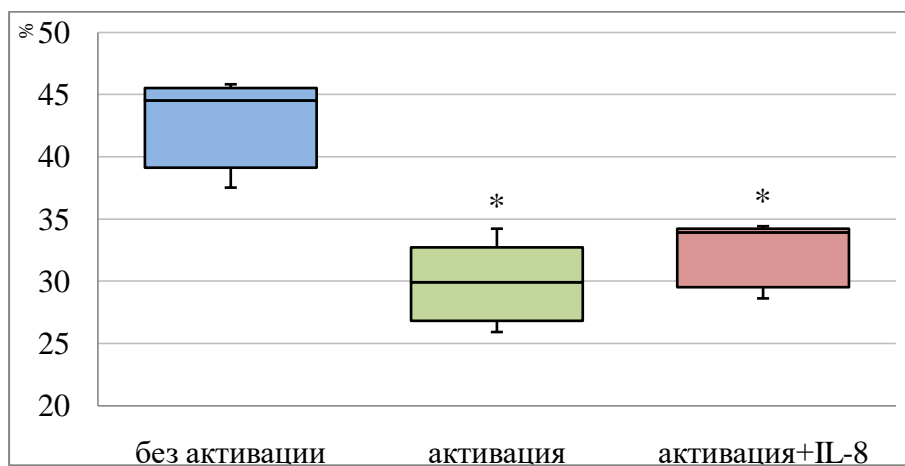
**Рисунок 29.** Содержание (%) CD181<sup>+</sup> клеток среди CD4-позитивных Т-лимфоцитов центральной памяти.

Аналогичные результаты были получены среди CD4-негативных Т-лимфоцитов. Активация Т-клеток, а также добавление IL-8 не оказывали статистически достоверного влияния на изменение количества CD181<sup>+</sup> Т-клеток **рисунок 30**.



**Рисунок 30.** Количество (%)  $CD181^+$  клеток среди  $CD4$ -негативных Т-лимфоцитов центральной памяти.

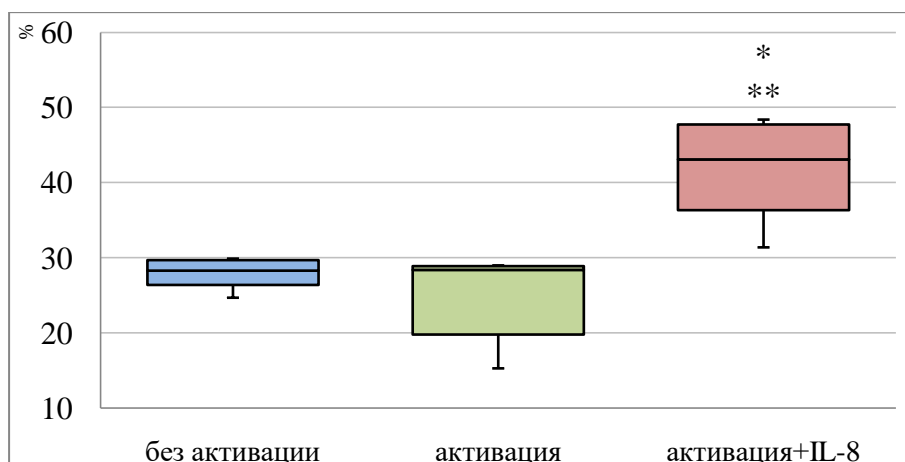
В то же время, Т-клеточная активация приводила к снижению относительного количества  $CD181^+$  среди  $CD4$ -позитивных Т-лимфоцитов эффекторной памяти. Однако эти эффекты IL-8 на активируемые Т-клетки оказались статистически незначимыми (рисунок 31).



**Рисунок 31.** Количество (%)  $CD181^+$  клеток среди  $CD4$ -позитивных Т-лимфоцитов эффекторной памяти

\*  $p < 0,05$  – в сравнении с пробой без активатора.

Активация значимо не влияла на количество  $CD181^+$  среди  $CD4$ -негативных Т-эффекторов. В то же время, IL-8, добавленный к активируемым Т-клеткам, вызывал достоверное увеличение числа  $CD181^+/CD4^-$  Т-лимфоцитов эффекторной памяти (рисунок 32).

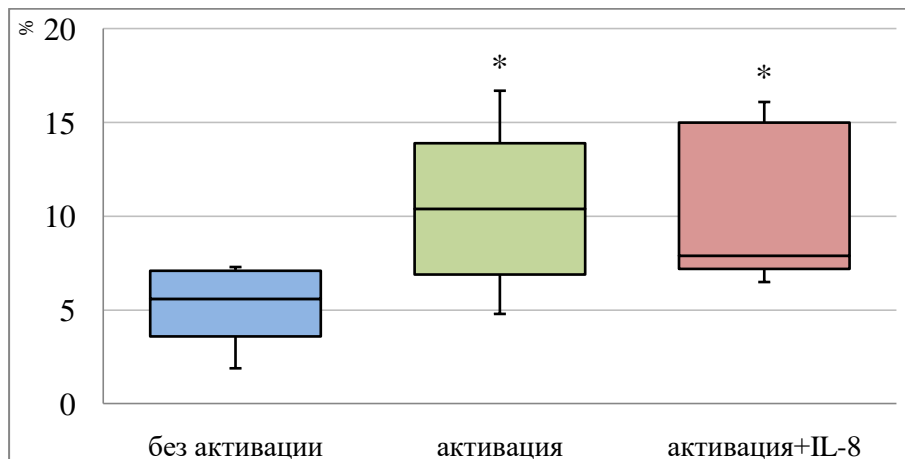


**рисунок 32.** Количество (%)  $CD181^+$  клеток среди  $CD4$ -негативных Т-лимфоцитов эффекторной памяти.

\*  $p < 0,05$  – в сравнении с пробой без активатора;

\*\*  $p < 0,05$  – в сравнении с пробой с активатором.

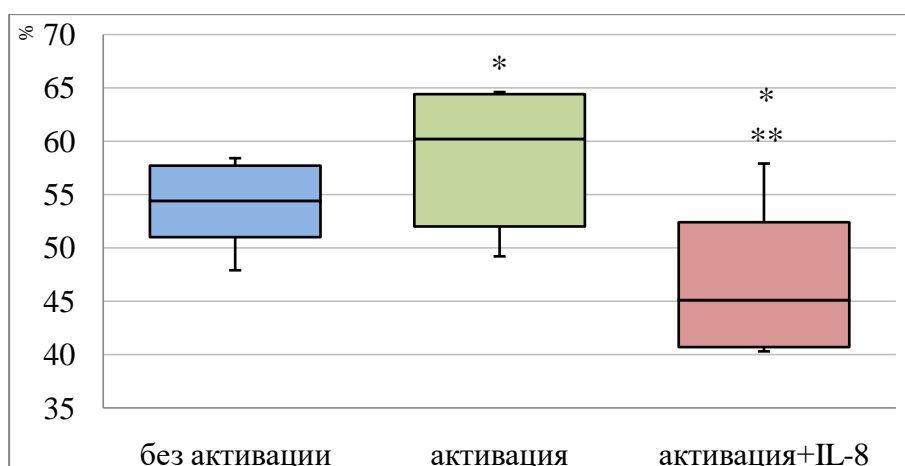
Как показано на **рисунке 33**, исходно, относительное число  $CD181^+$  клеток среди  $CD4$ -позитивных терминально-дифференцированных Т-эффекторов составляло 5,6 (3,6-7,1)%. Т-клеточная активация приводила к статистически значимому увеличению числа  $CD181^+$  клеток среди этих лимфоцитов до значения 10,4 (6,9-13,9) %. При этом IL-8 не оказывал значимого влияния на этот процесс.



**Рисунок 33.** Содержание (%)  $CD181^+$  клеток среди  $CD4$ -позитивных терминально дифференцированных Т-лимфоцитов.

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

Т-клеточная активация увеличивала число исследуемых  $CD181^+$  клеток среди  $CD4$ -негативных терминально-дифференцированных Т-эффекторов, тогда как IL-8 снижал число  $CD181^+/CD4^-$  терминально-дифференцированных Т-клеток в активируемых пробах (**рисунок 34**).



**Рисунок 34.** Количество (%) CD181<sup>+</sup> клеток среди CD4-негативных терминально дифференцированных Т-лимфоцитов.

\*  $p < 0,05$  – в сравнении с пробой без активатора;

\*\*  $p < 0,05$  – в сравнении с пробой с активатором.

Таким образом, чувствительность Т-лимфоцитов к действию IL-8 может зависеть от его субпопуляционной принадлежности. В целом полученные данные указывают на вовлеченность IL-8 в автономную саморегуляцию Т-клеточного иммуногенеза.

### 3.3.2. Прямое влияние IL-8 на субпопуляционный состав Т-лимфоцитов

Исходно выделенные Т-клетки имели следующий субпопуляционный состав (таблица 1):

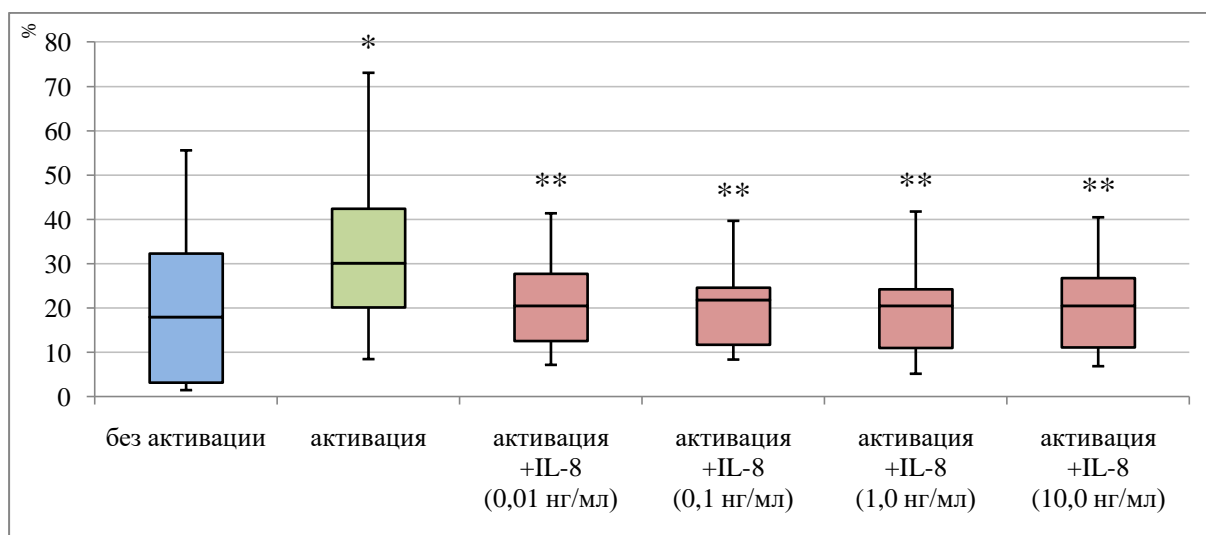
**Таблица 1.** Распределение Т-лимфоцитов по субпопуляциям без активации (%).

Субпопуляции	Без активации
Наивные CD4 <sup>+</sup> Т-клетки	17,9 (3,1-32,2)
Центральной памяти CD4 <sup>+</sup> Т-клетки	47,0 (33,0-53,7)
Эффекторные CD4 <sup>+</sup> Т cells	31,5 (16,3-49,3)
Терминально-дифференцированные эффекторные CD4 <sup>+</sup> Т-клетки	0,9 (0,4-4,0)
Наивные CD4 <sup>-</sup> Т-клетки	52,0 (32,2-61,1)
Центральной памяти CD4 <sup>-</sup> Т-клетки	19,6 (15,1-35,4)
Эффекторные CD4 <sup>-</sup> Т cells	12,2 (7,2-24,6)
Терминально-дифференцированные эффекторные CD4 <sup>-</sup> Т-клетки	6,9 (3,6-13,1)

Примечание: данные представлены в виде медианы, в скобках первый и третий квартили.

Как показано на рисунке 35, Т-клеточная активация приводила к достоверному приросту относительного числа CD4-позитивных Т-лимфоцитов с фенотипом наивных Т-лимфоцитов: с 17,9 (3,1-32,2) % до 30,2 (20,0-42,4) %

( $p < 0,05$ ). Интересно, что добавление к Т-клеткам IL-8 вместе с активирующими частицами практически нивелировало этот прирост.

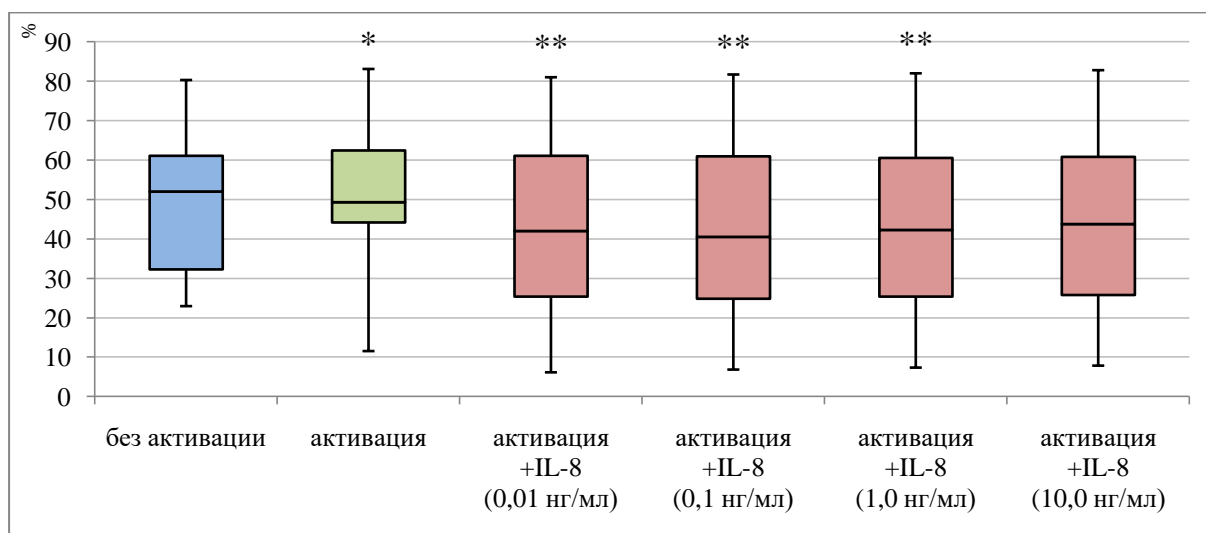


**Рисунок 35.** Содержание (%) CD4-позитивных наивных Т-лимфоцитов в Т-клеточных культурах.

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

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

Среди неактивированных Т-клеток, содержание CD4-негативных наивных Т-лимфоцитов было равным 52,0 (32,3-61,1) %. Т-клеточная активация не приводила к существенному изменению относительного содержания данных клеток – 49,4 (44,1-62,4) %. Как показано на **рисунке 36**, IL-8, добавленный к активируемым Т-клеткам в концентрациях 0,01, 0,1 и 1,0 нг/мл, приводил к достоверному снижению числа CD4-негативных наивных Т-лимфоцитов.



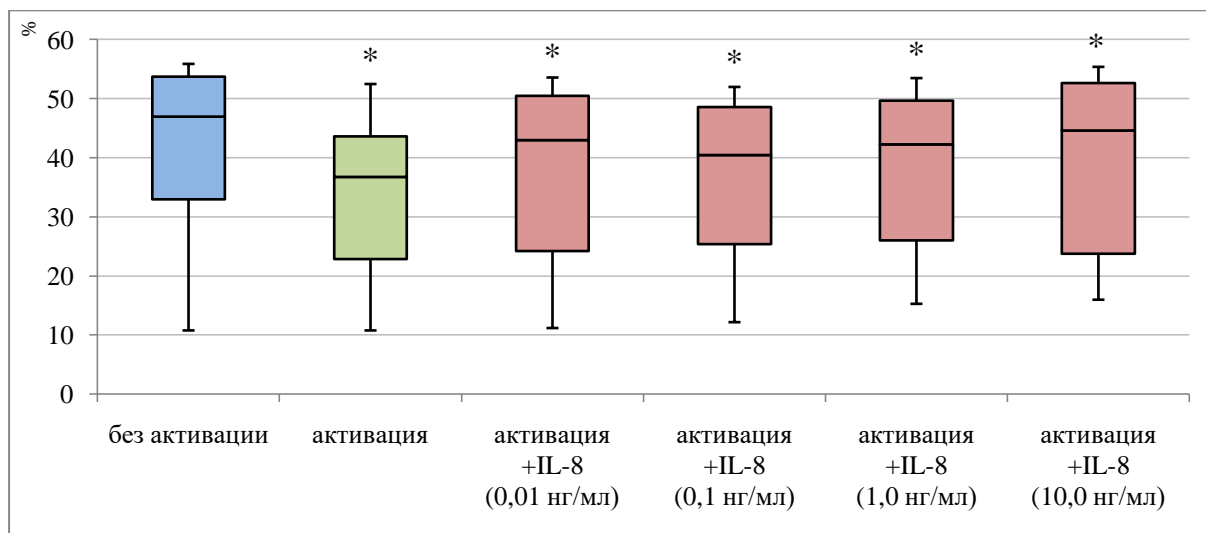
**Рисунок 36.** Содержание (%) CD4-негативных наивных Т-лимфоцитов в Т-клеточных культурах.

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



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

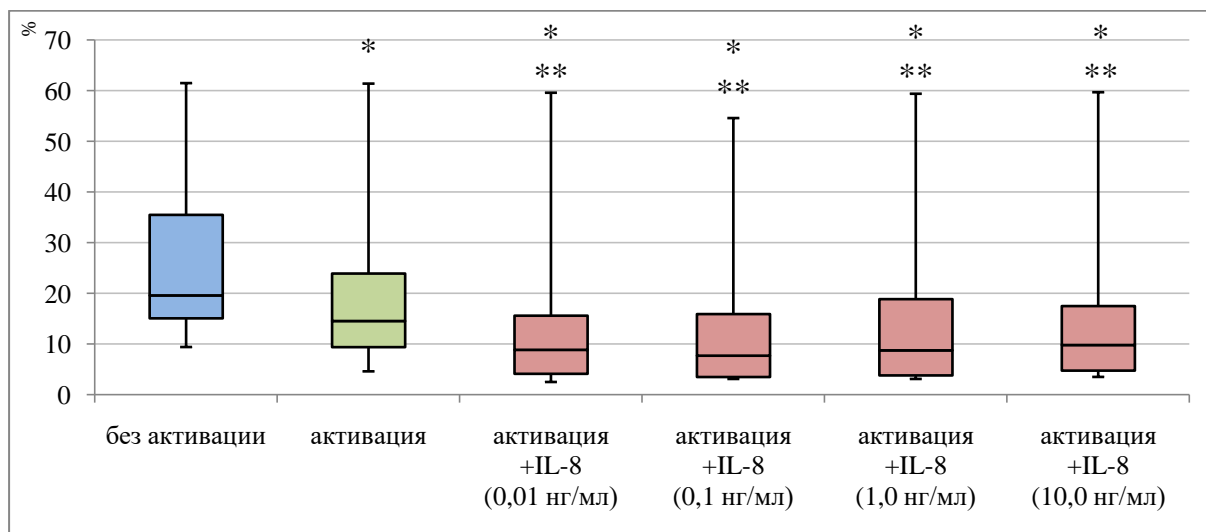
Как показано на **рисунок 37**, Т-клеточная активация также приводила к достоверному снижению числа  $CD4^+$  Т-лимфоцитов центральной памяти с 47,0 (33,0-53,7) % до 36,7 (22,8-43,5) %. При этом, добавление IL-8 не оказывало существенного влияния на этот процесс.



**Рисунок 37.** Содержание (%)  $CD4$ -позитивных Т-лимфоцитов центральной памяти в Т-клеточных культурах.

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

Т-клеточная активация также снижала содержание  $CD4$ -негативных Т-лимфоцитов центральной памяти с 19,7 (15,1-35,5) % до 14,6 (9,4-24,0) %. При всех исследованных концентрациях IL-8 достоверно способствовал такому снижению (**рисунок 38**).

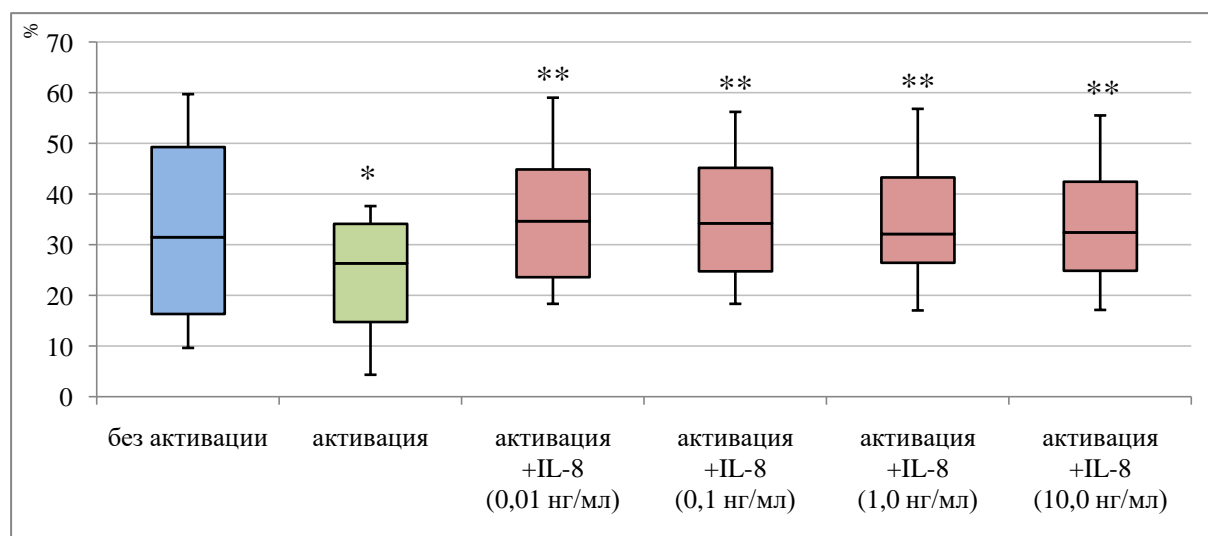


**Рисунок 38.** Содержание (%)  $CD4$ -негативных Т-лимфоцитов центральной памяти в Т-клеточных культурах.

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

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

На фоне активации снижалось относительное число  $CD4^+$  Т-лимфоцитов эффекторной памяти с 31,5 (16,4-49,4) % до 26,4 (14,8-34,2) % ( $p < 0,05$ ). Сочетанное действие активирующих частиц и IL-8 (во всех концентрациях) сопровождалось увеличением количества активированных  $CD4^+$  Т-лимфоцитов эффекторной памяти (**рисунок 39**).

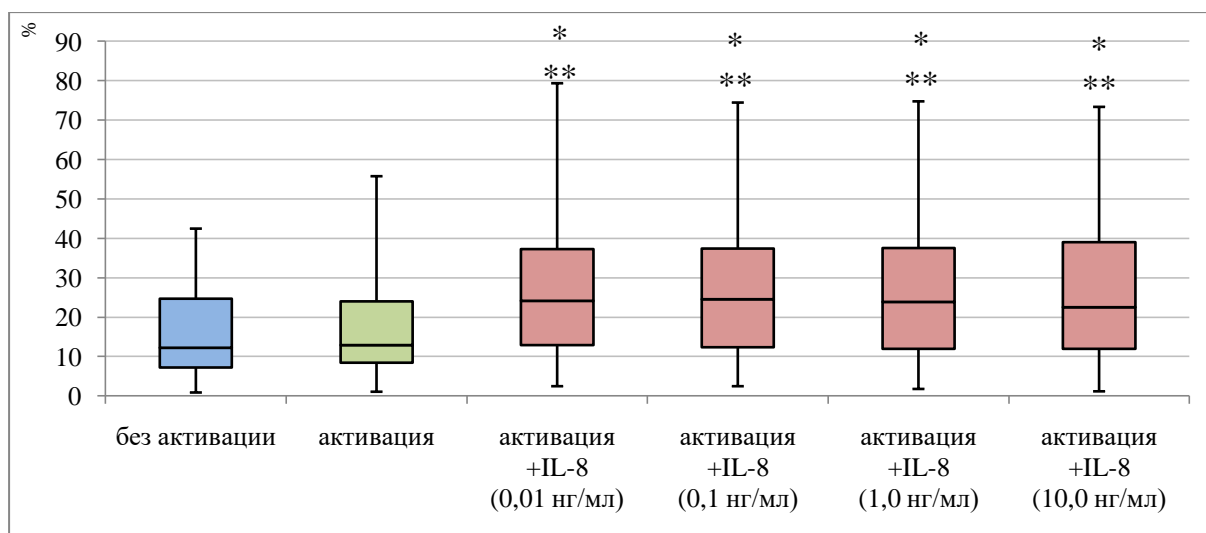


**Рисунок 39.** Содержание (%)  $CD4$ -позитивных Т-лимфоцитов эффекторной памяти в Т-клеточных культурах.

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

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

Исходно, среди выделенных Т-клеток, число  $CD4$ -негативных Т-лимфоцитов эффекторной памяти было равным 12,2 (7,2-24,7)%. Среди активированных Т-клеток содержание  $CD4$ -негативных эффекторных клеток составляло 12,9 (8,4-24,0) %. IL-8 во всех исследованных концентрациях увеличивал относительное содержание  $CD4$ -негативных эффекторных клеток среди активированных Т-лимфоцитов (**рисунок 40**).

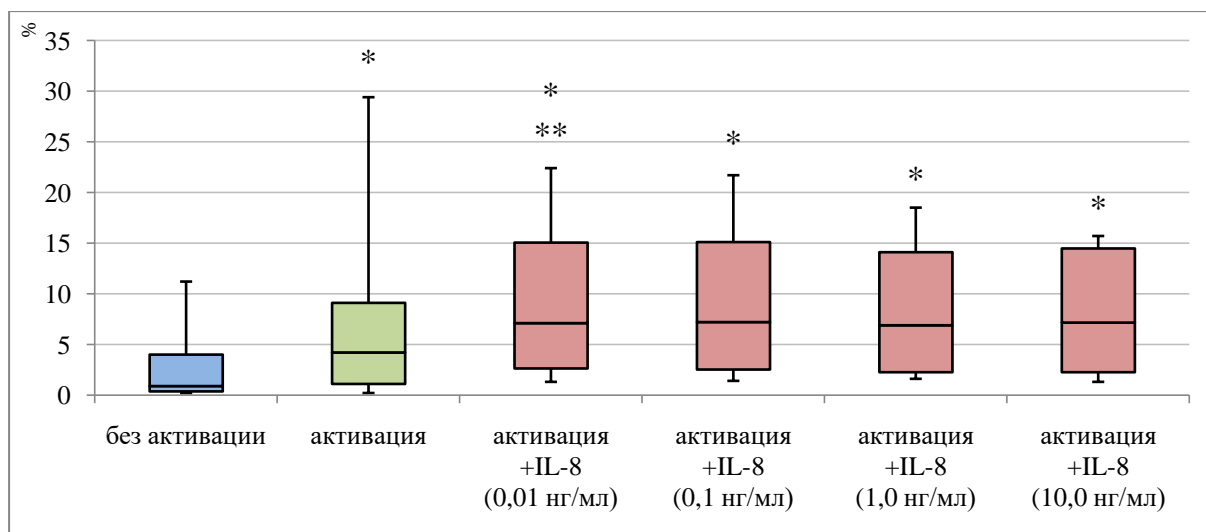


**Рисунок 40.** Содержание (%) CD4-негативных Т-лимфоцитов эффекторной памяти в Т-клеточных культурах.

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

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

Т-клеточная активация также приводила к достоверному увеличению относительного количества CD4-позитивных терминально-дифференцированных эффекторных Т-лимфоцитов с 0,9 (0,4-4,0) % до 4,3 (1,1-9,1)%. IL-8 в концентрации 0,01 нг/мл увеличивал содержание терминально-дифференцированных Т-эффекторов среди активированных Т-клеток. При остальных концентрациях IL-8 наблюдалась аналогичная тенденция, однако, она носила статистически недостоверный характер (рисунок 41).

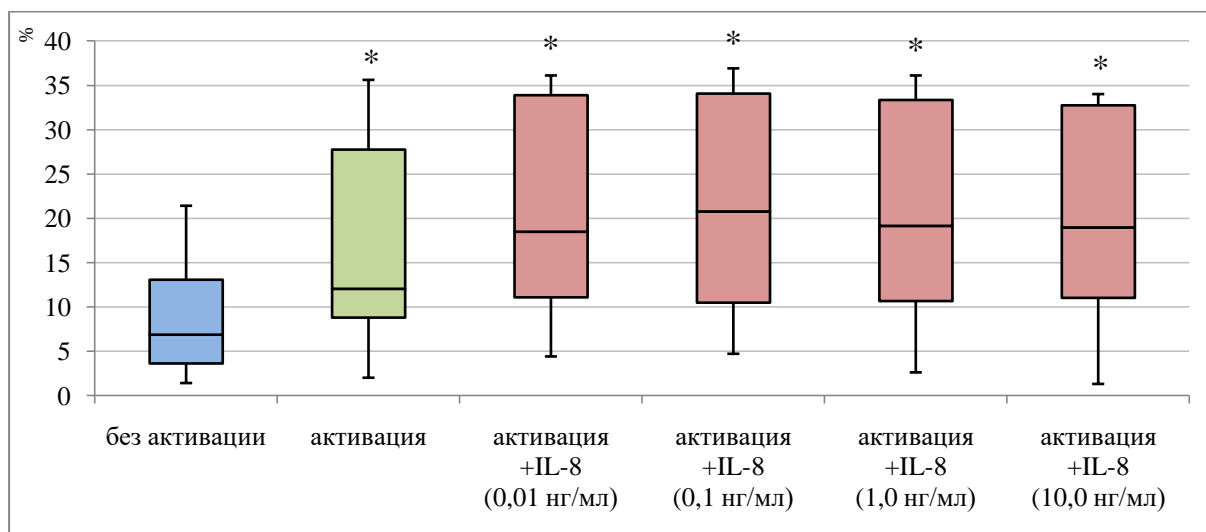


**Рисунок 41.** Содержание (%) CD4-позитивных терминально-дифференцированных Т-эффекторов в Т-клеточных культурах.

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

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

Исходно, среди выделенных Т-лимфоцитов, содержание CD4-негативных терминально-дифференцированных клеток-эффекторов составила 6,9 (3,6-13,1)%. Т-клеточная активация обеспечивала относительный прирост CD4-негативных терминально-дифференцированных Т-клеток до 12,1 (8,8-27,8) %. Как показано на **рисунке 42**, IL-8 (при всех концентрациях) не оказывал существенного влияния на этот прирост.



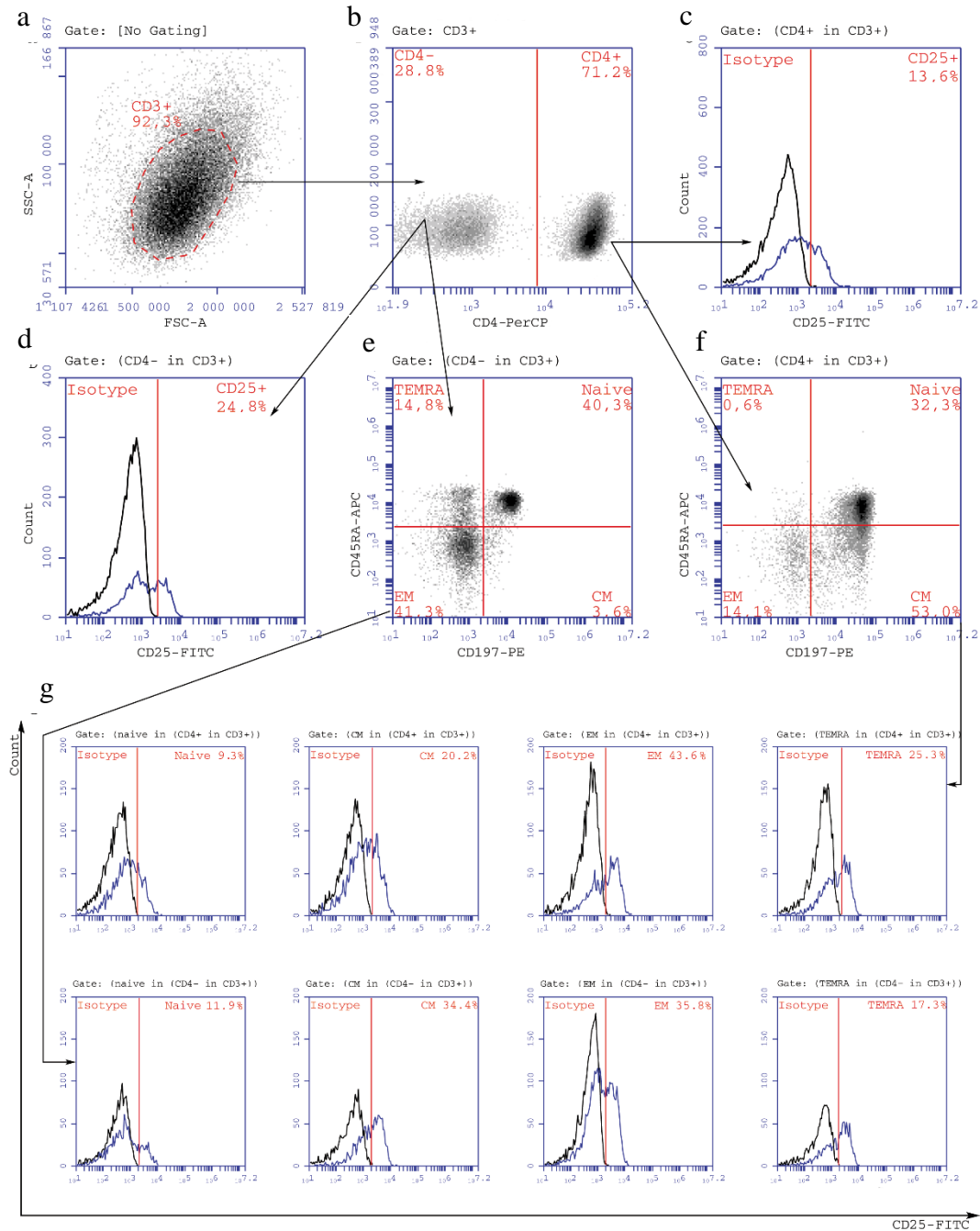
**Рисунок 42** Содержание (%) CD4-негативных терминально-дифференцированных Т-эффекторов в Т-клеточных культурах.

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

Таким образом, присутствие IL-8 в культуральной среде приводило к перераспределению субпопуляционного состава Т-лимфоцитов в сторону увеличения количества эффекторных и терминально-дифференцированных Т-клеток за счет снижения наивных и Т-лимфоцитов центральной памяти.

### 3.3.3. Прямое влияние IL-8 на активацию Т-лимфоцитов

Стратегия гейтирования определения количества CD25<sup>+</sup> Т-клеток представлена на **рисунке 43**.



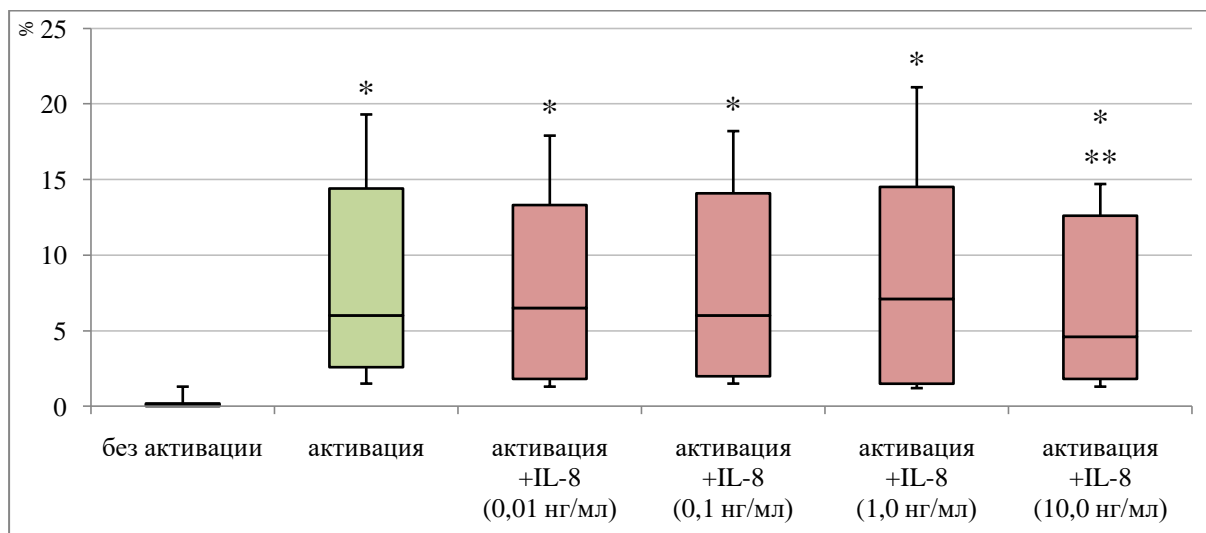
**Рисунок 43** Алгоритм цитометрического анализа Т-лимфоцитов при определении  $CD25^+$  клеток

- а) распределение клеток по прямому (FSC) и боковому (SSC) светорассеянию;
- б) идентификация  $CD4$ -позитивных и  $CD4$ -негативных клеток. Зона позитива и зона негатива, соответственно.
- с) содержание  $CD25^+$  лимфоцитов среди  $CD4$ -позитивных клеток;
- д) содержание  $CD25^+$  лимфоцитов среди  $CD4$ -негативных клеток
- е) идентификация наивных Т-клеток, Т-лимфоцитов центральной памяти, Т-клеток эффекторной памяти и терминально-дифференцированных Т-эффекторов среди  $CD4$ -негативных клеток по экспрессии молекул  $CD197$  и  $CD45RA$ ;
- ф) идентификация наивных Т-клеток, Т-лимфоцитов центральной памяти, Т-клеток эффекторной памяти и терминально-дифференцированных Т-эффекторов клеток среди  $CD4$ -позитивных клеток;

g) содержание  $CD25^+$  лимфоцитов среди наивных Т-клеток, Т-лимфоцитов центральной памяти, Т-клеток эффекторной памяти и терминально-дифференцированных Т-эффекторов в CD4-позитивных клетках и CD4-негативных Т-субпопуляциях.

Молекула CD25  $\alpha$ -субъединица IL-2, является общепринятым маркером лимфоидной активации, приводящей к IL-2-зависимой пролиферации лимфоцитов (Литвинова Л.С., и др., 2014; Lin J., Weiss A., 2001; Monti P. et al., 2009). CD38 – циклическая ADP рибозогидролаза, в большом количестве экспрессируется на зрелых Т-лимфоцитах, после стимуляции митогеном (Deterre P. et al., 2000).

Согласно полученным нами результатам, IL-8 не оказывал существенного влияния на экспрессию CD25 на неактивированных Т-клетках (данные не представлены). Как показано **рисунке 44**, Т-клеточная активация приводила к достоверному увеличению относительного количества CD4-позитивных Т-лимфоцитов, несущих молекулу CD25 с 0,1 (0-0,2) % до 6,0 (2,6-14,4) %. При этом IL-8 в концентрации 10,0 нг/мл снижал содержание  $CD25^+$  клеток, среди CD4-позитивных Т-лимфоцитов.



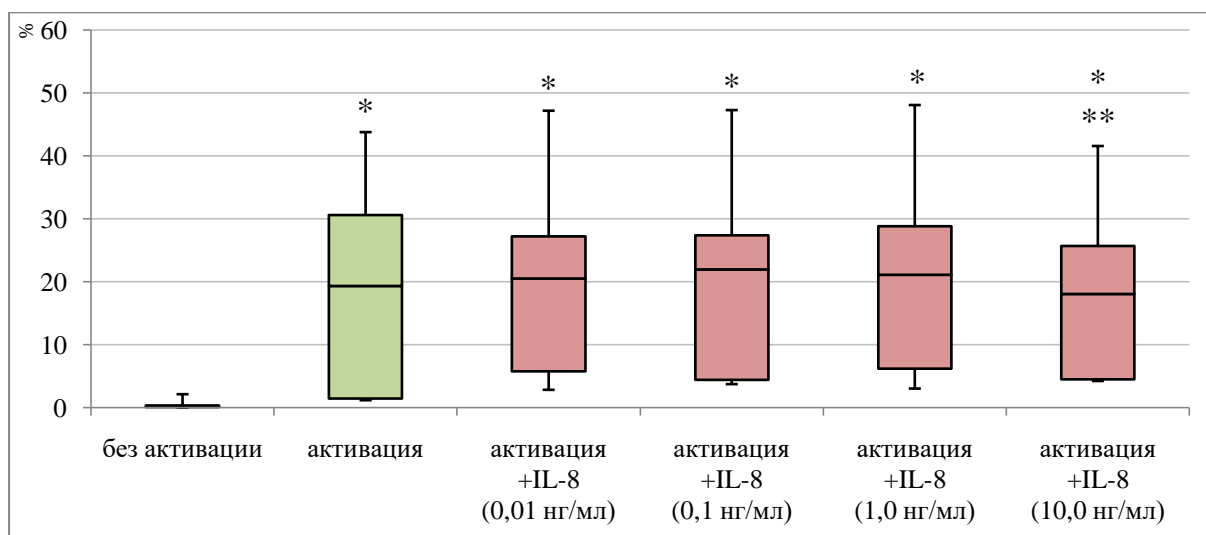
**Рисунок 44.** Содержание (%)  $CD25^+$  клеток среди CD4-позитивных Т-лимфоцитов.

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

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

Как показано на **рисунке 45**, Т-клеточная активация приводила к статистически значимому увеличению относительного числа CD4-негативных Т-лимфоцитов, экспрессирующих CD25 с 0,2 (0,1-0,4) % до 19,3 (1,5-30,6) %. Как можно увидеть, IL-8, добавленный в максимальной концентрации (10,0 нг/мл)

снижал относительное количество  $CD25^+$   $CD4$ -негативных Т-лимфоцитов в активационных пробах. При других концентрациях IL-8 эффекты были статистически не значимы.

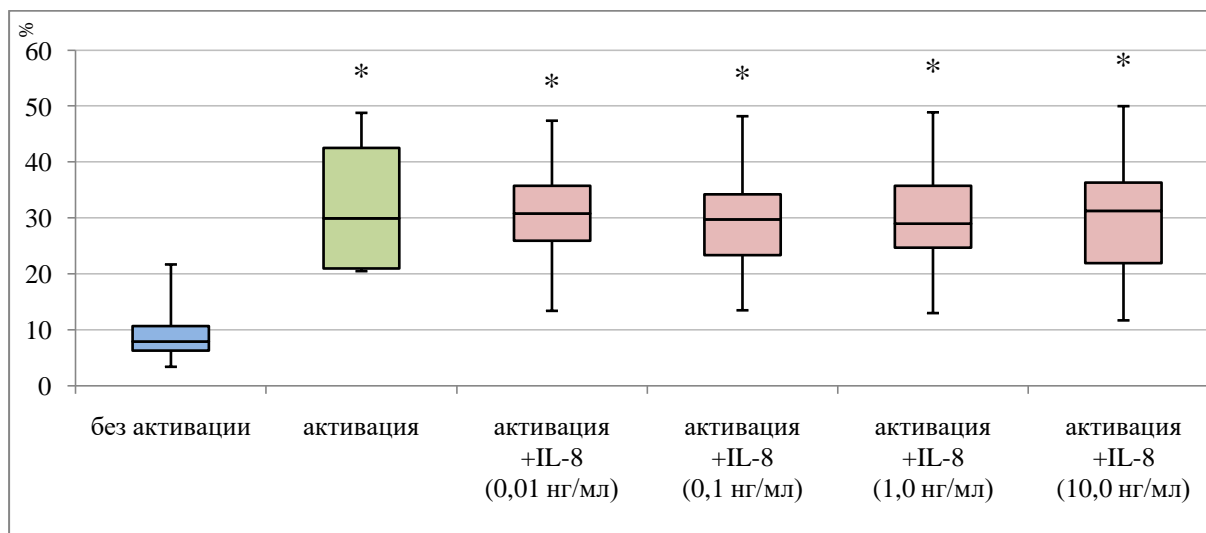


**Рисунок 45.** Содержание (%)  $CD25^+$  клеток среди  $CD4$ -негативных Т-лимфоцитов.

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

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

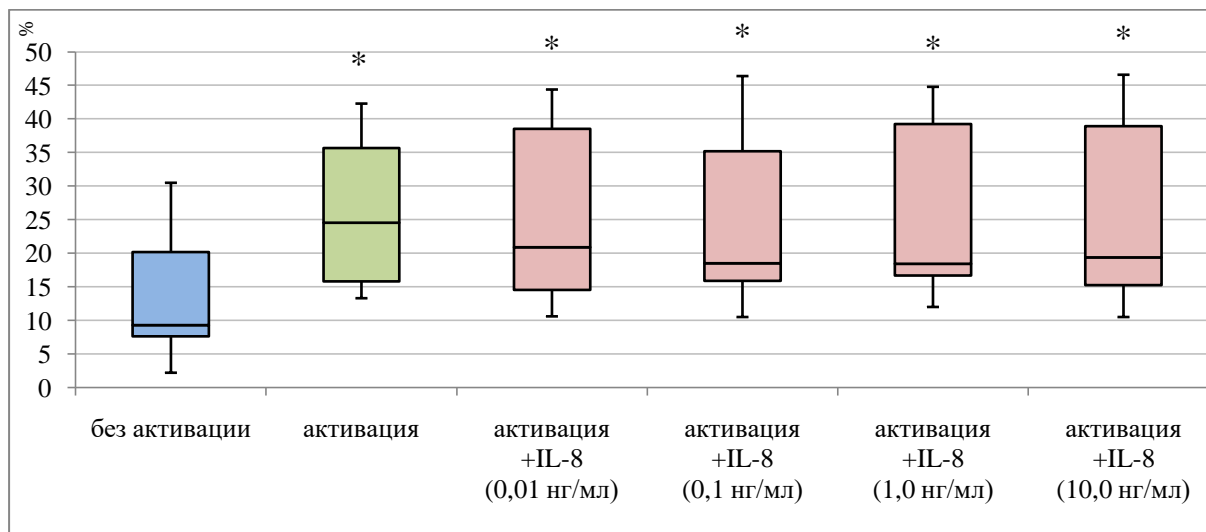
Относительное количество  $CD38^+$  активированных  $CD4$ -позитивных Т-лимфоцитов достоверно возрастало в результате Т-клеточной активации с 7,9 (6,3-10,7) % до 29,9 (21,0-42,5) %. Как показано на **рисунке 46**, IL-8 не оказывал существенного влияния на содержание  $CD38^+$  клеток среди исследуемых Т-лимфоцитов.



**Рисунок 46.** Содержание (%)  $CD38^+$  клеток среди  $CD4$ -позитивных Т-лимфоцитов.

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

**Рисунок 47** демонстрирует, что Т-клеточная активация приводила к достоверному увеличению относительного числа  $CD38^+$  среди  $CD4$ -негативных Т-лимфоцитов с 9,3 (7,6-20,2) % до 24,5 (15,8-35,7) %. При этом IL-8 не оказывал существенного влияния на этот процесс.



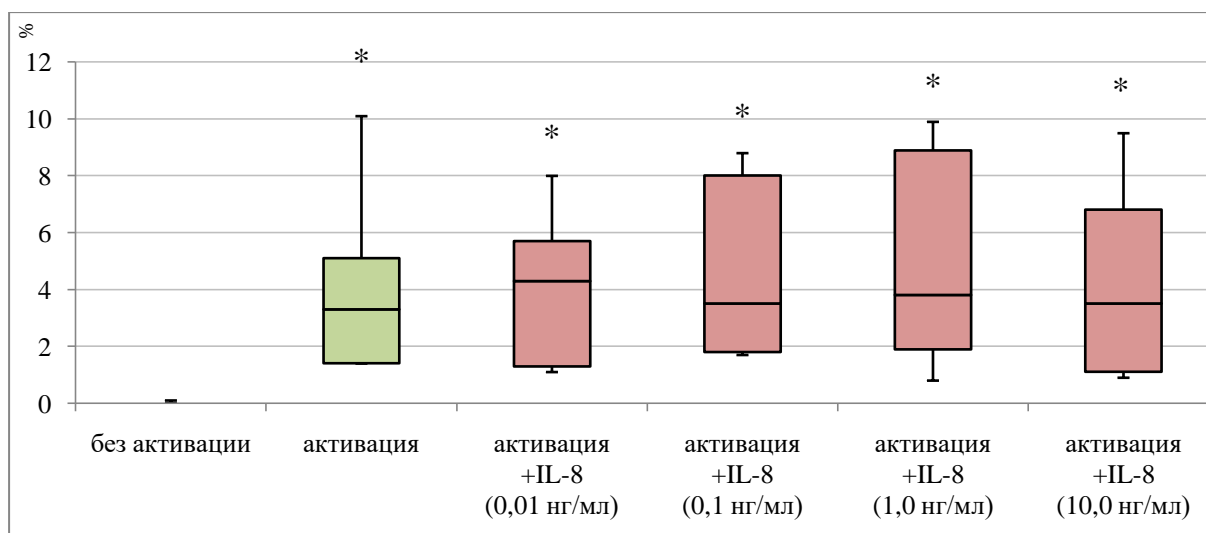
**Рисунок 47.** Содержание (%)  $CD38^+$  клеток среди  $CD4$ -негативных Т-лимфоцитов.

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

При анализе суммарной популяции Т-лимфоцитов, выявили, что при максимальной концентрации IL-8 способен снижать количество только  $CD25^+$  Т-клеток.

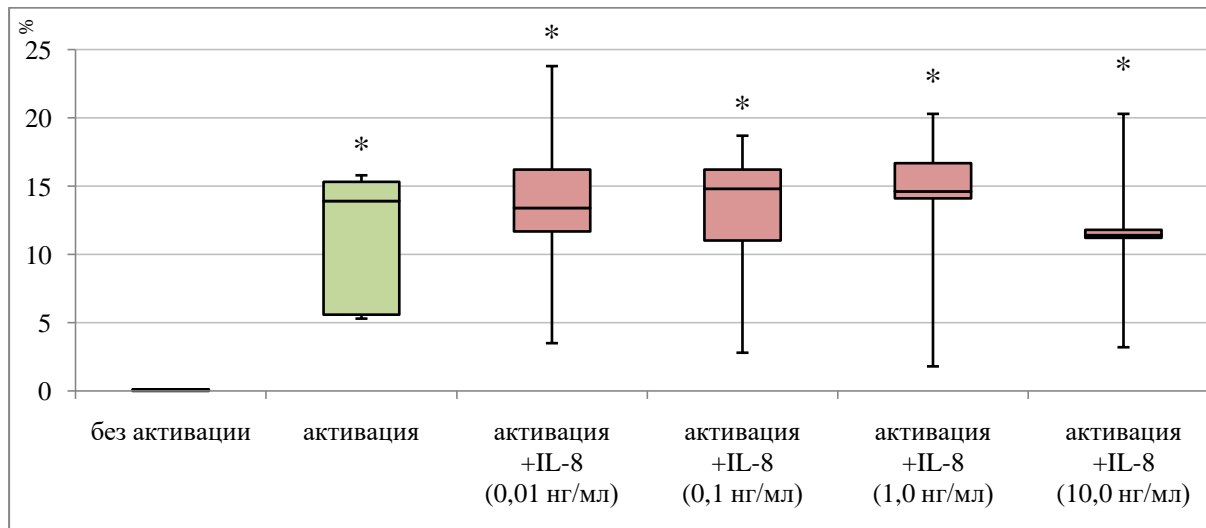
**Рисунок 48** демонстрирует, что, как и ожидалось Т-клеточная активация усиливала экспрессию  $CD25^+$  клеток среди  $CD4$ -позитивных наивных Т-лимфоцитов. При этом IL-8 не оказывал существенного влияния на активационный статус Т-клеток, регистрируемый по экспрессии молекулы  $CD25$ .





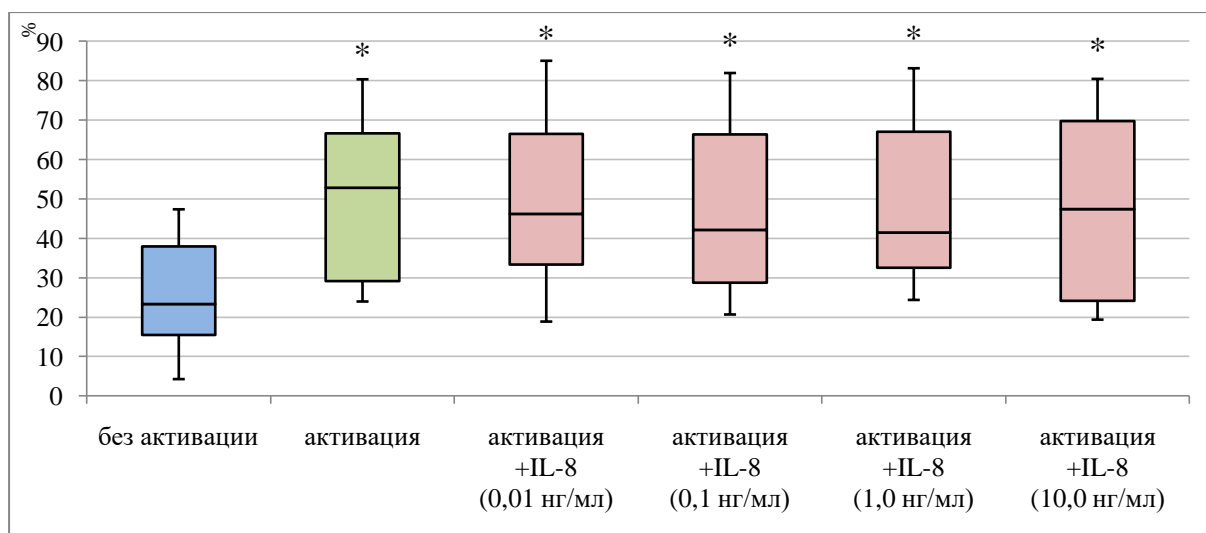
**Рисунок 48.** Содержание (%)  $CD25^+$  клеток среди  $CD4$ -позитивных наивных Т-лимфоцитов.  
\*  $p < 0,05$  – в сравнении с пробой без Т-клеточной активации.

В пробах без Т-клеточной активации число  $CD25^+$   $CD4$ -негативных наивных Т-лимфоцитов было близким к 0. Т-клеточная активация сопровождалась значимым увеличением числа  $CD25^+/CD4^-$  наивных Т-клеток. Как показано на **рисунке 49**, присутствие IL-8 в пробах существенным образом не меняла картину.



**Рисунок 49.** Содержание (%)  $CD25^+$  клеток среди  $CD4$ -негативных наивных Т-лимфоцитов.  
\*  $p < 0,05$  – в сравнении с пробой без Т-клеточной активации.

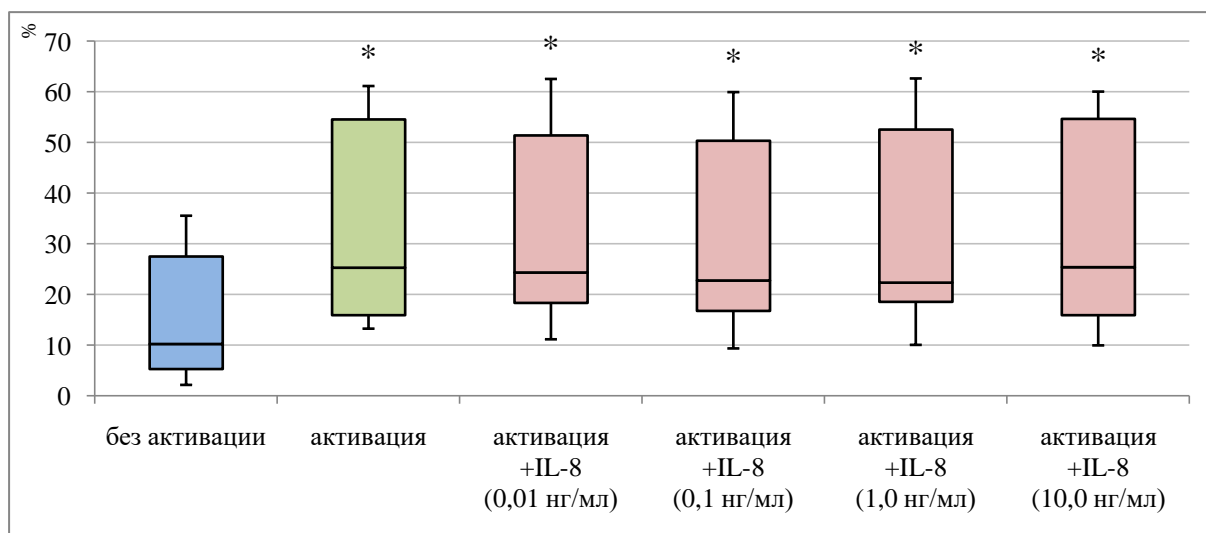
Активация Т-лимфоцитов также приводила к относительному росту  $CD38^+$  клеток среди  $CD4$ -позитивных наивных Т-клеток. Как показано на **рисунке 50**, IL-8 был не способен значимо влиять на этот процесс.



**Рисунок 50.** Относительное количество (%)  $CD38^+$  клеток среди  $CD4$ -позитивных наивных Т-лимфоцитов

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

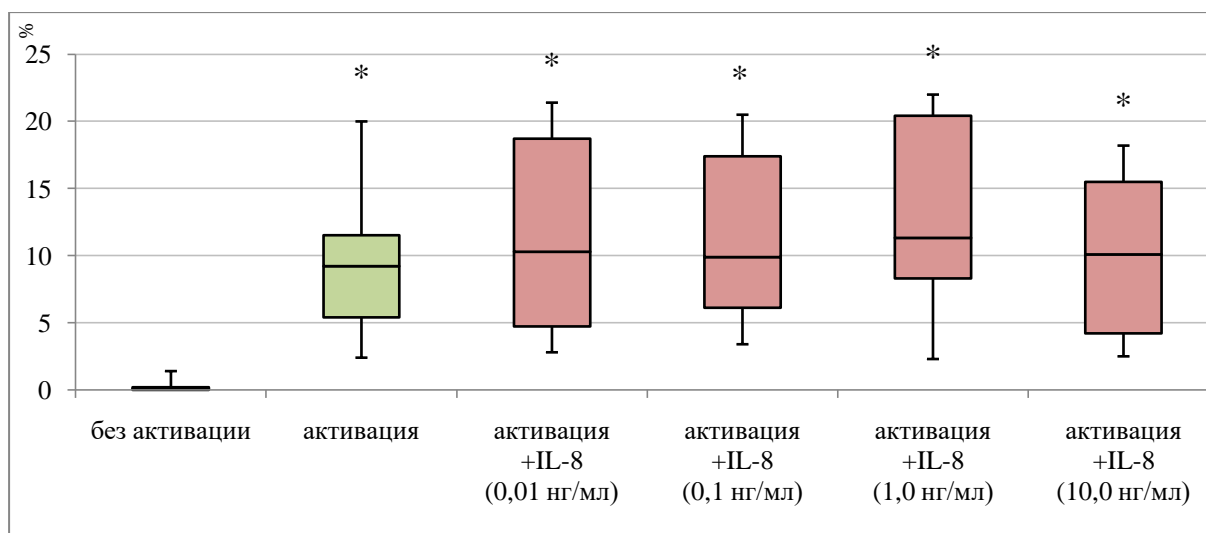
Т-клеточная активация сопровождалась увеличением относительного количества  $CD38^+$  клеток среди наивных  $CD4$ -негативных Т-лимфоцитов с 10,2 (5,3-27,5) % до 25,3 (15,9-54,6) %. При этом добавление IL-8 в активационные пробы существенно не влияло на этот процесс (**рисунок 51**).



**Рисунок 51.** Содержание (%)  $CD38^+$  клеток среди  $CD4$ -негативных наивных Т-лимфоцитов.

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

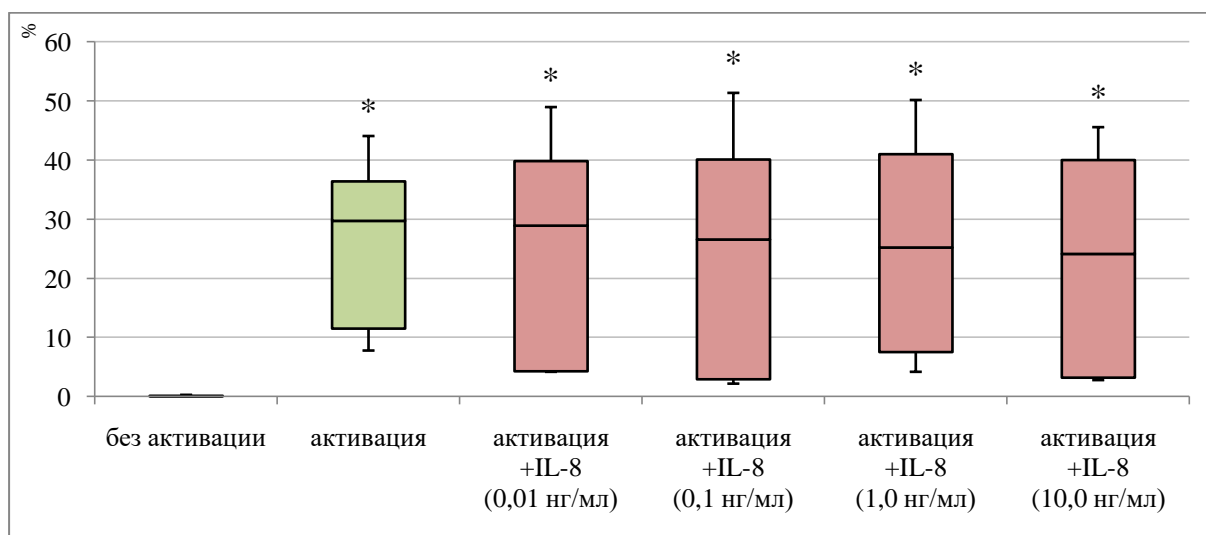
Как показано на **рисунке 52**, Т-клеточная активация приводила к значимому росту относительного количества  $CD25^+$  клеток среди  $CD4$ -позитивных Т-лимфоцитов центральной памяти с 0,1 (0-0,2) % до 9,2 (5,4-11,5) %. IL-8 не оказывал значимого влияния на этот процесс.



**Рисунок 52.** Содержание (%)  $CD25^+$  клеток среди  $CD4$ -позитивных Т-лимфоцитов центральной памяти.

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

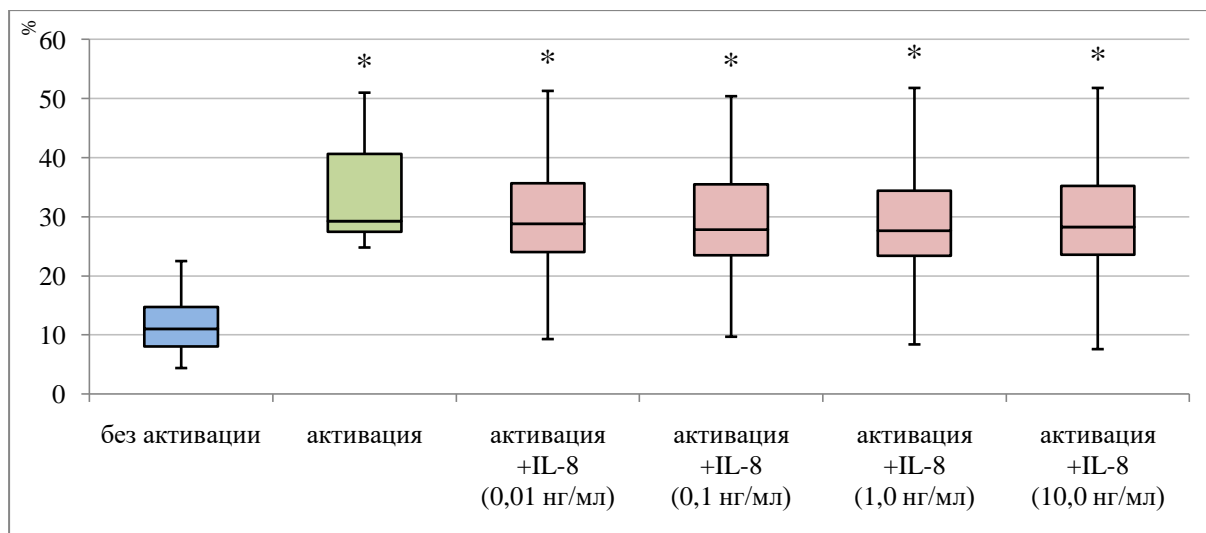
Количество  $CD25^+$  Т-клеток среди  $CD4$ -негативных Т-лимфоцитов центральной памяти в интактных образцах было на уровне нулевых значений. Внесение в пробы активатора, сопровождалось статистически достоверным увеличением числа  $CD25^+$   $CD4$ -негативных Т-лимфоцитов центральной памяти до 29,7 (11,5-36,4) %. Действие IL-8 на активируемые Т-лимфоциты сопровождалось снижением числа  $CD25^+$   $CD4$ -негативных Т-лимфоцитов центральной памяти, однако, такое снижение было статистически недостоверным **рисунок 53**.



**Рисунок 53.** Содержание (%)  $CD25^+$  клеток среди популяции  $CD4$ -негативных Т-лимфоцитов центральной памяти

\*  $p < 0,05$  – в сравнении с пробой без активатора.

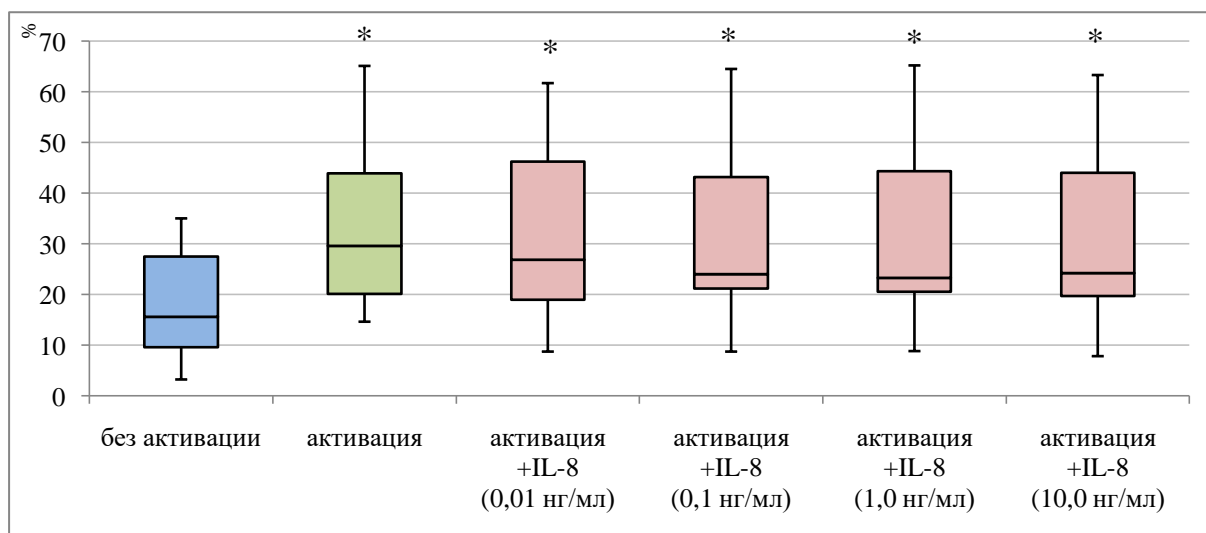
**Рисунок 54** демонстрирует, что Т-клеточная активация приводила к значимому приросту относительного количества CD38-позитивных клеток среди CD4-позитивных Т-лимфоцитов центральной памяти. При этом IL-8 во всех исследованных концентрациях существенно не изменял пропорцию CD38<sup>+</sup> клеток в этой Т-клеточной субпопуляции.



**Рисунок 54.** Содержание (%) CD38<sup>+</sup> клеток среди CD4-позитивных Т-лимфоцитов центральной памяти.

\*  $p < 0,05$  – в сравнении с пробой без активатора.

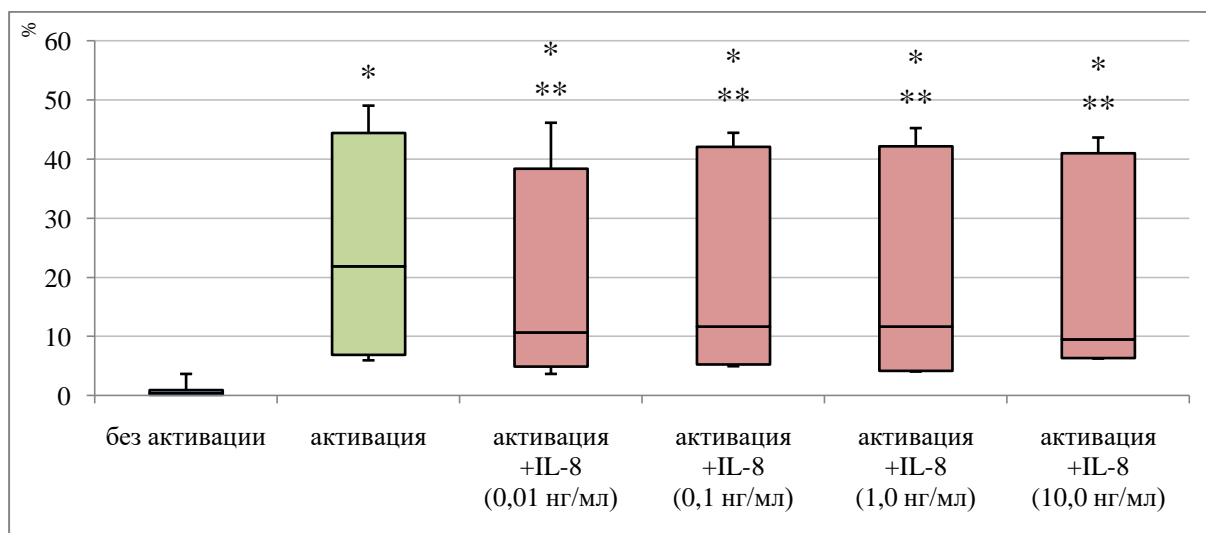
Количество активированных CD38<sup>+</sup>/CD4<sup>-</sup> Т-лимфоцитов центральной памяти значимо превышало число интактных клеток и составляло 29,6 (20,1-43,9) %. IL-8 не оказывал значимого влияния на активируемые Т-лимфоциты (**рисунок 55**).



**Рисунок 55.** Содержание (%) CD38<sup>+</sup> клеток среди популяции CD4-негативных Т-лимфоцитов центральной памяти.

\*  $p < 0,05$  – в сравнении с пробой без активатора.

Активация Т-лимфоцитов приводила к значительному увеличению количества  $CD25^+/CD4^+$  Т-лимфоцитов эффекторной памяти (**рисунок 43**). Интересно, что IL-8 достоверно снижал относительное число  $CD25^+$  среди CD4-позитивных Т-лимфоцитов эффекторной памяти в пробах с Т-клеточной активацией (**рисунок 56**).

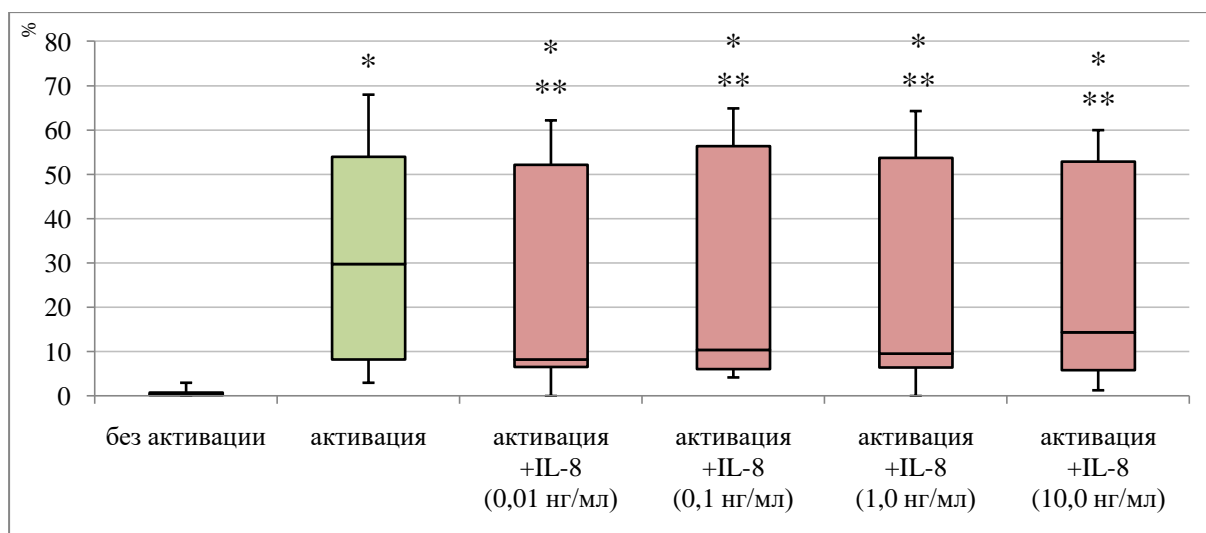


**Рисунок 56.** Содержание (%)  $CD25^+$  клеток среди CD4-позитивных Т-лимфоцитов эффекторной памяти.

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

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

Было показано, что культивирование Т-клеток с активатором сопровождалось достоверным увеличением числа  $CD25^+$  эффекторных CD4-негативных Т-лимфоцитов с 0,45 (0,2-0,7)% до 29,8 (8,2-53,9)%. На фоне Т-клеточной активации, IL-8 во всех концентрациях обладал угнетающим действием на активационный процесс, снижая число  $CD25^+$  CD4-негативных эффекторных Т-клеток (**рисунок 57**).

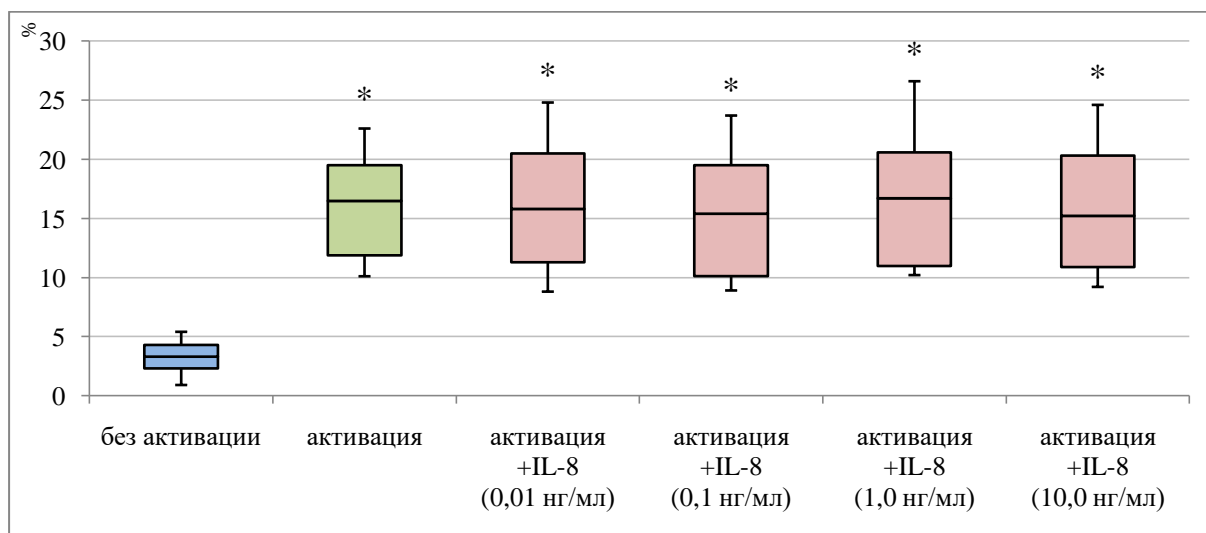


**Рисунок 57.** Содержание (%)  $CD25^{+}$  клеток среди популяции  $CD4$ -негативных Т-лимфоцитов эффекторной памяти

\*  $p < 0,05$  – в сравнении с пробой без активатора;

\*\*  $p < 0,05$  – в сравнении с пробой с активатором.

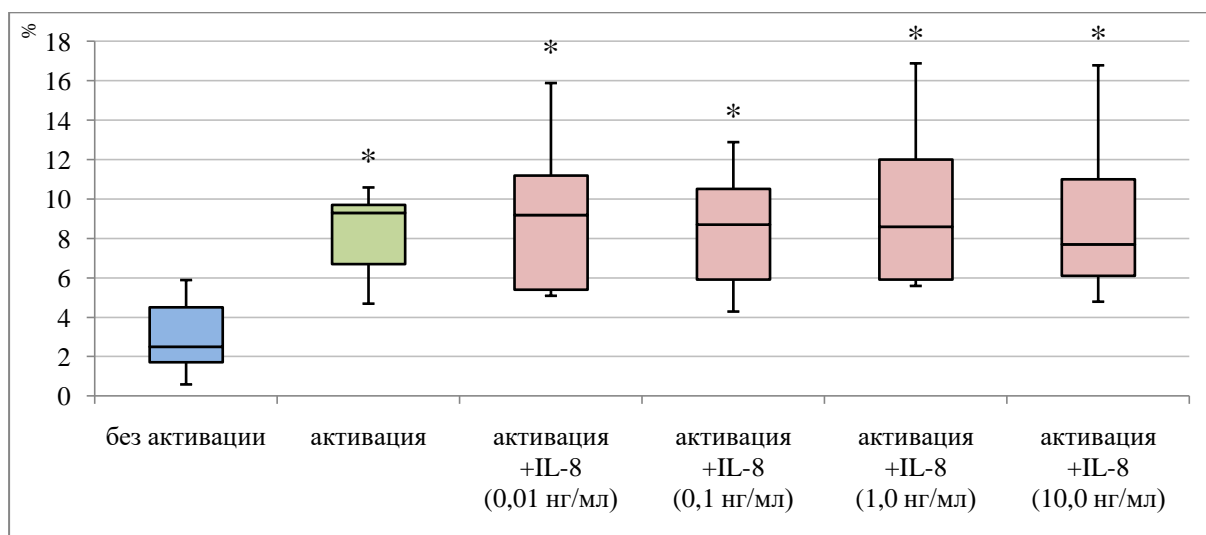
Содержание  $CD38^{+}$  клеток среди  $CD4$ -позитивных Т-лимфоцитов эффекторной памяти в пробах без Т-клеточной активации было равным 3,3 (2,3-4,3) %. Т-клеточная активация приводила к увеличению относительного числа  $CD38^{+}$  среди  $CD4$ -позитивных Т-лимфоцитов эффекторной памяти до 16,5 (11,9-19,5) %. Как показано на **рисунке 58**, IL-8 не оказывал значимого влияния на этот процесс.



**Рисунок 58.** Содержание (%)  $CD38^{+}$  клеток среди  $CD4$ -позитивных Т-лимфоцитов эффекторной памяти.

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

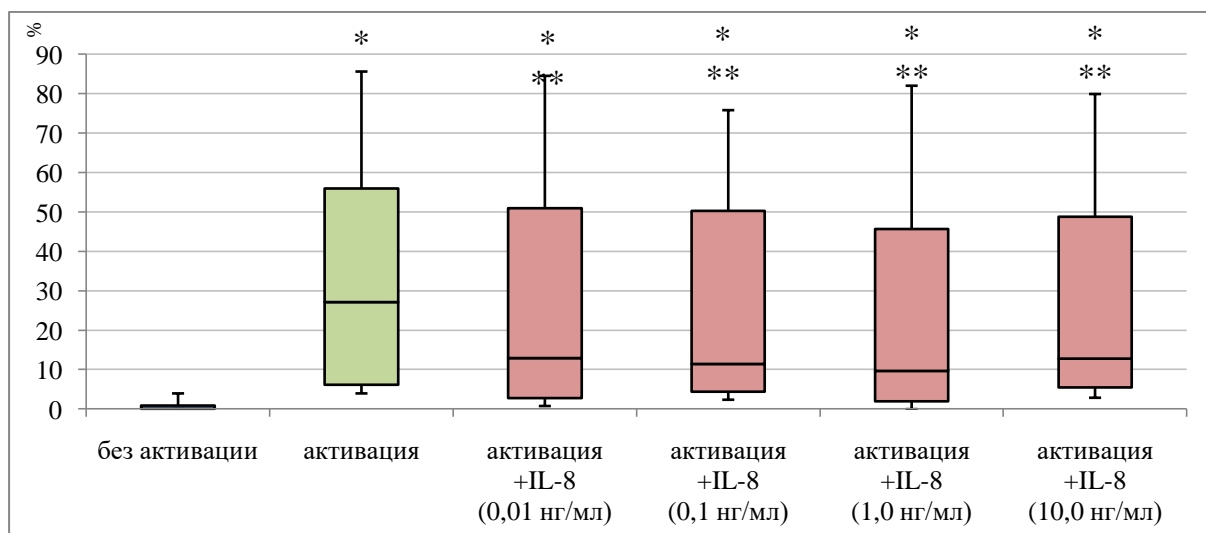
Т-клеточная активация приводила к относительному увеличению количества  $CD38^+/CD4^-$  Т-лимфоцитов эффекторной памяти. IL-8 не оказывал существенного влияния на этот процесс (**рисунок 59**).



**Рисунок 59.** Содержание (%)  $CD38^+$  клеток среди  $CD4^-$  Т-лимфоцитов эффекторной памяти

\*  $p < 0,05$  – в сравнении с пробой без активатора.

Относительное число  $CD25^+$  клеток среди  $CD4^+$ -позитивных терминально-дифференцированных эффекторных Т-лимфоцитов в пробах без активации стремилось к 0. Т-клеточная активация приводила к увеличению относительного числа  $CD25^+$  клеток среди этих лимфоцитов до 27,1 (6,1-55,9) %. Как показано на **рисунке 60**, действие IL-8 во всех концентрациях на  $CD4^+$  терминально-дифференцированные эффекторные Т-лимфоциты носило однонаправленный характер и сопровождалось уменьшением относительного числа  $CD25^+$  клеток в пробах с Т-клеточной активацией.

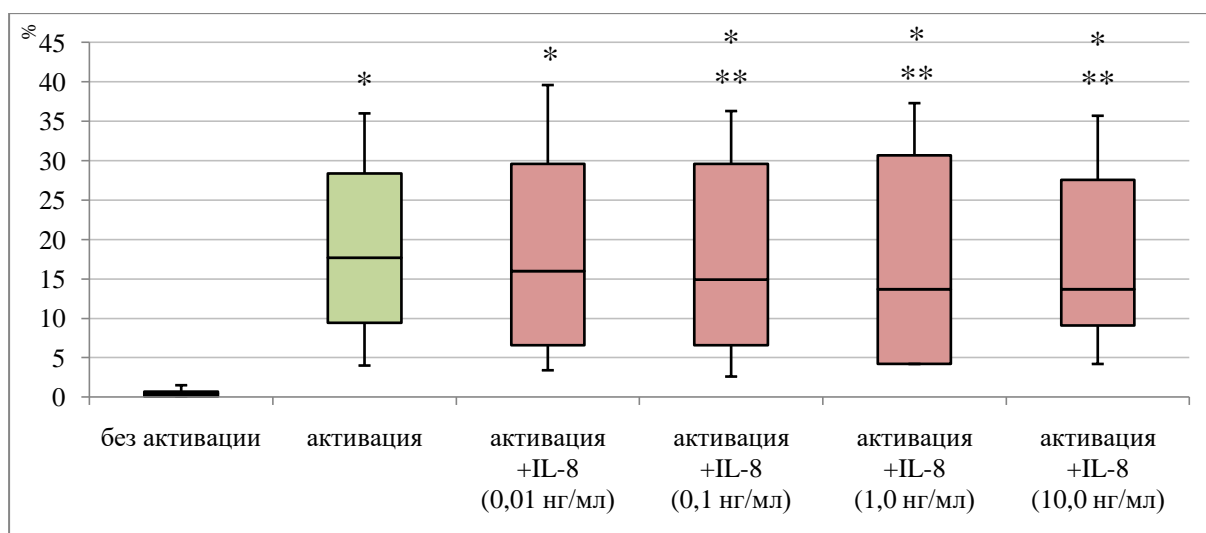


**Рисунок 60.** Содержание (%)  $CD25^+$  клеток среди  $CD4$ -позитивных терминально дифференцированных Т-лимфоцитов.

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

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

При добавлении к Т-клеткам активирующих частиц, количество  $CD25^+$  клеток с фенотипом  $CD4$ -негативных терминально-дифференцированных Т-эффекторов значительно возрастало. IL-8 (в концентрациях 0,1; 1,0; 10,0 нг/мл) достоверно снижал относительное число  $CD25^+/CD4^-$  терминально-дифференцированных Т-эффекторов в активационных пробах (**рисунок 61**).



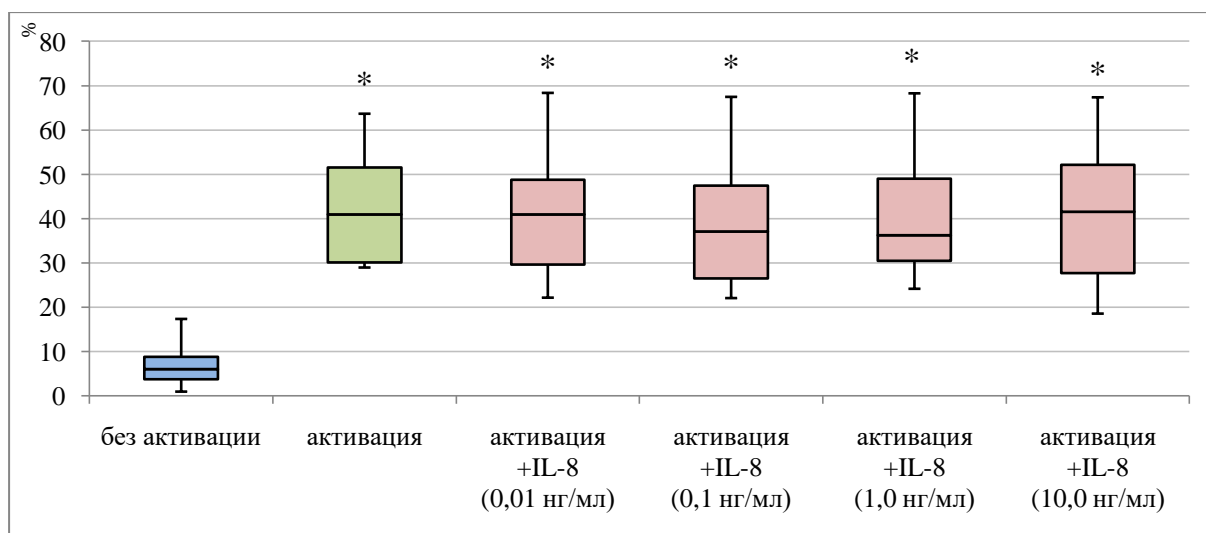
**Рисунок 61.** Содержание (%)  $CD25^+$  клеток среди популяции  $CD4$ -негативных терминально дифференцированных Т-лимфоцитов.

\*  $p < 0,05$  – в сравнении с пробой без активатора;

\*\*  $p < 0,05$  – в сравнении с пробой с активатором.

Количество  $CD38^+/CD4^+$  терминально-дифференцированных Т-эффекторов в пробе без активации составляло 6,1 (3,8-8,8)%. Т-клеточная активация приводила к достоверному увеличению относительного числа этих клеток до 40,9 (30,1-51,5) %. Как показано на **рисунке 62**, IL-8 существенно не влиял на этот процесс.

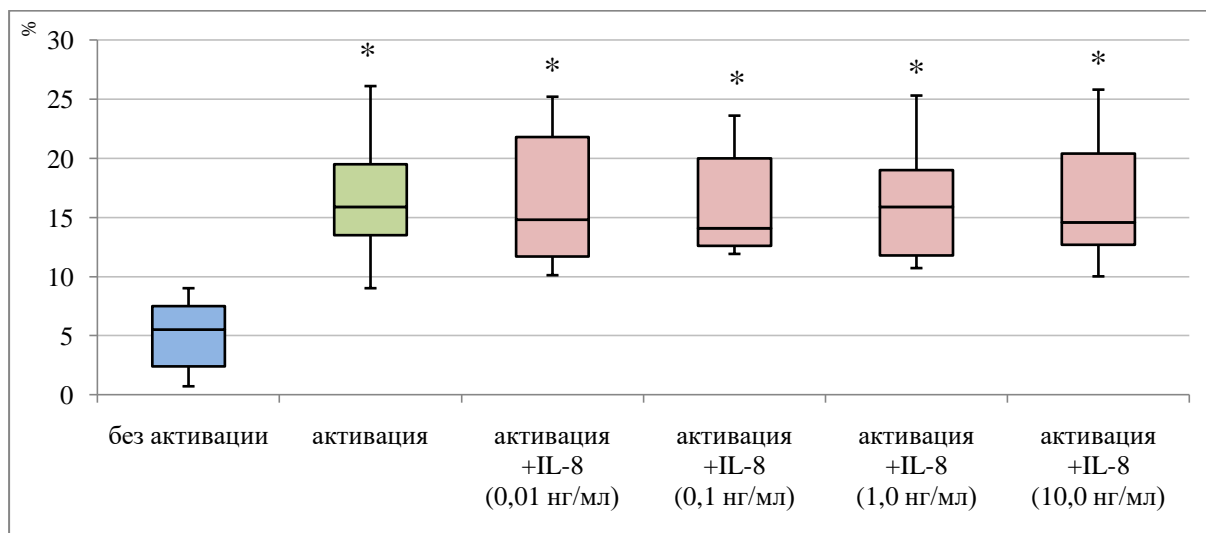




**Рисунок 62.** Содержание (%)  $CD38^+$  клеток среди  $CD4$ -позитивных терминально дифференцированных Т-лимфоцитов.

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

Относительное число  $CD38^+$  клеток среди  $CD4$ -негативных терминально-дифференцированных Т-эффекторов в пробах без активатора составило 5,5 (2,4-7,5) %. В пробах с активатором, наблюдалось достоверное увеличение количества  $CD38^+$  клеток. IL-8 не оказывал значимого влияния на активацию этой Т-клеточной субпопуляции (**рисунок 63**).



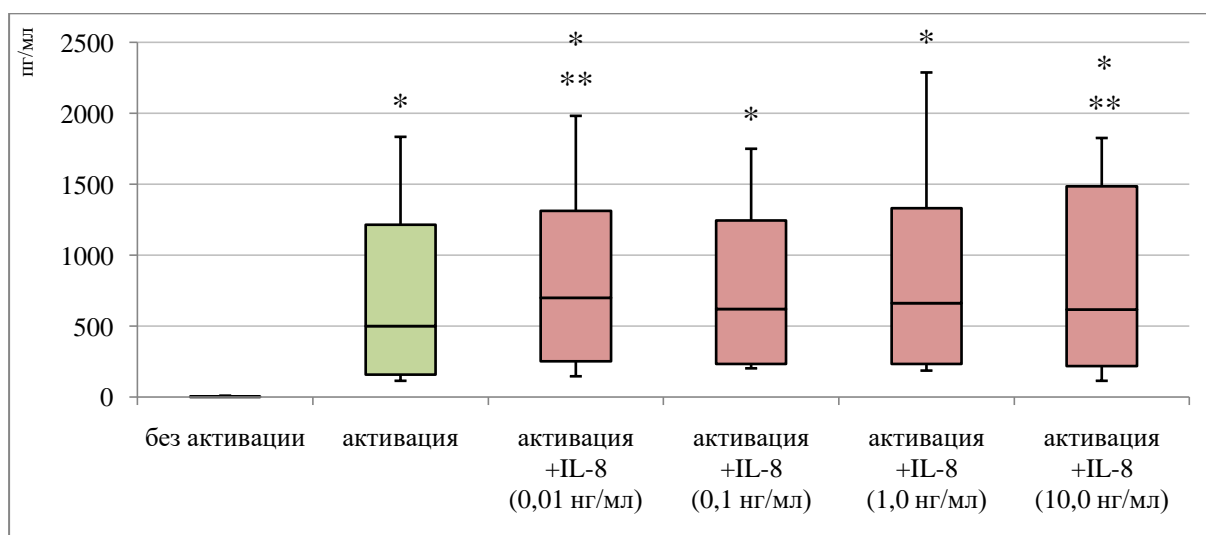
**Рисунок 63.** Содержание (%)  $CD38^+$  клеток среди популяции  $CD4$ -негативных терминально дифференцированных Т-лимфоцитов

\*  $p < 0,05$  – в сравнении с пробой без активатора.

Таким образом IL-8 способен оказывать негативный эффект на активацию эффекторных и терминально-дифференцированных Т-лимфоцитов.

### 3.3.4. Влияние IL-8 на Т-клеточную продукцию цитокинов

IL-2 является основным ростовым медиатором для Т-лимфоцитов (Oppenheim J.J., 2007). Он играет важную роль в процессе дифференцировки Т-клеток в эффекторные клетки и клетки памяти. Культивирование Т-клеток с активатором приводило к значимому увеличению продукции IL-2. Как показано на **рисунке 64**, IL-8 при концентрациях 0,01 и 10,0 нг/мл оказывал стимулирующее действие на продукцию IL-2 активированными Т-клетками.

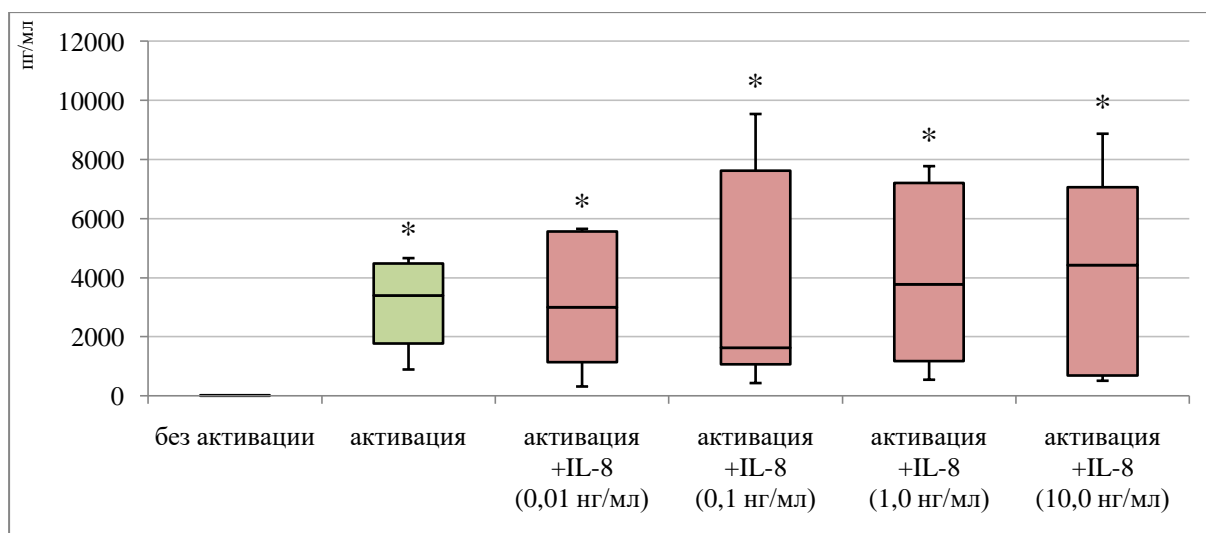


**Рисунок 64.** Содержание IL-2 (пг/мл) в Т-клеточных супернатантах.

\*  $p < 0,05$  – в сравнении с пробой без активатора;

\*\*  $p < 0,05$  – в сравнении с пробой с активатором.

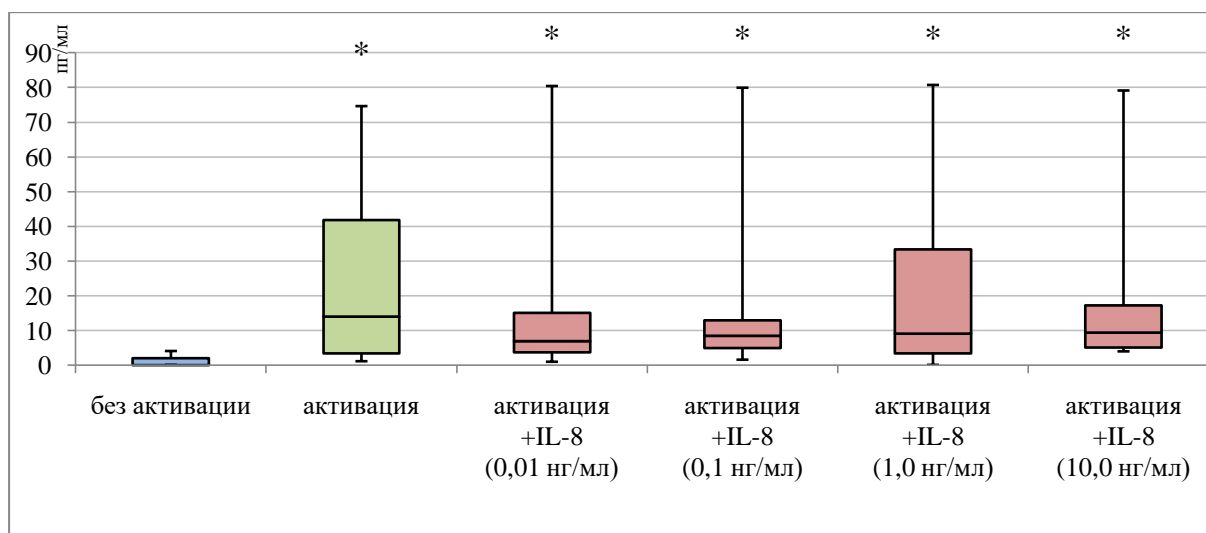
IFN- $\gamma$  участвует в противовирусном иммунитете, он является активатором Мф и индуктором экспрессии продуктов главного комплекса гистосовместимости II класса. IFN- $\gamma$  продуцируется CD4 Th1 Т-клетками, а также NK и натуральными естественными Т клетками (NKT) (Schroder K. et al., 2004). Как показано на **рисунке 65**, активация Т-лимфоцитов стимулировала продукцию IFN- $\gamma$ . При этом IL-8 не оказывал существенного влияния на продукцию IFN- $\gamma$  Т-клетками.



**Рисунок 65.** Содержание IFN- $\gamma$  (пг/мл) в Т-клеточных супернатантах.

\*  $p < 0,05$  – в сравнении с пробой без активатора.

IL-4 является противовоспалительным цитокином, продуцируется Th2 Т-клетками. Он подавляет провоспалительную активность Th1 клеток и Мф (Zhu J., 2015). Активация Т-клеток приводила к достоверному увеличению продукции IL-4 Т-клетками. IL-8 формировал тенденцию к снижению продукцию IL-4, которая, однако, во всех исследуемых концентрациях IL-8 была статистически недостоверной (рисунок 66).

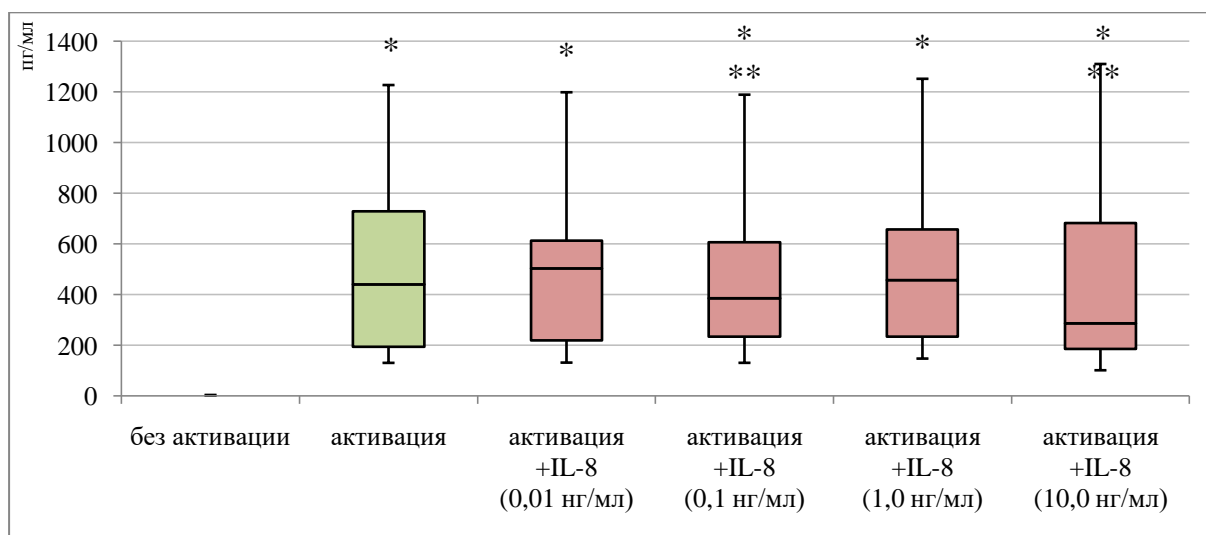


**Рисунок 66.** Содержание IL-4 (пг/мл) в Т-клеточных супернатантах.

\*  $p < 0,05$  – в сравнении с пробой без активатора.

IL-10-цитокин, имеющий плеiotропные эффекты в иммунорегуляции и воспалении (Rentzos M. et al., 2009). Он снижает функциональную активность Th1

клеток. Т-клеточная активация индуцировала прирост продукции IL-10. IL-8 статистически достоверно снижал продукцию IL-10 в двух концентрациях – 0,1 и 10,0 нг/мл (**рисунок 67**).



**Рисунок 67.** Содержание IL-10 (пг/мл) в Т-клеточных супернатантах.

\*  $p < 0,05$  – в сравнении с пробой без активатора;

\*\*  $p < 0,05$  – в сравнении с пробой с активатором.

Таким образом, IL-8 способен позитивно влиять на Т-клеточную продукцию IL-2 и негативно влиять на секрецию IL-10.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Установлено, что ДК играют основополагающую роль в инициации первичных иммунных реакций. Однако, в стимуляции вторичных иммунных реакций пальма первенства, по-видимому, принадлежит Мц/Мф. Во-первых, они активно мигрируют в место проникновения патогена и сами активно вовлекаются в иммуногенную презентацию антигена. Во-вторых, являясь предшественниками ДК - они дифференцируются и пополняют пул ДК, вовлекаемых в адаптивный иммуногенез. Согласно современным представлениям Мц/Мф можно разделить на 3 субпопуляции: классические ( $CD14^+CD16^-$ ), неклассические ( $CD14^{++}CD16^+$ ) и переходные ( $CD14^+CD16^{++}$ ). В некоторых случаях, субпопуляции неклассических и переходных объединяют в одну ( $CD14^+CD16^+$ ) (Ziegler-Heitbrock L. et al., 2010).  $CD16$  ( $Fc\gamma RIII$ ) обеспечивает вовлечение иммунокомпетентных клеток в процесс антителозависимой цитотоксичности. В сравнении с ДК, Мф являются менее дифференцированными клетками, и должны быть подвержены влиянию цитокинового/хемокинового микроокружения в большей степени. При культивировании *in vitro* в разных условиях, Мф могут дифференцироваться в классически активированные M1 и альтернативно активированные M2 Мф, а также ДК (Ziegler-Heitbrock L. et al., 2010; Rey-Giraud F. et al., 2012). M1 Мф генерируются под воздействием цитокинов, продуцируемых Т-хелперами 1 типа и микробных продуктов. Эти Мф продуцируют активные формы азота (NO) и TNF- $\alpha$ . Они способны разрушать внутриклеточные патогены и обладают противоопухолевой цитодеструктивной активностью (Seledtsov V.I., Seledtsova G.V., 2012). M2 Мф генерируются под воздействием цитокинов, продуцируемых Т-хелперами 2 типа, и глюкокортикоидами (Muraille E. et al., 2014). Они вырабатывают IL-10, TGF- $\beta$  и аргиназу (arginase-1, Arg1). Эти клетки эффективны в борьбе с внеклеточными патогенами. Важная особенность альтернативно активированных Мф - их способность стимулировать неоангиогенез и поддерживать регенеративные процессы (Seledtsov V.I., Seledtsova G.V., 2012).

Данные, характеризующие влияние IL-8 на поверхностные и функциональные свойства Мц/Мф, суммированы в **таблице 2**.

**Таблица 2.** Обобщенные данные влияния IL-8 на Мц/Мф

Субпопуляции Мц/Мф	Мц/Мф+IL-8				Цитокины			
	CD16 <sup>+</sup>	CD119 <sup>+</sup>	CD124 <sup>+</sup>	CD197 <sup>+</sup>	TNF- $\alpha$	IL-1 $\beta$	IL-6	IL-10
CD14 <sup>+</sup> Мц/Мф	–	+	–	+	0	+	+	0
CD14 <sup>–</sup> Мц/Мф	–	0	–	0				

Примечание: «–» - снижение показателей;  
«+» - увеличение показателей;  
«0» - без изменений.

На основе полученных данных, можно предполагать, что провоспалительный эффект IL-8, по-видимому, не связан с усилением экспрессии на Мц/Мф низкоаффинных рецепторов к Fc фрагменту IgG. Вместе с тем, IL-8, добавленный в культуру в максимальной концентрации (10,0 нг/мл) заметно увеличивал содержание среди ЛПС-активированных Мф количество клеток, экспрессирующих рецептор к IFN- $\gamma$ , и снижал содержание клеток, экспрессирующих рецептор к IL-4. Эти данные указывают на способность IL-8 поддерживать классическую активацию Мц/Мф. Поскольку Мц/Мф являются основными продуцентами IL-8 в иммунной системе, предполагается, что высокие концентрации этого цитокина могут достигаться в ближайшем микроокружении этих клеток и, что IL-8 играет значимую роль в аутокринном поддержании провоспалительной активности Мц/Мф.

Ранее было показано, что классическая активация Мц/Мф характеризуется повышенной экспрессией CCR7 (Zhang Z. et al., 2011). Показано, что IL-8 способен увеличивать среди Мц/Мф содержание CCR7<sup>+</sup> клеток. Таким образом, IL-8 может содействовать миграции вовлеченных в иммуногенез Мц/Мф в лимфоидные органы и, тем самым, способствовать генерализации и интенсификации адаптивных иммунных процессов.

В своей модели выявили лишь статистически незначимую тенденцию IL-8 повышать секрецию TNF- $\alpha$  Мц/Мф. Более значимый прирост был, однако, отмечен со стороны секреции IL-1 $\beta$  и IL-6, цитокинов, которые наряду с IL-8

вовлечены в аутокринную регуляцию функциональной активности Мц/Мф. IL-1 $\beta$  является одним из основных медиаторов воспаления, участвует в пролиферации, активации и апоптоза лимфоцитов (Duque G.A., Descoteaux A., 2014). IL-6 представляет собой цитокин, который участвует как в воспалительных, инфекционных ответах, так и в регуляции метаболических и регенеративных процессов (Scheller J. et al. 2011). Следует учесть, что в наших экспериментах эндогенная продукция IL-8 ЛПС активированными Мц/Мф могла несколько смазывать эффекты экзогенного IL-8 как на экспрессию мембранных молекул, так и на продукцию цитокинов.

Таким образом, миграционная и функциональная активность активированных Мц/Мф может находиться под непрерывным регуляторным влиянием IL-8. Не только сами Мц/Мф, но и взаимодействующие с ними Т-клетки могут быть продуцентами IL-8 (Gesser B. et al., 1995). Стимуляция продукции IL-8 иммунокомпетентными клетками обычно ассоциируется с повышением активности транскрипционного фактора NF- $\kappa$ B и в ряде случаев может быть следствием развития аутоиммунных расстройств (Brown K.D. et al., 2008). Не исключено, что инактивация (или конкурентная блокада) IL-8 была бы более эффективна, в сравнении с инактивацией других провоспалительных цитокинов, в сдерживании как макрофагального воспаления, так и патологических иммунных реакций, приводящих к разрушению тканей и органов.

Согласно данным, представленным в настоящей работе, Т-лимфоциты способны продуцировать IL-8. Активация Т-лимфоцитов приводила к усилению продукции IL-8. Эти результаты согласуются с ранее опубликованными данными, демонстрирующими продукцию IL-8 активированными CD4<sup>+</sup> Т-клетками (Gesser B. et al., 1995; Wechsler A.S. et al., 1994). Эти результаты прямо указывают на вовлеченность IL-8 в аутокринную регуляцию функциональной активности Т-лимфоцитов. Очевидно, что значимость этой регуляции может возрастать на периферии, вне лимфоидных органов, в условиях дефицита вспомогательных и иммунорегуляторных клеток.

Согласно представленным данным, содержание клеток экспрессирующих рецептор к IL-8 составляет 13,3 (10,5-15,5) %. В целом, эти результаты согласуются с литературными данными (Chuntharapai A. et al., 1994). Интересно, что наибольшее содержание CD181<sup>+</sup> клеток было отмечено среди покоящихся CD4<sup>+</sup> Т-клеток эффекторной памяти и среди CD4<sup>+</sup> терминально-дифференцированных Т-эффекторов, которые характеризуются высокой степенью зрелости. Эти клетки не обладают миграционной тропностью к лимфоидным органам и, по-видимому, не вносят существенный вклад в генерацию долговременной иммунной памяти. Следует, однако, иметь в виду, что активация Т-лимфоцитов может индуцировать экспрессию CD181 на относительно низкодифференцированных Т-лимфоцитах, способных мигрировать в лимфоидные органы и там подвергаться клональной экспансии (Francis J.N. et al., 2004). Отсюда можно предполагать участие IL-8 в механизмах, позитивно регулирующих формирование долговременной иммунной памяти. Это предположение согласуется с ранее опубликованными данными, показавшими, что IL-8 способен индуцировать экспрессию CD181 на активированных CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитах центральной памяти (Gasser O. et al., 2005). В работе показано разнонаправленное влияние IL-8 на экспрессию CD181, выявляемую на разных Т-клеточных субпопуляциях. Возможно, это связано с интернализацией рецептора после его связывания с IL-8 (Jones S.A. et al., 1996; L'Heureux G.P. et al., 1995). В целом, полученные данные, указывающие на способность активированных Т-лимфоцитов продуцировать IL-8, а также экспрессировать на своей поверхности рецептор к IL-8 предполагают значимость IL-8 в автономной регуляции Т-клеточного адаптогенеза.

Первичная антигенная стимуляция приводит к активации наивных Т-клеток, они пролиферируют и дифференцируются в эффекторные Т-лимфоциты и Т-клетки памяти (Sallusto F. et al., 2000; Rufer N. et al., 2003). В наших экспериментах *in vitro*, Т-клеточная активация сопровождалась относительным приростом Т-клеток с фенотипом CD45RA<sup>+</sup>CD197<sup>+</sup>, а также CD4-позитивных и CD4-негативных Т-лимфоцитов. Это увеличение, по-видимому, происходило за



счет относительного снижения содержания в культуре Т-лимфоцитов центральной памяти, которое могло быть связано с дифференцировочным процессом. Известно, что повышение продукции цитокинов и хемокинов (IL-2, IL-8, IL-10) чаще всего в результате воспаления способствует дифференцировке Т-лимфоцитов в эффекторные клетки и данный процесс не нуждается в костимуляции (Caron G. et al., 2005). Возможно, стимуляция дифференцировочного процесса в наших экспериментах была частично связана со способностью IL-8 активировать продукцию Т-лимфоцитами ряда цитокинов, в том числе – IL-2, IL-7, которые стимулируют дифференцировку и созревание Т-лимфоцитов в эффекторные Т-клетки (Létourneau S. et al., 2009; Alves N.L. et al., 2003). Кроме того, не исключено, что в нашей модели антитела к CD28 сами по себе могли играть определенную роль в антиген-независимой дифференцировке и пролиферации Т-клеток памяти (Siefken R. et al., 1997; Singh M. et al., 2008; Blair P.J. et al., 1997).

Данные, характеризующие влияние IL-8 на поверхностные и функциональные свойства активированных Т-клеточных субпопуляций суммированы в **таблице 3**

**Таблица 3.** Оценка количества Т-клеток, экспрессирующих различные маркеры

Субпопуляции	Активированные Т-клетки с IL-8			Цитокины			
	CD181 <sup>+</sup>	CD25 <sup>+</sup>	CD38 <sup>+</sup>	IL-2	IFN- $\gamma$	IL-4	IL-10
CD4 <sup>+</sup> Т-клетки	0	–	0	+	0	0	–
CD4 <sup>+</sup> наивные Т-клетки	0	0	0				
CD4 <sup>+</sup> Т-клетки центральной памяти	0	0	0				
CD4 <sup>+</sup> Т-клетки эффекторной памяти	0	–	0				
CD4 <sup>+</sup> терминально-дифференцированные эффекторы	0	–	0				
CD4 <sup>–</sup> Т-клетки	–	–	0				
CD4 <sup>–</sup> наивные Т-клетки	–	0	0				
CD4 <sup>–</sup> Т-клетки центральной памяти	0	0	0				

CD4 <sup>+</sup> Т-клетки эффекторной памяти	+	–	0				
CD4 <sup>+</sup> терминально- дифференцированные эффекторы	–	–	0				

Примечание: «–» - снижение показателей;  
«+» - увеличение показателей;  
«0» - без изменений.

Как следует из представленных данных, IL-8 избирательно снижал оцениваемую по экспрессии CD25 активацию высокодифференцированных CD197-негативных Т-клеток, утративших способность мигрировать в лимфоидные органы и подвергаться там размножению. Эти данные указывают на возможную прямую вовлеченность IL-8 в негативную регуляцию локальных Т-клеточных реакций. Эти результаты согласуются с ранее опубликованными данными о продукции регуляторными CD4<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> Т-клетками IL-8 (Himmel M.E. et al., 2011), которая резко возрастает в ответ на их активацию (Akhade A.S., Qadri A., 2015). В свете представленных данных можно предполагать, что IL-8, наряду с IL-10 и TGF- $\beta$ , способен опосредовать иммуносупрессивный эффект регуляторных Т-клеток. Однако, это предположение входит в прямое противоречие с нашими данными, демонстрирующими позитивный эффект IL-8 на Т-клеточную продукцию IL-2 и негативный эффект на секрецию IL-10. Также замечено, что IL-8 свойственна тенденция снижать осуществляемую активированными Т-клетками продукцию IL-4. Такая тенденция была также описана ранее (Gesser B. et al., 1996). Таким образом, IL-8 способен оказывать разнонаправленное влияние на активацию и функциональную деятельность разных Т-клеточных субпопуляций. Предполагается, что с одной стороны, IL-8 мог бы препятствовать развитию избыточных Т-клеточных реакций на периферии, с другой стороны, он мог бы способствовать развитию адаптивных Т-клеточных процессов, формирующих иммунную память. Следует заметить, что IL-8 не оказывал существенного влияния на экспрессию CD38 молекулы, которая возрастала в процессе Т-клеточной активации. Эти данные подтверждают

существование разных типов Т-клеточной активации (Smith-Garvin J.E. et al., 2009).

IL-2 является основным ростовым фактором для активированных Т-лимфоцитов. В процессе адаптивного иммуногенеза, основными продуцентами IL-2 являются CD4<sup>+</sup> клетки (Селедцов В.И. и др., 2010; Liao W. et al., 2013). Наши результаты указывают на способность IL-8 усиливать продукцию IL-2 активированными Т-лимфоцитами. Таким образом, IL-8 обладает способностью опосредованно поддерживать пролиферативные Т-клеточные реакции, в том числе и те, которые лежат в основе формирования иммунной памяти. Согласно полученным данным, IL-8 демонстрировал тенденцию к усилению продукции активированными клетками IFN- $\gamma$ . Однако, эта тенденция была не подкреплена статистической значимостью.

Вместе с тем, обнаружено значимое снижение под влиянием IL-8 Т-клеточной продукции IL-10. Тенденция к снижению продукции IL-4 активированными Т-клетками была статистически незначимой. Таким образом, можно предполагать, что IL-8 обладает умеренной способностью прямо поддерживать иммунные реакции, опосредуемые Т-хелперами 1 типа.

Резюмируя вышесказанное, необходимо подчеркнуть, что IL-8 поддерживает провоспалительную активность Мц/Мф, а также содействует их миграции в лимфоидные органы, тем самым, способствуя генерализации и интенсификации адаптивных иммунных процессов. Также он способен оказывать разнонаправленное влияние на активацию и функциональную деятельность разных Т-клеточных субпопуляций. А именно, препятствует развитию избыточных Т-клеточных реакций на периферии, при этом, содействует развитию адаптивных Т-клеточных процессов, формирующих иммунную память.

Таким образом, полученные данные могут быть положены в основу разработки новых подходов лечения, либо коррекции дисбаланса иммунитета.

## ВЫВОДЫ

1. IL-8 *in vitro* увеличивает относительное количество активированных Мц/Мф, экспрессирующих CD119 и CD197 и снижает число CD16<sup>+</sup> и CD124<sup>+</sup> клеток. IL-8 стимулирует секрецию Мц/Мф IL-1 $\beta$  и IL-6.
2. Т-клеточная активация приводит к усилению продукции IL-8, к увеличению числа CD181<sup>+</sup> клеток, среди CD4-позитивных наивных и CD4<sup>+</sup>/CD4<sup>-</sup> терминально-дифференцированных Т-лимфоцитах и к снижению количества CD4-позитивных Т-эффекторов. Добавление экзогенного IL-8 приводит к относительному увеличению количества CD4-негативных наивных и терминально-дифференцированных Т-клеток, экспрессирующих CD181.
3. Присутствие экзогенного IL-8 в культуре увеличивает относительное количество CD4-позитивных и CD4-негативных эффекторных Т-клеток и снижает количество наивных и Т-клеток центральной памяти.
4. Действие IL-8 на активированные Т-лимфоциты приводит к относительному снижению количества эффекторных CD4-позитивных и CD4-негативных Т-клеток и к усилению секреции IL-2.
5. IL-8 способен позитивно влиять на адаптивный иммуногенез посредством прямых воздействий на дифференцировку и функциональные свойства Мц/Мф и Т-лимфоцитов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Апоптоз нейтрофилов и иммунорегуляторные цитокины при аутоиммунных тиреопатиях / О.И. Уразова, Е.Б. Кравец, В.В. Новицкий и др. // Клиническая и экспериментальная тиреоидология. – 2007. – Т. 3. - № 4. – С. 49-53.
2. Влияние галектина-1 на апоптоз CD4<sup>+</sup> -лимфоцитов, дифференцированных *in vitro* в направлении регуляторных Т-клеток / В.Д. Якушина, О.А. Васильева, В.В. Новицкий и др. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2013. Т. 156, № 11. – С. 616-619.
3. Зурочка, А.В. Цитометрический анализ субпопуляций Т-хелперов (Th1, Th2, Treg, Th17, Т-хелперы активированные) / А.В. Зурочка, С.В. Хайдуков // Медицинская иммунология. – 2011. – Т. 13, № 1. – С. 7–16
4. Исследование основных субпопуляций Т-хелперов и цитотоксических Т-клеток при ревматоидном артрите / И.В. Кудрявцев, Г.А. Захарова, Т.В. Гапонова и др. // Российский иммунологический журнал. – 2014. – Спб.: Т. 8(17), № 2(1). – С. 89-92.
5. Кетлинский, С.А. Цитокины / С.А. Кетлинский, А.С. Симбирцев. – СПб. : Фолиант, 2008. – 549 с.
6. 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
7. Литвицкий, П.Ф. Врожденный иммунитет: механизмы реализации и патологические синдромы. Часть 3 / П.Ф. Литвицкий, Т.Г. Синельникова // Вопросы современной педиатрии. – 2009. – Т. 8. – №. 3.
8. Мальцев, В.Н. Врожденный иммунитет: физиологическая роль в нормальном и облученном организме (обзор литературы) / В.Н. Мальцев, А.А. Иванов // Медицина экстремальных ситуаций. – 2016. – №. 3 (57).
9. Меджитов, Р. Врожденный иммунитет / Р. Меджитов, Ч. Джаневей // Казанский медицинский журнал. – 2004. – Т. 85. – №. 3.

10. Основные поверхностные маркеры функциональной активности Т-лимфоцитов / Л. С. Литвинова, А. А. Гуцол, Н. А. Сохоневич и др. // Медицинская иммунология. – 2014. – Т. 16, № 1. – С. 7-26.
11. Проточная цитометрия в медицине и биологии / А.В. Зурочка, С.В. Хайдуков, И.В. Кудрявцев и др. // Редакционно-издательский отдел Уральского отделения РАН. – 2013. – 552 с.
12. Регуляторные Т-клетки и противотуберкулезный иммунитет / Е.Г. Чурина, О.И. Уразова, В.В. Новицкий. – Томск: Печатная мануфактура, 2014. – 156 с.
13. Факторы дисрегуляции иммунного ответа (на различных этапах его реализации) при туберкулезе легких // Е.Г. Чурина, О.И. Уразова, В.В. Новицкий. – Бюллетень Сибирской медицины. – 2016. Т. 15, №5. С.166-177.
14. Симбирцев, А.С. Цитокины: классификация и биологические функции / А.С. Симбирцев // Цитокины и воспаление. - 2004. - №2. - С. 16 – 21.
15. Солодовникова, О.Н. «Кислородный взрыв» нейтрофильных лейкоцитов в патогенезе воспалительной реакции при гнойных инфекциях у детей / О.Н. Солодовникова, В.П. Молочный // Дальневосточный медицинский журнал. – 2012. – №. 1.
16. Субпопуляционный состав регуляторных Т-клеток крови у больных туберкулезом легких с множественной лекарственной устойчивостью / Е.Г. Чурина, В.В. Новицкий, О.И. Уразова и др. // Бюллетень сибирской медицины. – 2011. – № 4. – С. 183–186.
17. Тотолян, А.А. Роль хемокинов и их рецепторов в иммунорегуляции / А.А. Тотолян // Иммунология. – 2001. – №. 5. – С. 7-15.
18. Хаитов, Р.М. 2016 Иммунология Учебник М.: ГЭОТАР-Медиа, 2016 – 496 с.
19. Черешнев, А.А. Иммунология воспаления: роль цитокинов / А.А. Черешнев, Е.Ю. Гусев // Медицинская иммунология. – 2001. – Т. 3. - №3. – С. 361-368.
20. Экспрессия мРНК некоторых хемокинов и их рецепторов в слизистой оболочке носоглотки у практически здоровых лиц / А.А. Бибкова, К.А. Сысоев, А.В. Семенов и др. // Медицинская иммунология. – 2014. – Т. 13. – №. 6. – С. 617-622.

- 21.Экспрессия мРНК транскрипционных факторов RORC2 и FoxP3 в лимфоцитах у больных туберкулезом легких / Т.Е. Кононова, О.И. Уразова, В.В. Новицкий, Е.Г. Чурина и др. // Цитология. – 2015. – Т. 57, № 1. – С. 56–61.
- 22.Ярилин, А.А. Иммунология. Учебник / Ярилин А.А. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 752 с.
- 23.A role for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection / H. Suzuki, Y. Kurihara, M. Takeya, et al. // Nature. – 1997. – V. 386, №6622. – P. 292-296.
- 24.Abbas, A.K. Cellular and Molecular Immunology / A.K. Abbas, A.H. Lichtman, S. Pillai // 6th ed. Elsevier. – 2010. – P. 272-288.
- 25.Aderem, A. Mechanisms of phagocytosis in macrophages / A. Aderem, D.M. Underhill // Annu. Rev. Immunol. – 1999. – V. 17, №1. – P. 593-623.
- 26.Akhade, A.S. T-cell receptor activation of human CD4+ T cells shifts the innate TLR response from CXCL8hiIFN- $\gamma$ null to CXCL8loIFN- $\gamma$ hi / A.S. Akhade, A. Qadri // Eur J Immunol. – 2015. – V. 45, №9. – P. 2628-2637.
- 27.Alterations in the number of circulating leucocytes, phenotype of monocyte and cytokine production in patients undergoing cardiothoracic surgery / M.J. Hiesmayr, A. Spittler, A. Lassnigg, et al. // Clin Exp Immunol. – 1999. – V. 115, № 2. – P. 315-323.
- 28.Ansel, K.M. Chemokines in lymphopoiesis and lymphoid organ development / K.M. Ansel, J.G. Cyster // Curr. Opin. Immunol. – 2001. V. 13, №2. P. 172-179.
- 29.Antibody structure, instability, and formulation / W. Wang, S. Singh, D.L. Zeng, et al. // J Pharm Sci. – 2007. – V. 96, №1. – P. 1-26.
- 30.Antigen presentation in extracellular matrix: interactions of T cells with dendritic cells are dynamic, short lived, and sequential / M. Gunzer, A. Schafer, S. Borgmann, // Immunity. – 2000. – V. 13, №3. – P. 323-332.
- 31.Assignment of genes for interleukin-8 receptors (IL8R) A and B to human chromosome band 2q35 / A. Lloyd, W. Modi, H. Sprenger, et al. // Cytogenet Cell Genet. – 1993. – V. 63, №4. – P. 238-240.

32. Autonomous T cell trafficking examined in vivo with intravital two-photon microscopy / M.J. Miller, S.H. Wei, M.D. Cahalan, et al. // *Proc. Natl Acad. Sci.* – 2003 – V. 100, №5. – P. 2604-2609.
33. Banchereau, J. Dendritic cells and the control of immunity / J. Banchereau, R.M. Steinman // *Nature*. – 1998. – V. 392, №. 6673. – P. 245-252.
34. Basu, R. The Th17 family: flexibility follows function / R. Basu, R.D. Weaver, C.T. Hatton. // *Immunol. Rev.* – 2013. – V. 252, №1. – P. 89-103.
35. Bickel, M. The role of interleukin-8 in inflammation and mechanisms of regulation / M. Bickel // *J Periodontol.* 1993, – V. 64, №5 – P. 456-460.
36. Bluestone, J.A. Natural versus adaptive regulatory T cells / J.A. Bluestone, A.K. Abbas // *Nat Rev Immunol.* – 2003. – V. 3, №3. – P. 253-257.
37. Bogdan, C. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity / C. Bogdan, M. Rollinghof, A. Diefenbach // *Curr Opin Immunol.* – 2000. – V. 12, №1, - P. 64-76.
38. Bour-Jordan, H. CD28 function: a balance of costimulatory and regulatory signals / H. Bour-Jordan, J.A. Bluestone // *J Clin Immunol.* – 2002. – V. 22, №1. – P. 1-7.
39. Brat, D.J. The role of interleukin-8 and its receptors in gliomagenesis and tumoral angiogenesis / D.J. Brat, A.C. Bellail, E.G. Van Meir // *Neuro-oncology.* – 2005. – V. 7, №2. – P. 122-133.
40. Brown, K.D. The roles of the classical and alternative nuclear factor-kappaB pathways: potential implications for autoimmunity and rheumatoid arthritis / K.D. Brown, E. Claudio, U. Siebenlist // *Arthritis Res Ther.* – 2008. – V. 10, №4. – P. 212.
41. Burgner, D. Nitric oxide and infectious diseases / D. Burgner, K. Rockett, D. Kwiatkowski // *Arch Dis Child.* – 1999. – V. 81, №. 2. – P. 185-188.
42. C3a and C5a are chemotactic factors for human mesenchymal stem cells, which cause prolonged ERK1/2 phosphorylation / I.U. Schraufstatter, R.G. DiScipio, M. Zhao, et al. // *J Immunol.* – 2009. – V. 182, №6. – P. 3827-3836.



- 43.CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs / R. Forster, A. Schubel, D. Breitfeld, et al. // *Cell*. – 1999. – V. 99, № 1. – P. 23-33.
- 44.CD14<sup>hi</sup>CD16<sup>+</sup> monocytes phagocytose antibody-opsonised *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes more efficiently than other monocyte subsets, and require CD16 and complement to do so / J. Zhou, G. Feng, J. Beeson et al. // *BMC Med*. – 2015. – V. 13, №1. – P. 154.
- 45.CD28 co-receptor signal transduction in T-cell activation / P.J. Blair, J.L. Riley, R.G. Carroll, et al. // *Biochem Soc Trans*. – 1997. – V. 25, №2. – P. 651-657.
- 46.CD38 in T-and B-cell functions / P. Deterre, V. Berthelie, B. Bauvois, et al. // *Chem. Immunol*. – 2000. – V. 75. – P. 146-168.
- 47.CD45 isoform phenotypes of human T cells: CD4<sup>+</sup> CD45RA-RO<sup>+</sup> memory T cells re-acquire CD45RA without losing CD45RO / L. Arlettaz, C. Barbey, F. Dumont-Girard, et al. // *Eur J Immunol*. – 1999. – V. 29, №12. – P. 3987-3994.
- 48.Chaplin, D.D. Overview of the immune response / D.D. Chaplin // *J Allergy Clin Immunol*. – 2010. – V. 125, №2. – P. S3-S23.
- 49.Chemokines and chemokine receptors: their manifold roles in homeostasis and disease / Y. Le, Y. Zhou, P. Iribarren, et al. // *Cell Mol Immunol*. – 2004. – V. 1, №2. – P. 95-104.
- 50.Chemokines and innate immunity / A. Matsukawa, C.M. Hogaboam, N.W. Lukacs, et al. // *Rev Immunogenet*. – 2000. – V. 2, №3. – P. 339-358.
- 51.Chen, L. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition / L. Chen, D.B. Flies // *Nat Rev Immunol*. – 2013. – V. 13, №4. – P. 227-242.
- 52.Chitin induces accumulation in tissue of innate immune cells associated with allergy / T.A. Reese, H.E. Liang, A.M. Tager, et al. // *Nature*. – 2007. – V. 447, №7140. – P. 92-96.
- 53.Circulating interleukin-10 and interleukin-12 in Parkinson's disease / M. Rentzos, C. Nikolaou, E. Andreadou, et al. // *Acta Neurol Scand*. – 2009. – V. 119, №5. – P. 332-337.

54. Complement in human diseases: lessons from complement deficiencies / M. Botto, M. Kirschfink, P. Macor, et al. // *Mol Immunol.* – 2009. – V. 46, №14. – P. 2774-2783.
55. Constitutive and stimulated MCP-1, GRO alpha, beta, and gamma expression in human airway epithelium and bronchoalveolar macrophages / S. Becker, J. Quay, H.S. Koren et al. // *Am J Physiol.* – 1994. – V. 266, №3. – P. L278-L286.
56. Couper, K.N. IL-10: the master regulator of immunity to infection / K.N. Couper, D.G. Blount, E.M. Riley // *J Immunol.* – 2008. – V. 180, №9. – P. 5771-5777.
57. Cross-desensitization among CXCR1, CXCR2, and CCR5: role of protein kinase C- $\epsilon$  / M.W. Nasser, R.J. Marjoram, S.L. Brown, et al. // *J Immunol.* – 2005. – V. 174, №11. – P. 6927-6933.
58. Crotty, S. Follicular helper CD4 T cells (Tfh) / S. Crotty // *Annu Rev Immunol.* – 2011. – V. 29. – P. 621-663.
59. CXCR1 silencing inhibits androgen-independent prostate cancer / N. Shamaladevi, D.A. Lyn, D.O. Escudero, et al. // *Cancer Res.* – 2009. – V. 69, №21. – P. 8265-8274.
60. CXCL8 (IL-8) mediates neutrophil recruitment and behavior in the zebrafish inflammatory response / S. de Oliveira, C.C. Reyes-Aldasoro, S. Candel, et al. // *J Immunol.* – 2013. – V. 190, №8. – P. 4349-4359.
61. CXCL8-induced FAK phosphorylation via CXCR1 and CXCR2: cytoskeleton- and integrin-related mechanisms converge with FAK regulatory pathways in a receptor-specific manner / E. Cohen-Hillel, I. Yron, T. Meshel, et al. // *Cytokine.* – 2006. – V. 33, №1. – P. 1-16.
62. CXCR1 blockade selectively targets human breast cancer stem cells in vitro and in xenografts / C. Ginestier, S. Liu, M.E. Diebel, et al. // *J Clin Invest.* – 2010. – V. 120, №2. – P. 485.
63. CXCR1+ CD4+ T cells in human allergic disease / J.N. Francis, M.R. Jacobson, C.M. Lloyd, et al. // *J Immunol.* – 2004. – V. 172, №1. – P. 268-273.
64. Cyster, J.G. Chemokines and cell migration in secondary lymphoid organs / J.G. Cyster // *Science.* – 1999. – V. 286, №5447. – P. 2098-2102.

65. Cyster, J.G. Leukocyte migration: scent of the T zone / J.G. Cyster // *Curr. Biol.* – 2000, V. 10, №1. P. R30–R33.
66. 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.
67. Dendritic cell biology and regulation of dendritic cell trafficking by chemokines / C. Caux, S. Ait-Yahia, K. Chemin, et al. // *Springer Semin. Immunopathol.* – 2000. – V. 22, №4. – P. 345-369.
68. Different functions for the interleukin 8 receptors (IL-8R) of human neutrophil leukocytes: NADPH oxidase and phospholipase D are activated through IL-8R1 but not IL-8R2 / S.A. Jones, M. Wolf, S. Qin, et al. // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 1996. – V. 93, №13. – P. 6682-6686.
69. Differential activation and regulation of CXCR1 and CXCR2 by CXCL8 monomer and dimer / M.W. Nasser, S.K. Raghuwanshi, D.J. Grant et al. // *J Immunol.* – 2009. – V. 183, №5. – P. 3425-3432.
70. Differential activation of transcription factors induced by Ca<sup>2+</sup> response amplitude and duration / R.E. Dolmetsch, R.S. Lewis, C.C. Goodnow, et al. // *Nature.* – 1997. – V. 386, №6627. – P. 855-858.
71. Direct effects of interleukin-8 on growth and functional activity of T lymphocytes / M.E. Meniailo, V.V. Malashchenko, V.A. Shamrov, et al. // *Int Immunopharmacol.* – 2017. – V. 50. – P. 178-185.
72. Direct stimulation of human T cells via TLR5 and TLR7/8: flagellin and R-848 up-regulate proliferation and IFN- $\gamma$  production by memory CD4<sup>+</sup> T cells. / G. Caron, D. Duluc, I. Frémaux et al. // *J Immunol.* – 2005. – V. 175, №1. – P. 1551–1557.
73. Disengaging the IL-2 receptor with daclizumab enhances IL-7-mediated proliferation of CD4(+) and CD8(+) T cells / P. Monti, C. Brigatti, A.K. Heninger et al. // *Am J Transplant.* – 2009. – V. 9, №12. – P. 2727-2735.

74. Distinct antigen trafficking from skin in the steady and active states / M. Yoshino, H. Yamazaki, H. Nakano, T. Kakiuchi, et al. // *Int. Immunol.* – 2003. – V. 15, №6. – P. 773-779.
75. Divergent expression patterns of IL-4 and IL-13 define unique functions in allergic immunity / H.E. Liang, R.L. Reinhardt, J.K. Bando, et al. // *Nat Immunol.* – 2012. – V. 13, №1. – P. 58-66.
76. Diverging signal transduction pathways activated by interleukin-8 and related chemokines in human neutrophils: interleukin-8, but not NAP-2 or GRO alpha, stimulates phospholipase D activity / G.P. L'Heureux, S. Bourgoin, N. Jean, et al. // *Blood.* – 1995. – V. 85, №2. – P. 522-531.
77. Dixit, N. Chemokines, selectins and intracellular calcium flux: temporal and spatial cues for leukocyte arrest / N. Dixit, S.I. Simon // *Front Immunol.* – 2012. – V. 3.
78. Duque, G.A., Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases / G.A. Duque, A. Descoteaux // *Front Immunol.* – 2014. – V. 5, №491.
79. Dynamic imaging of the immune system: progress, pitfalls and promise / R.N. Germain, M.J. Miller, M.L. Dustin, et al. // *Nat. Rev. Immunol.* – 2006. – V. 6, №7. – P. 497-507.
80. Ebrahimzadeh, P.R. Neutrophil chemotaxis in moving gradients of fMLP / P.R. Ebrahimzadeh, C. Högfors M. Braide // *J Leukoc Biol.* – 2000. – V. 67, №5. – P. 651-661.
81. Efficient priming of protein antigen-specific human CD4<sup>+</sup> T cells by monocyte-derived dendritic cells / K. Schlienger, N. Craighead, K.P. Lee, et al. // *Blood.* – 2000. – V. 96, №10. – P. 3490-3498.
82. Elluru, S.R. The protective role of immunoglobulins in fungal infections and inflammation / S.R. Elluru, S.V. Kaveri, J. Bayry // *Semin Immunopathol.* – 2015. – V. 37, №2. – P. 187-197.
83. Enhanced frequencies of CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup>, but not CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>, peripheral blood monocytes in severe asthmatic patients / M. Moniuszko, A. Bodzenta-Lukaszyk, K. Kowal, et al. // *Clin Immunol.* – 2009. – V. 130, №3. – P. 338-346.

84. Ex vivo characterization of human CD8<sup>+</sup> T subsets with distinct replicative history and partial effector functions / N. Rufer, A. Zippelius, P. Batard et al. // *Blood*. – 2003. – V. 102, №5. – P. 1779-1787.
85. Expression of CC and CXC chemokines and chemokine receptors in human leprosy skin lesions / A.A. Kirkaldy, A.C. Musonda, S. Khanolkhar-Young, et al. // *Clin Exp Immunol*. – 2003. – V. 134, №3. – P. 447-453.
86. Expression of interleukin-8 correlates with vascularity in human gastric carcinomas / Y. Kitadaix, K. Haruma, K. Sumii, et al. // *Am J Pathol*. – 1998. – V. 152, №1. – P. 93-100.
87. Farber, D.L. Human memory T cells: generation, compartmentalization and homeostasis / D.L. Farber, N.A. Yudanin, N.P. Restifo // *Nat Rev Immunol*. – 2014. – V. 14, №1. – P. 24-35.
88. Follicular stromal cells and lymphocyte homing to follicles / J.G. Cyster, K.M. Ansel, K. Reif, et al. // *Immunol. Rev*. – 2000. – V. 176. – P. 181-193.
89. Förster, R. CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance / R. Förster, A.C. Davalos-Missslitz, A. Rot // *Nat Rev Immunol*. – 2008. – V. 8, №5. – P. 362-371.
90. Forster, R. Lymph node homing of T cells and dendritic cells via afferent lymphatics / R. Forster, A. Braun, T. Worbs // *Trends Immunol*. – 2012. – V. 33, №6. – P. 271-280.
91. Fraser, I.P. The serum mannose-binding protein and the macrophage mannose receptor are pattern recognition molecules that link innate and adaptive immunity / I.P. Fraser, H. Koziel, R.A.B. Ezekowitz // *Semin Immunol*. – 1998. – V. 10, №5. – P. 363-372.
92. Genomic structure, characterization, and identification of the promoter of the human IL-8 receptor A gene / H. Sprenger, A.R. Lloyd, R.G. Meyer, et al. // *J Immunol*. – 1994. – V. 153, №6. – P. 2524-2532.
93. Glynn, P.C. The selective CXCR2 antagonist SB272844 blocks interleukin-8 and growth-related oncogene- $\alpha$ -mediated inhibition of spontaneous neutrophil

- apoptosis / P.C. Glynn, E. Henney, I.P. Hall // *Pulm Pharmacol Ther.* – 2002. – V. 15, №2. – P. 103-110.
94. Gordon, S. Phagocytosis: an immunobiologic process / S. Gordon // *Immunity.* – 2016. – V. 44, №3. – P. 463-475.
95. Graham, G.J. Regulation of the immune and inflammatory responses by the 'atypical' chemokine receptor D6 / G.J. Graham, M. Locati // *J Pathol.* – 2013. – V. 229, №2. – P. 168-175.
96. Greenwald, R.J. The B7 family revisited / R.J. Greenwald, G.J. Freeman, A.H. Sharpe // *Annu. Rev. Immunol.* – 2005. – V. 23. – P. 515-548.
97. Harwood, N.E. Early events in B cell activation / N.E. Harwood, F.D. Batista // *Annu Rev Immunol.* – 2009. – V. 28. – P. 185-210.
98. Hedges, J.C. Mitogen-activated protein kinases regulate cytokine gene expression in human airway myocytes / J.C. Hedges, C.A. Singer, W.T. Gerthoffer // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* – 2000, - V. 23, №1 – P. 86-94.
99. Herrin, B.R. Alternative adaptive immunity in jawless vertebrates / B.R. Herrin, M.D. Cooper // *J Immunol.* – 2010. – V. 185, №3. – P. 1367-1374.
100. Hogarth, P.M. Fc receptor-targeted therapies for the treatment of inflammation, cancer and beyond / P.M. Hogarth, G.A. Pietersz // *Nat Rev Drug Discov.* – 2012. – V. 11, №4. – P. 311-331.
101. Homeostatic chemokines CCL19 and CCL21 promote inflammation in human immunodeficiency virus-infected patients with ongoing viral replication / J.K. Damås, L. Landrø, B. Fevang, et al. // *Clin Exp Immunol.* – 2009. – V. 157, №3. – P. 400-407.
102. Human CD4<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells produce CXCL8 and recruit neutrophils / M.E. Himmel, S.Q. Crome, S. Ivison, et al. // *Eur J Immunol.* – 2011. – V. 41, №2. – P. 306-312.
103. Human CD8<sup>+</sup> T cells store CXCR1 in a distinct intracellular compartment and up-regulate it rapidly to the cell surface upon activation / O. Gasser, A. Missiou, C. Eken, et al. // *Blood.* – 2005. – V. 106, №12. – P. 3718-3724.

104. Human T lymphocytes and mast cells differentially express and regulate extra-and intracellular CXCR1 and CXCR2 / U. Lippert, K. Zachmann, B.M. Henz, et al. // *Exp Dermatol.* – 2004. – V. 183, №3. P. 520-525.
105. Identification of a novel dendritic cell-like subset of CD64(+)/CD16(+) blood monocytes / E. Grage-Griebenow, R. Zawatzky, H. Kahlert, et al. // *Eur J Immunol.* – 2001. – V. 31, №1 – P. 48-56.
106. IL-15 induces antigen-independent expansion and differentiation of human naive CD8+ T cells in vitro / N.L. Alves, B. Hooibrink, F.A. Arosa et al. // *Blood.* – 2003. – V. 102, №7. – P. 2541–2546.
107. IL-2- and CD25-dependent immunoregulatory mechanisms in the homeostasis of T-cell subsets / S. Létourneau, C. Krieg, G. Pantaleo et al. // *J. Allergy Clin Immunol.* 2009. – V. 123, №4. – P. 758-762.
108. IL-8 directly enhanced endothelial cell survival, proliferation, and matrix metalloproteinases production and regulated angiogenesis / A. Li, S. Dubey, M.L. Varney, et al // *J Immunol.* – 2003. – V. 170, №6. – P. 3369-3376.
109. IL-8 expression and its possible relationship with estrogenreceptor-negative status of breast cancer cells / A. Freund, C. Chauveau, J-P. Brouillet, et al. // *Oncogene.* – 2003. – V.22, №2. – P. 256-265.
110. IL-8 induces T cell chemotaxis, suppresses IL-4, and up-regulates IL-8 production by CD4+ T cells / B. Gesser, M. Lund, N. Lohse, et al. // *J Leukoc Biol.* – 1996. – V. 59, №3. – P. 407-411.
111. Immunobiology, 5th edition. The immune system in health and disease. / C.A. Janeway, J.P. Travers, M. Walport, et al. // New York Garland Science 2001. – Chapter. 2.
112. Impaired T cell-mediated macrophage activation in CD40 ligand-deficient mice / R.D. Stout, J. Suttles, J. Xu, et al. // *J Immunol.* – 1996. – V. 156, №1. – P. 8-11.
113. Induction of IL-8 expression in T cells uses the CD28 costimulatory pathway / A.S. Wechsler, M.C. Gordon, U. Dendorfer, et al. // *J Immunol.* – 1994. – V. 153, №6. – P. 2515-2523.

114. Inhibition of interleukin-8 (CXCL8/IL-8) responses by repertaxin, a new inhibitor of the chemokine receptors CXCR1 and CXCR2 / F. Casilli, A. Bianchini, I. Gloaguen // *Biochem Pharmacol.* – 2005. – V. 69, №3. – P. 385-394.
115. Interactions of interleukin-8 with the human chemokine receptor CXCR1 in phospholipid bilayers by NMR spectroscopy / S.H. Park, F. Casagrande, L. Cho, et al. // *J Mol Biol.* – 2011. – V. 414, №2. – P. 194-203.
116. Interferon- $\gamma$ : an overview of signals, mechanisms and functions / K. Schroder, P.J. Hertzog, T. Ravasi, et al. // *J Leukoc Biol.* – 2004. – V. 75, №2. – P. 163-189.
117. Interleukin 8 expression regulates tumorigenicity and metastasis in human bladder cancer / K. Inoue, J.W. Slaton, S.J. Kim, et al. // *Cancer Res.* – 2000. – V. 60, №8. – P. 2290-2299.
118. Interleukin-8 induces its own production in CD4<sup>+</sup> T lymphocytes: a process regulated by interleukin 10 / B. Gesser, B. Deleuran, M. Lund, et al. // *Biochem Biophys Res Commun.* – 1995. – V. 210, №3. – P. 660-669.
119. Interleukin-8 regulation of the Ras/Raf/mitogen-activated protein kinase pathway in human neutrophils / C. Knall, S. Young, J.A. Nick, et al. // *J Biol Chem.* – 1996. – V. 271, №5. – P. 2832-2838.
120. Interleukin-8 signaling promotes translational regulation of cyclin D in androgen-independent prostate cancer cells / C.F. MacManus, J. Pettigrew, A. Seaton, et al. // *Mol Cancer Res.* – 2007. – V. 5, №7. – P. 737-748.
121. Interleukin-8 stimulates cell proliferation in non-small cell lung cancer through epidermal growth factor receptor transactivation / F. Luppi, A.M. Longo, W.I. de Boer, et al. // *Lung cancer.* – 2007. – V. 56, №1. – P. 25-33.
122. Itano, A.A. Antigen presentation to naïve CD4 T cells in the lymph node / A.A. Itano, M.K. Jenkins // *Nat. Immunol.* – 2003. V.4, №8. – P. 733-739.
123. JAK2/STAT5 inhibition circumvents resistance to PI3K/mTOR blockade: a rationale for cotargeting these pathways in metastatic breast cancer / A. Britschgi, R. Andraos, H. Brinkhaus, et al. // *Cancer cell.* – 2012. – V. 22, №6. – P. 796-811.



124. Janeway, C.A. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology / C.A. Janeway // Cold Spring Harb Symp Quant Biol. – Cold Spring Harbor Laboratory Press. - 1989. – V. 54. – P. 1-13.
125. Janeway, C.A. The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self / C.A. Janeway // Immunol today. – 1992. – V. 13, №1. – P. 11-16.
126. Jiang, B.H. AKT signaling in regulating angiogenesis / B.H. Jiang, L. Z. Liu // Curr Cancer Drug Targets. – 2008. – V. 8, №1. – P. 19-26.
127. Kang, J.Y. Structural biology of the Toll-like receptor family / J.Y. Kang, J.O. Lee // Annu Rev Biochem. – 2011. – V. 80. – P. 917-941.
128. Kawai, T. TLR signaling / T. Kawai, S. Akira // Cell Death & Differentiation. – 2006. – V. 13, №5. – P. 816-825.
129. Keith, F.J. The Drosophila membrane receptor Toll can function to promote cellular adhesion / F.J. Keith, N.J. Gay // EMBO J. – 1990. – V. 9, №13. – P. 4299.
130. King, C. New insights into the differentiation and function of T follicular helper cells / C. King // Nat Rev Immunol. – 2009. – V. 9, №11. – P. 757-766.
131. Knall, C. Interleukin 8-stimulated phosphatidylinositol-3-kinase activity regulates the migration of human neutrophils independent of extracellular signal-regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinases / C. Knall, G.S. Worthen, G.L. Johnson // Proc Natl Acad Sci U S A. – 1997. – V. 94, №7. – P. 3052-3057.
132. Kobilka, B.K. G protein coupled receptor structure and activation / B.K. Kobilka // Biochim Biophys Acta. – 2007. – V. 1768, №4. – P. 794-807.
133. Koch, U. Mechanisms of T cell development and transformation / U. Koch, F. Radtke // Annu Rev Cell Dev Biol. – 2011. – V. 27. – P. 539-562.
134. Köhidai, L. Chemotaxis and chemotactic selection induced with cytokines (IL-8, Rantes and TNF- $\alpha$ ) in the unicellular Tetrahymena pyriformis / L. Köhidai, G. Csaba // Cytokine. – 1998. – V. 10, №7. – P. 481-486.

135. Kufareva, I. Chemokine and chemokine receptor structure and interactions: implications for therapeutic strategies / I. Kufareva, C.L. Salanga, T.M. Handel // *Immunol Cell Biol.* – 2015. – V. 93, №4. – P. 372-383.
136. León B. Dendritic cells and B cells: unexpected partners in Th2 development / B. León, A. Ballesteros-Tato, F.E. Lund // *J Immunol.* – 2014. – V. 193, №4. – P. 1531-1537.
137. 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.
138. Lin, J. T cell receptor signalling / J. Lin, A. Weiss // *J Cell Sci.* – 2001. – V. 114, №2. – P. 243-244.
139. Littman, D.R. Th17 and regulatory T cells in mediating and restraining inflammation / D.R. Littman, A.Y. Rudensky // *Cell.* – 2010. – V. 140, №6. – P. 845-858.
140. Luster, A.D. The role of chemokines in linking innate and adaptive immunity / A.D. Luster // *Curr Opin Immunol.* – 2002. – V. 14, №1. – P. 129-135.
141. Lymphocyte subsets show marked differences in their distribution between blood and the afferent and efferent lymph of secondary lymph nodes / C.R. Mackay, W.G. Kimpton, M.R. Brandon, et al. // *J. Exp. Med.* – 1988. – V.167, №6. – P. 1755-1765.
142. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines / P.J. Murray, J.E. Allen, S.K. Biswas, et al. // *Immunity.* – 2014. – V. 41, №1. – P. 14-20.
143. Martinez, F.O. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment / F.O. Martinez, S. Gordon // *F1000prime Rep.* – 2014. – V. 6, №13.
144. Martín-Fontecha A. Dendritic cell migration to peripheral lymph nodes / A. Martín-Fontecha, A. Lanzavecchia, F. Sallusto // *Handb Exp Pharmacol.* 2009. – №188. – P. 31-49.

145. Medzhitov, R. Innate immunity: impact on the adaptive immune response / R. Medzhitov, C.A. Janeway // *Curr Opin Immunol.* – 1997. – V. 9, №1. – P. 4-9.
146. Medzhitov, R. Origin and physiological roles of inflammation / R. Medzhitov // *Nature.* – 2008. – V. 454, №7203. – P. 428-435.
147. Molecular evolution of the human interleukin-8 receptor gene cluster / S.K. Ahuja, T. Ozcelik, A. Milatovitch, et al. // *Nat Genet.* – 1992. – V. 2, №1. – P. 31-36.
148. Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses / S.J. Szabo, B.M. Sullivan, S.L. Peng, et al. // *Annu Rev Immunol.* – 2003. – V. 21, №1. – P. 713-758.
149. Monoclonal antibodies detect different distribution patterns of IL-8 receptor A and IL-8 receptor B on human peripheral blood leukocytes / A. Chuntharapai, J. Lee, C.A. Hebert, et al. // *J Immunol.* – 1994. – V. 153, №12. – P. 5682-5688.
150. 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.
151. Monocyte-derived neutrophil chemotactic factor (MDNCF/IL-8) resides in a gene cluster along with several other members of the platelet factor 4 gene superfamily / W.S. Modi, M. Dean, H.N. Seuanez, et al. // *Hum Genet.* – 1990. – V. 84, №2. – P. 185-187.
152. Multiple signaling pathways of human interleukin-8 receptor A independent regulation by phosphorylation / R.M. Richardson, H. Ali, B.C. Pridgeon, et al. // *J Biol Chem.* – 1998. – V. 273, №17. – P. 10690-10695.
153. Muraille, E. TH1/TH2 paradigm extended: macrophage polarization as an unappreciated pathogen-driven escape mechanism? / E. Muraille, O. Leo, M. Moser // *Front. Immun.* – 2014. – V. 5.
154. Murphy, K. Janeway's Immunobiology / K. Murphy, C. Weaver // *Garland Science.* – 2016. – P. 11-24.

155. Murphy, K.M. The lineage decisions of helper T cells / K.M. Murphy, S.L. Reiner // *Nat Rev Immunol.* – 2002. – V. 2, №12. – P. 933-944.
156. Murray, P.J. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets / P.J. Murray, T.A. Wynn // *Nat Rev Immunol.* – 2011. – V. 11, №11. – P. 723-737.
157. Myeloid dendritic cells: development, functions, and role in atherosclerotic inflammation / D.A. Chistiakov, I.A. Sobenin, A.N. Orekhov, et al. // *Immunobiology.* – 2015. – V. 220, №6. – P. 833-844.
158. Myeloperoxidase: a front-line defender against phagocytosed microorganisms / S.J. Klebanoff, A.J. Kettle, H. Rosen // *J Leukoc Biol.* 2013. – V. 93, №2. – P. 185-198.
159. Neutrophil CD64 (FcγRI) expression is a specific marker of bacterial infection: a study on the kinetics and the impact of major surgery / G. Fjaertoft, L.D. Hakansson, K. Pauksens, et al // *Scand J Infect Dis.* – 2007. – V. 39, №6-7. – P. 525-535.
160. Noris, M. Overview of complement activation and regulation / M. Noris, G. Remuzzi // *Semin Nephrol.* 2013. – V. 33, №6. – P. 479-492.
161. Nurieva, R.I. Understanding the development and function of T follicular helper cells / R.I. Nurieva, Y. Chung // *Cell Mol Immunol.* – 2010. – V. 7, №3. – P. 190-197.
162. O'Shea, J.J. Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4<sup>+</sup> T cells / J.J. O'Shea, W.E. Paul // *Science.* – 2010. – V. 327, №5969. – P. 1098-1102.
163. O'Neill, L.A.J. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling / L.A.J. O'Neill, A.G. Bowie // *Nat Rev Immunol.* – 2007. – V. 7, №5. – P. 353-364.
164. Oppenheim, J.J. IL-2: more than a T cell growth factor / J.J. Oppenheim // *J Immunol.* – 2007. – V. 179, №3. – P. 1413-1414.

165. Pacheco, P. Effects of microparticle size and Fc density on macrophage phagocytosis / P. Pacheco, D. White, T. Sulchek // PLoS One. – 2013. – V. 8, №4. – e60989.
166. Pfeffer, K. Biological functions of tumor necrosis factor cytokines and their receptors / K. Pfeffer // Cytokine Growth Factor Rev. – 2003. – V. 14, №3. – P. 185-191.
167. Picker, L.J. Physiological and molecular mechanisms of lymphocyte homing / L.J. Picker, E.C. Butcher // Rev. Immunol. – 1993. – V. 10, №1. – P. 561-591.
168. Plasmacytoid dendritic cells: recent progress and open questions / B. Reizis, A. Bunin, H.S. Ghosh, et al. // Annu. Rev. Immunol. – 2011. – V. 29. – P. 163-183.
169. Protection from lethal Gram-positive infection by macrophage scavenger receptor–dependent phagocytosis / C.A. Thomas, Y. Li, T. Kodama, et al. // J Exp Med. – 2000. – V. 191, №1. – P. 147-156.
170. Purification and amino acid sequencing of NAF, a novel neutrophil-activating factor produced by monocytes / A. Walz, P. Peveri, H. Aschauer, et al. // Biochem Biophys Res Commun. – 1987. – V. 149, №2. – P. 755-761.
171. Purification and partial biochemical characterization of a human monocyte-derived, neutrophilactivating peptide that lacks interleukin 1 activity / J.M. Schroder, U. Mrowietz, E. Morita, et al. // J Immunol. – 1987. – V. 139, №10. – P. 3474-3483.
172. Purification of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor that has peptide sequence similarity to other host defense cytokines / T. Yoshimura, K. Matsushima, S. Tanaka, et al. // Proc Natl Acad Sci USA. – 1987. – V. 84, №24. – P. 9233-9237.
173. Radaev, S. Recognition of immunoglobulins by Fcγ receptors / S. Radaev, P. Sun // Mol Immunol. – 2002. – V. 38, №. 14. – P. 1073-1083.

174. Rajagopalan, L. Ligand selectivity and affinity of chemokine receptor CXCR1. Role of N-terminal domain / L. Rajagopalan, K. Rajarathnam // *J Biol Chem.* – 2004. – V. 279, №29. – P. 30000-30008.
175. 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.
176. Recognition and clearance of apoptotic cells: a role for complement and pentraxins / A.J. Nauta, M.R. Daha, C. van Kooten, et al. // *Trends Immunol.* – 2003. – V. 24, №3. – P. 148-154.
177. Regulation of pathogenesis and immunity in helminth infections / R.M. Maizels, E.J. Pearce, D. Artis, et al. // *J Exp Med.* – 2009. – V. 206, №10. – P. 2059-2066.
178. Reizis, B. Regulation of plasmacytoid dendritic cell development / B. Reizis // *Curr. Opin. Immunol.* – 2010. – V. 22, №2. – P. 206-211.
179. Rey-Giraud, F. In vitro generation of monocyte-derived macrophages under serum-free conditions improves their tumor promoting functions / F. Rey-Giraud, M. Hafner, C.H. Ries // *PloS one.* – 2012. – V. 7, №8. – P. e42656.
180. Romagnani S. Th1/Th2 cells / S. Romagnani // *Inflamm Bowel Dis.* – 1999. – V. 5, №4. – P. 285-294.
181. Rossi, D. The biology of chemokines and their receptors / D. Rossi, A. Zlotnik // *Annu Rev Immunol.* – 2000. – V. 18, №1. – P. 217-242.
182. Sabroe, I. Incapacitating the immune system in cystic fibrosis / I. Sabroe, M.K.B. Whyte // *Nat Med.* – 2007. – V. 13, №12. – P. 1417-1418.
183. Saenz S.A. Innate immune cell populations function as initiators and effectors in Th2 cytokine responses / S.A. Saenz, M. Noti, D. Artis // *Trends Immunol.* – 2010. – V. 31, №11. – P. 407-413.
184. Sallusto, F. The role of chemokine receptors in primary, effector, and memory immune responses / F. Sallusto, C.R. Mackay, A. Lanzavecchia // *Annu Rev Immunol.* – 2000. – V. 18, №1. – P. 593-620.

185. Sawa T. V-antigen homologs in pathogenic gram-negative bacteria / T. Sawa, H. Katoh, H. Yasumoto // *Microbiol Immunol.* – 2014. – V. 58, №5. – P. 267-285.
186. Schraufstatter I. U. IL-8 activates endothelial cell CXCR1 and CXCR2 through Rho and Rac signaling pathways / I.U. Schraufstatter, J. Chung, M. Burger // *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* – 2001. – V. 280, №6. – P. L1094-L1103.
187. Schroeder, H.W. Structure and function of immunoglobulins / H.W. Schroeder, L. Cavacini // *J Allergy Clin Immunol.* – 2010. – V. 125, №2. – P. S41-S52.
188. Seder R.A. Similarities and differences in CD4+ and CD8+ effector and memory T cell generation / R.A. Seder, R. Ahmed // *Nat Immunol.* – 2003. – V. 4, №9. – P. 835-842.
189. Segal, A.W. Kinetics of fusion of the cytoplasmic granules with phagocytic vacuoles in human polymorphonuclear leukocytes / A.W. Segal, J. Dorling, S. Coade // *Biochemical and morphological studies // J Cell Biol.* – 1980. – V. 85, №1. – P. 42-59.
190. Selective expansion of memory CD4+ T cells by mitogenic human CD28 generates inflammatory cytokines and regulatory T cells / M. Singh, S. Basu, C. Camell, et al. // *Eur J immunol.* – 2008. – V. 38, №6, - P. 1522-1532.
191. 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.
192. Shortman, K. Mouse and human dendritic cell subtypes / K. Shortman, Y.J. Liu // *Nat Rev Immunol.* – 2002. – V. 2, №3. – P. 151-161.
193. Siefken, R. CD28-mediated activation of resting human T cells without costimulation of the CD3/TCR complex / R. Siefken, R. Kurrle, R. Schwinzer // *Cell Immunol.* – 1997. – V. 176, №1. – P. 59-65.

194. Silva, M.T. Neutrophils and macrophages: the main partners of phagocyte cell systems / M.T. Silva, M. Correia-Neves // *Front Immunol.* – 2012. – V. 3. – P. 174.
195. Smith-Garvin J.E. T cell activation / J.E. Smith-Garvin, G.A. Koretzky, M.S. Jordan // *Annu Rev Immunol.* – 2009. – V. 27. – P. 591-619.
196. Stievano, L. C and CX3C Chemokines: Cell Sources and Physiopathological Implications / L. Stievano, E. Piovan, A. Amadori // *Crit Rev Immunol.* – 2004. – T. 24. – № 3.
197. Structure of a CXC chemokine-receptor fragment in complex with interleukin-8 / N.J. Skelton, C. Quan, D. Reilly, et al. // *Structure.* – 1999. – V. 7, №2. – P. 157-168.
198. Structure of the chemokine receptor CXCR1 in phospholipid bilayers / S.H. Park, B.B. Das, F. Casagrande, et al. // *Nature.* – 2012. – V. 491, №7426. – P. 779-783.
199. Structure, genomic organization, and expression of the human interleukin-8 receptor B gene / H. Sprenger, A.R. Lloyd, L.L. Lautens, et al. // *J Biol Chem.* – 1994. – V. 269, №15. – P. 11065-11072.
200. Sun, J.C. Immunological memory within the innate immune system / J.C. Sun, S. Ugolini, E. Vivier // *EMBO J.* – 2014. – V. 33, №12. – P. 1295-1303.
201. Surova, E. The role of BCR isotype in B-cell development and activation / E. Surova, H. Jumaa // *Adv Immunol.* – 2014. – V. 123. – P. 101-139.
202. Takami, M. Signaling pathways involved in IL-8-dependent activation of adhesion through Mac-1 / M. Takami, V. Terry, L. Petruzzelli // *J Immunol.* – 2002. – V. 168, №9. – P. 4559-4566.
203. Tau, G. Biologic functions of the IFN- $\gamma$  receptors / G. Tau, P. Rothman // *Allergy.* – 1999. – V. 54, №12. – P. 1233-1251.
204. The chemokine receptors CXCR1 and CXCR2 couple to distinct G protein-coupled receptor kinases to mediate and regulate leukocyte functions / S.K. Raghuwanshi, Y. Su, V. Singh et al. // *J Immunol.* – 2012. – V. 189, №6. – P. 2824-2832.



205. The collectins in innate immunity / J. Epstein, Q. Eichbaum, S. Sheriff, et al. // *Curr Opin Immunol.* – 1996. – V. 8, №1. – P. 29-35.
206. The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting / M. Merad, P. Sathe, J. Helft, et al. // *Annu Rev Immunol.* – 2013. – V. 31. – P. 563-604.
207. The effect of antigen presenting cells on the cytokine profiles of stable and reactional lepromatous leprosy patients / I. Nath, N. Vemuri, A.L. Reddi, et al. // *Immunol Lett.* – 2000. – V. 75, №1. – P. 69-76.
208. The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis / R.M. Strieter, P.J. Polverini, S.L. Kunkel, et al. // *J Biol Chem.* – 1995. – V. 270, №45. – P. 27348-27357.
209. The functional significance behind expressing two IL-8 receptor types on PMN / R. Stillie, S.M. Farooq, J.R. Gordon, et al. // *J Leukoc Biol.* – 2009. – V. 86, №3. – P. 529-543.
210. The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions / K. Nelms, A.D. Keegan, J. Zamorano, et al. // *Annu Rev Immunol.* – 1999. – V. 17, №1. – P. 701-738.
211. The neutrophil as a cellular source of chemokines / P. Scapini, J.A. Lapinet-Vera, S. Gasperini, et al. // *Immunol Rev.* – 2000. – V. 177, №1. – P. 195-203.
212. The pro-and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6 / J. Scheller, A. Chalaris, D. Schmidt-Arras, et al. // *Biochim Biophys Acta.* – 2011. – V. 1813, №5. – P. 878-888.
213. The role of dendritic cells in shaping the immune response / C.J. Howard, B. Charleston, S.A. Stephens, et al. // *Anim Health Res Rev.* – 2004. – V. 5, №2. – P. 191-195.
214. Thery, C. The cell biology of antigen presentation in dendritic cells / C. Thery, S. Amigorena // *Opin. Immunol.* – 2001. – V. 13, №1. – P. 45-51.
215. T-lymphocyte chemotaxis to IL-8 in patients with psoriasis in vitro / M. Zheng, G. Sun, S. Cai, et al. // *Chin Med J.* – 1998. – V. 111, №2. – P. 166-168.

216. Trafficking of APC from liver allografts of Flt3L-treated donors: augmentation of potent allostimulatory cells in recipient lymphoid tissue is associated with a switch from tolerance to rejection / R.J. Steptoe, W. Li, F. Fu, et al. // *Transpl. Immunol.* – 1999. V. 7, №1. – P.51-57.
217. Transactivation of vascular endothelial growth factor receptor-2 by interleukin-8 (IL-8/CXCL8) is required for IL-8/CXCL8-induced endothelial permeability / M.L. Petreaca, M. Yao, Y. Lui, et al. // *Mol Biol Cell.* – 2007. – V. 18, №12. – P. 5014-5023.
218. Unchanged NADPH oxidase activity in Nox1-Nox2-Nox4 triple knockout mice: what do NADPH-stimulated chemiluminescence assays really detect? / F. Rezende, O. Löwe, V. Helfinger, et al. // *Antioxid Redox Signal.* – 2016. – V. 24, №7. – P. 392-399.
219. 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 // *Annu Rev Immunol.* – 2013. – V. 31. – P. 317-343.
220. Venet, F. Clinical review: flow cytometry perspectives in the ICU-from diagnosis of infection to monitoring of injury-induced immune dysfunctions / F. Venet, A. Lepape, G. Monneret // *Crit Care.* – 2011. – V. 15, №5. – P. 231.
221. Venkatakrishnan, G. Chemokine receptors CXCR-1/2 activate mitogen-activated protein kinase via the epidermal growth factor receptor in ovarian cancer cells / G. Venkatakrishnan, R. Salgia, J.E. Groopman // *J Biol Chem.* – 2000. – V. 275, №10. – P. 6868-6875.
222. Venkatakrishnan, G. Chemokine receptors CXCR-1/2 activate mitogen-activated protein kinase via the epidermal growth factor receptor in ovarian cancer cells / G. Venkatakrishnan, R. Salgia, J.E. Groopman // *J Biol Chem.* – 2000. – V. 275, №10. – P. 6868-6875.
223. Walport, M.J. Complement. First of two parts / M.J. Walport // *N Engl J Med.* – 2001. – V. 344. – P. 1058-1066.
224. Walport, M.J. Complement. Second of two parts / M.J. Walport // *N Engl J Med.* – 2001. – V. 344. – P. 1140-1144.

225. Waugh, D.J.J. The interleukin-8 pathway in cancer / D.J.J. Waugh, C. Wilson // Clin Cancer Res. – 2008. – V. 14, №21. – P. 6735-6741.
226. Weisheit, C.K. Dendritic cells and macrophages: sentinels in the kidney / C.K. Weisheit, D.R. Engel, C. Kurts // Clin J Am Soc Nephrol. – 2015. – P. CJN. 07100714.
227. Weninger, W. Migration and differentiation of CD8+ T cells / W. Weninger, N. Manjunath, U.H Von Andrian // Immunol Rev. – 2002. – V. 186, №1. – P. 221-233.
228. Wilson, S. The CXCR1 and CXCR2 receptors form constitutive homo- and heterodimers selectively and with equal apparent affinities / S. Wilson, G. Wilkinson, G. Milligan // J Biol Chem. – 2005. – V. 280, №31. – P. 28663-28674.
229. Zhang, J.M. Cytokines, inflammation and pain / J.M. Zhang, J. An // Int Anesthesiol Clin. 2007 – V. 45, №2. – P. 27.
230. Zhu, J. Differentiation of Effector CD4 T Cell Populations / J. Zhu, H. Yamane, W.E. Paul // Annu Rev Immunol. – 2010. – V. 28. P. – 445-489.
231. 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.
232. Ziegler-Heitbrock, L. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood / L. Ziegler-Heitbrock, P. Ancuta, S. Crowe, et al. // Blood. – 2010. – V. 116, №2. – P. e74-e80.
233. Ziegler-Heitbrock, L. The CD14+ CD16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation / L. Ziegler-Heitbrock // J Leukoc Biol. – 2007. – V. 81, №3, – P.584-592.
234. Ziegler-Heitbrock, L. Toward a refined definition of monocyte subsets / L. Ziegler-Heitbrock, Hofer T.P.J. // Front Immunol. – 2013. – V. 4.