



<https://10.34883/PI.2022.8.1.003>



Репина Л.А., Потапнев М.П.✉, Гущина Л.М.

Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий, Минск, Беларусь

Особенности иммунофенотипа и функциональной активности «мобилизованных» нейтрофильных гранулоцитов, используемых для переливания

Конфликт интересов: не заявлен.

Работа выполнена при поддержке гранта № 20190801 Министерства здравоохранения Республики Беларусь.

Подана: 16.02.2022

Принята: 24.02.2022

Контакты: mpotapnev@yandex.by

Резюме

Цель. Выявить особенности иммунофенотипа и интенсивности «респираторного взрыва» нейтрофильных гранулоцитов, полученных от доноров гранулоцитов, «стимулированных» введением гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (Г-КСФ) и дексаметазона.

Материалы и методы. Иммунофенотип клеток и интенсивность «респираторного взрыва» анализировали методом проточной цитометрии.

Результаты. По содержанию клеток (%) и степени экспрессии на клетках (СИФ – средняя интенсивность флуоресценции) CD15, CD11b, CD66b, CD33 сравниваемые популяции нейтрофильных гранулоцитов практически не различались. На нейтрофильных гранулоцитах, полученных от «стимулированных» доноров гранулоцитов, по сравнению с контролем (клеток доноров крови) выявлено в 2 раза более низкое значение СИФ для CD16, CD10 и CD182; в 3–3,5 раза более высокое значение СИФ для CD62L и CD64; в 2 раза более высокое значение СИФ для CD177+. Показатели спонтанного и индуцированного форбол миристат ацетатом «кислородного взрыва» были соответственно в 2 раза выше у нейтрофильных гранулоцитов «стимулированных» доноров по сравнению с контролем.

Заключение. Установлены некоторые отличия иммунофенотипа и активности «респираторного взрыва» у нейтрофильных гранулоцитов, полученных от доноров, стимулированных Г-КСФ и дексаметазоном, по сравнению с клетками крови здоровых лиц.

Ключевые слова: нейтрофильные гранулоциты, «стимулированные» доноры, иммунофенотип, респираторный взрыв

Repina L., Potapnev M.✉, Hushchyna L.

Republican Scientific-Practical Center of Transfusiology and Medical Biotechnologies,
Minsk, Belarus

Features of the Immunophenotype and Functional Activity of Mobilized Human Neutrophil Granulocytes Used for Transfusion

Conflict of interest: nothing to declare.

The work was supported by grant no. 20190801 of the Ministry of Health of the Republic of Belarus.

Submitted: 16.02.2022

Accepted: 24.02.2022

Contacts: mpotapnev@yandex.by

Abstract

Purpose was to identify deviations in the immunophenotype and intensity of the 'respiratory burst' of neutrophil granulocytes obtained from granulocyte donors 'stimulated' by the administration of granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) and dexamethasone.

Materials and methods. The immunophenotype of cells and the intensity of the 'respiratory explosion' were analyzed by flow cytometry.

Results. Cell content (%) and the degree of expression on the cells (MFI- mean fluorescence intensities) of CD15, CD11b, CD66b, CD33 in compared populations of neutrophil granulocytes practically did not differ. Neutrophil granulocytes obtained from 'stimulated' granulocyte donors were found to have a 2-fold lower MFI value for CD16, CD10 and CD182 compared with the control (blood donor cells); a 3–3.5 times higher MFI value for CD62L and CD64; a 2-fold higher MFI value for CD177+. The values of spontaneous and respiratory 'burst induced' by phorbol myristate acetate were 2-fold higher in neutrophil granulocytes of stimulated donors compared with the control.

Conclusion. The existence of some differences in the immunophenotype and the activity of the 'respiratory burst' in neutrophil granulocytes obtained from donors stimulated by G-CSF and dexamethasone was established.

Keywords: neutrophil granulocytes, "stimulated" donors, immunophenotype, respiratory burst

■ ВВЕДЕНИЕ

Среди компонентов крови, используемых для переливания, нейтрофильные гранулоциты (гранулоциты) занимают особое место. Это связано с тем, что максимальное количество гранулоцитов, которое можно получить из дозы крови, составляет $0,5\text{--}1,0 \times 10^9$ клеток, в то время как терапевтическая доза для пациента составляет $2,0\text{--}8,0 \times 10^{10}$ клеток на одно переливание, всего на курс – 2–6 переливаний [1–5]. Поэтому существуют две общепринятые тактики получения гранулоцитов для переливания [6]. Одна из них предполагает объединение («пулирование») совместимых



по АВ0 фракций гранулоцитов лейкотромбоцитарного слоя, получаемого при центрифугировании периферической крови от 10–12 доноров крови. Вторая, более распространенная тактика предполагает получение на автоматических сепараторах гранулоцитов от одного донора, «стимулированного» введением гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (Г-КСФ) и кортикостероида (дексаметазона). Введение донору Г-КСФ и дексаметазона вызывает «мобилизацию» в периферическое русло нейтрофильных гранулоцитов из костного мозга в количествах, обеспечивающих возможность их получения с помощью автоматического афереза в терапевтической дозе. Считается, что «мобилизованные» гранулоциты обладают теми же бактерицидными и фунгицидными свойствами, что и нормальные гранулоциты периферической крови, что подтверждено эффективностью их клинического применения в комплексном лечении инфекционных осложнений у пациентов с нейтропенией [3, 7, 8]. В то же время допускается, что экспрессия ряда иммунофенотипических маркеров и функций может быть изменена в связи с выходом новых субпопуляций «мобилизованных» гранулоцитов из костного мозга, что требует своей оценки и анализа.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Определить особенности иммунофенотипа «мобилизованных» нейтрофильных гранулоцитов, полученных для переливания от доноров крови, «стимулированных» введением Г-КСФ и дексаметазона.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Гранулоциты для переливания получали от доноров крови, состоявших на учете в Республиканском научно-практическом центре трансфузиологии и медицинских биотехнологий (РНПЦ ТиМБ) и Республиканском научно-практическом центре детской онкологии, гематологии и иммунологии (РНПЦ ДОГИ). Выделение «мобилизованных» гранулоцитов проводили в соответствии с требованиями качества, определенными приказом Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 6 апреля 2018 г. № 325 «Об утверждении Перечня требований по безопасности и качеству крови, ее компонентов, заготавливаемых от доноров или производимых различными методами из крови доноров и предназначенных для оказания медицинской помощи и иных целей», как описано ранее [8]. В качестве контроля использовали образцы периферической крови доноров крови РНПЦ ТиМБ, стабилизированные цитратом натрия.

Иммунофенотипическую характеристику гранулоцитов проводили методом прямой иммунофлуоресценции на проточном цитофлуориметре BD FACSCantoll (BectonDickinson, США), программное обеспечение BD FACSDiva v7.0. В качестве маркеров использовали моноклональные антитела (МКА), меченные флуорохромами: CD16-PE-Cy7, CD66b-APC, CD58-APC производства eBioscience, Invitrogen; CD11b-FITC, CD11b-PE – BioLegend; CD15-PE, CD13-PerCP-Cy5.5, CD33-PerCP-Cy5.5 – BeckmanCoulter; CD182-PE – BDPharmingen; CD64-FITC, CD10-PE, CD62L-PE, CD177-PE – Exbio.

При иммунофенотипировании методом проточной цитометрии для выделения области нейтрофилов были выбраны параметры бокового и прямого светорассеивания для определения области гранулоцитов (FSC/SSC), отсекая из анализа последовательным гейтированием по CD16 возможную примесь эозинофилов и моноцитов (рис. 1).

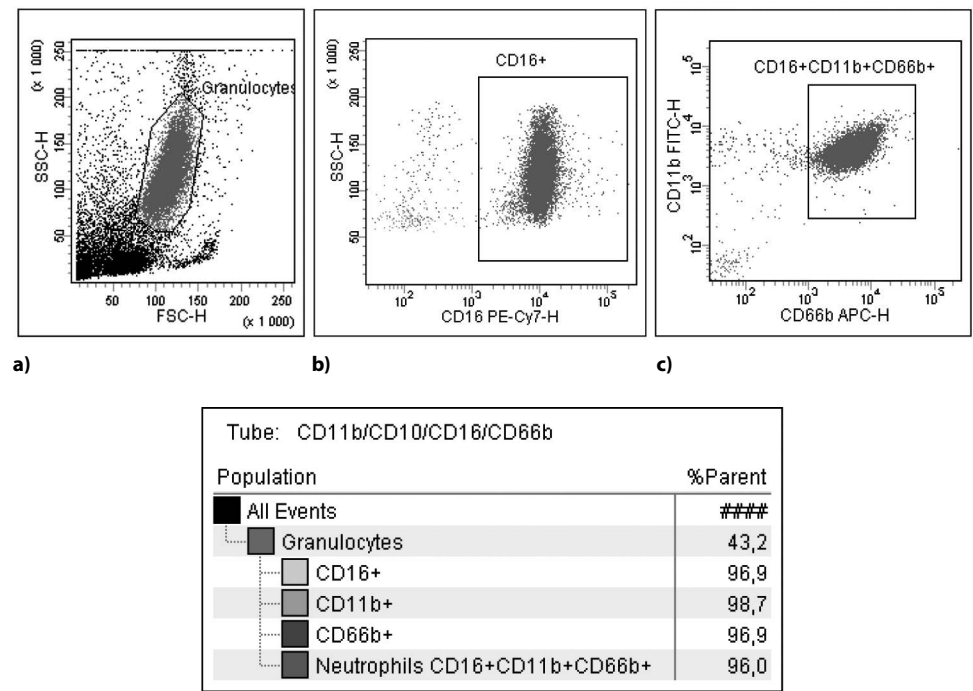


Рис. 1. Гейтирование нейтрофильных гранулоцитов для последующего иммунофенотипического анализа методом проточной цитометрии: а) выделение области гранулоцитов по FSC/SSC; б) выделение популяции CD16+ нейтрофилов; в) определение области CD16+CD11b+CD66b+ нейтрофилов

Fig. 1. Gating of neutrophil granulocytes for subsequent immunophenotypic analysis by flow cytometry: a) isolation of the granulocyte region by FSC/SSC; b) isolation of the population of CD16+ neutrophils; c) detection of the region of CD16+CD11b+CD66b+ neutrophils

Функциональную активность гранулоцитов оценивали по «респираторному взрыву». Для этого образцы клеток инкубировали с поликлональным активатором форбол миристат ацетатом (ФМА) при +37 °С или без него. В ответ на стимуляцию в гранулоцитах активируется NADPH-оксидаза, которая вызывает продукцию активных форм кислорода (АФК). Для детектирования на проточном цитометре к образцам клеток добавляли дигидрорадамин 123 (DHR123), который, окисляясь под действием АФК, превращается в родамин-123, флуоресцирующий в зеленой части спектра с максимумом около 529 нм (канал FITC) [9]. «Респираторный взрыв» оценивали по показателям % активированных гранулоцитов, а также по значению средней интенсивности флуоресценции (СИФ) в условных единицах (рис. 2).

Анализ данных иммунофенотипирования полученных образцов проводился при помощи программного обеспечение BD FACSDiva v7.0.

Статистическая обработка данных осуществлялась с помощью прикладного пакета программы Statistica 10.0, включая общепринятые методы параметрического и непараметрического анализа. Полученные данные представлены в виде средних значений с ошибкой среднего значения ($M \pm Se$). Для установления различий между

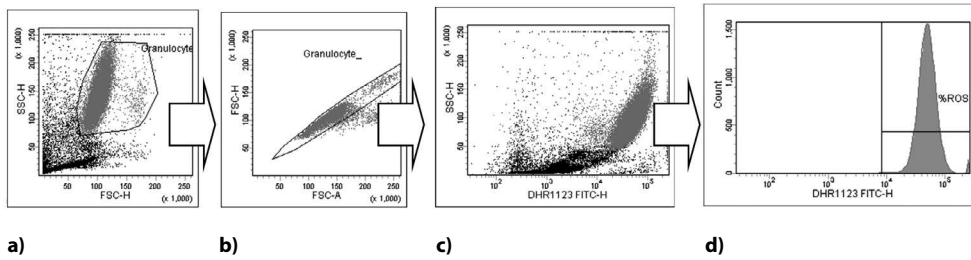


Рис. 2. Гейтирование нейтрофильных гранулоцитов для оценки активных форм кислорода при «респираторном взрыве»: а) выделение области гранулоцитов по FCS/SSC; б) гейтирование от агломератов клеток; с, д) область гранулоцитов, активированных форбол миристат ацетатом
Fig. 2. Gating of neutrophil granulocytes to assess reactive oxygen species in a "respiratory burst": а) isolation of the granulocyte region by FCS/SSC; б) gating from cell agglomerates; с, д) the area of granulocytes activated by phorbol myristate acetate

двумя исследуемыми группами использовали t-критерий Стьюдента для сравнения независимых выборок, статистический уровень значимости $p < 0,05$.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Нами были проведены сравнительные исследования иммунофенотипа нейтрофилов периферической крови «мобилизованных» гранулоцитов, полученных от «стимулированных» доноров крови, и контроля – гранулоцитов периферической крови доноров крови. Для анализа популяции нейтрофилов методом проточной цитометрии использовали отдельно взятые или комбинации МКА к поверхностным маркерам CD15, CD16, CD11b, CD66b. Данные маркеры определяют на поверхности клетки независимо от ее активации, локализации и участия в физиологических/патологических процессах [10, 11]. На рис. 3 и в таблице представлены результаты сравнения иммунофенотипа типичных образцов нейтрофильных гранулоцитов, полученных от здоровых доноров крови и от «стимулированных» доноров гранулоцитов. Гранулоциты, полученные методом афереза от «стимулированных» доноров, не отличались от нейтрофильных гранулоцитов периферической крови здоровых лиц по экспрессии маркеров дифференцировки CD15, CD11b, CD66b, CD33, а также CD58 и однородны по интенсивности флуоресценции антигенов в популяции клеток. На «мобилизованных» нейтрофильных гранулоцитах по сравнению с контролем в 2 раза снижена интенсивность экспрессии (СИФ) CD16, CD10 и CD182; в 3–3,5 раза выше значение СИФ для CD62L и CD64 (FcγRI); в 2 раза выше значение СИФ CD177^{hi}. Аналогичные данные получены и другими авторами [12]. Снижение процентного содержания CD10+–клеток среди «мобилизованных» нейтрофильных гранулоцитов в сравнении с клетками контроля может быть связано с тем, что экспрессия CD10 характерна только для зрелых сегментоядерных нейтрофилов. «Мобилизованные» нейтрофильные гранулоциты могут иметь сниженное до 5% содержание CD10+–нейтрофилов, а также интенсивность CD16 на них [13]. Снижение значения СИФ для CD16 на «мобилизованных» нейтрофильных гранулоцитах отмечали и другие авторы [14]. Увеличение интенсивности CD177+–клеток среди «мобилизованных» нейтрофильных гранулоцитов ассоциируется с возрастанием миграционной

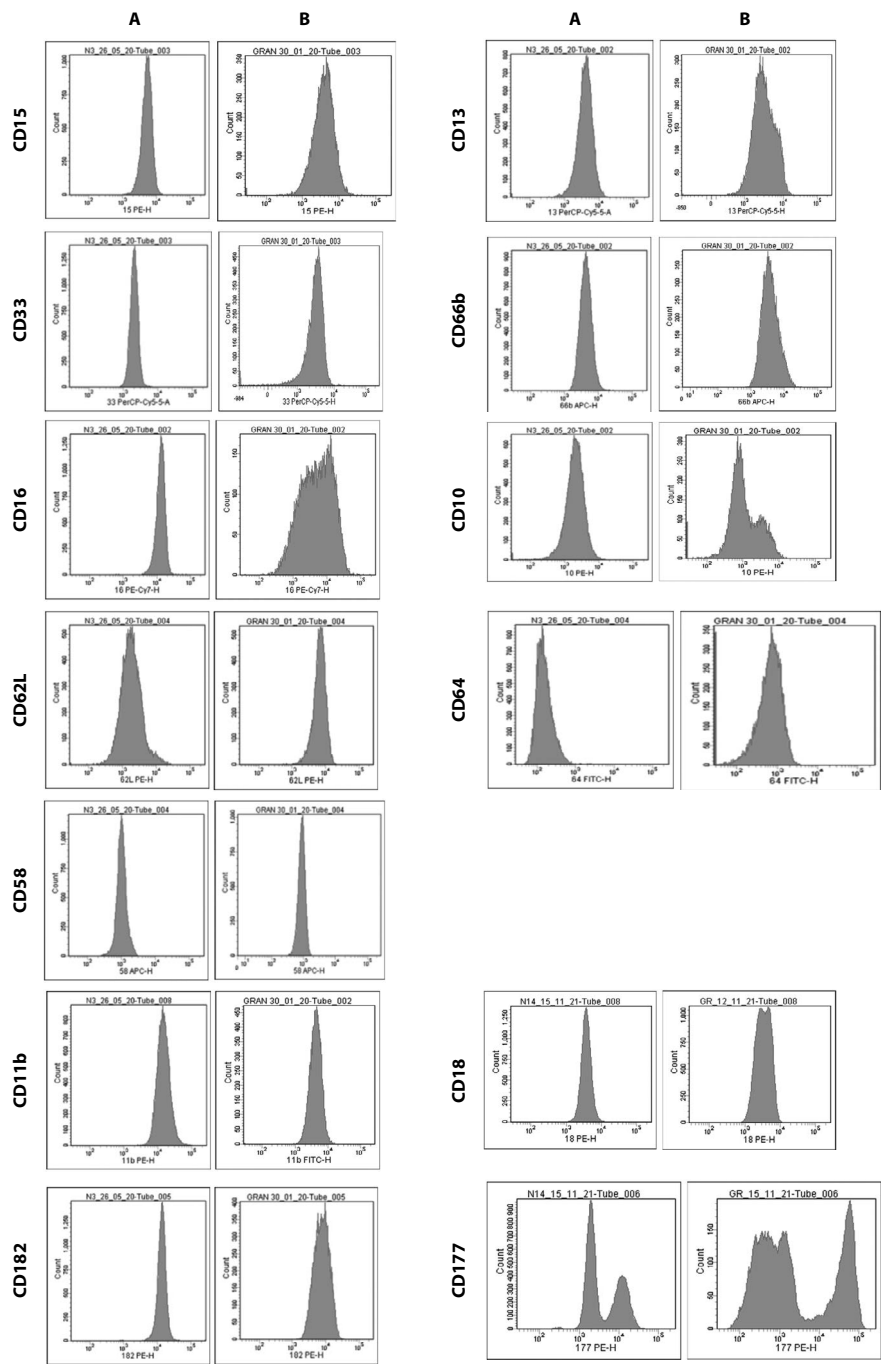


Рис. 3. Гистограммы экспрессии клеточных маркеров нейтрофильных гранулоцитов: А – доноров периферической крови; В – «стимулированных» доноров гранулоцитов (представлены типичные случаи)

Fig. 3. Histograms of expression the cellular markers of neutrophil granulocytes: A – peripheral blood donors; B – 'stimulated' donors of granulocytes (typical cases are presented)



активности клеток под действием стимулирующих индукторов, в том числе за счет взаимодействия с эндотелиальными клетками [15]. Общие изменения иммунофенотипа «мобилизованных» нейтрофильных гранулоцитов протекают на фоне 5–7-кратного увеличения количества этих клеток в периферической крови донора [2, 3, 8]. Изменение СИФ иммунофенотипических маркеров «мобилизованных» гранулоцитов в большей степени, чем % положительных клеток, отражало появление субпопуляций нейтрофильных гранулоцитов с различной интенсивностью экспрессии маркеров.

Количественная характеристика экспрессии основных фенотипических маркеров нейтрофильных гранулоцитов периферической крови «стимулированных» доноров гранулоцитов и доноров крови
Quantitative characterization of the main phenotypic markers' expression on neutrophilic granulocytes from peripheral blood of 'stimulated' granulocyte donors and blood donors

Основные маркеры	Содержание (%) и уровень экспрессии (СИФ) основных маркеров нейтрофильных гранулоцитов периферической крови				p
	«мобилизованных» (n=15)		контроль (n=10)		
	%	СИФ (y.e.)	%	СИФ (y.e.)	
CD16+	97,98±0,53	7468±505	97,08±1,37	18759±2231	0,45 0,001*
CD16+CD11b+	99,91±0,06	4344±1130	100±0,04	2900±442	0,49 0,57
CD16+CD13+	99,75±0,18	3625±604	99,55±0,37	3872±746	0,58 0,81
CD16+CD15+	98,67±0,48	4384±352	99,65±0,25	8537±1144	0,21 0,001*
CD16+CD66b+	99,02±0,73	6466±1715	99,41±0,23	5960±708	0,73 0,85
CD16+CD33+	98,89±0,97	2201±290	99,98±0,017	2776±506	0,47 0,31
CD16+CD10+	49,56±3,1	2839±195	99,12±0,38	4850±973	0,001* 0,01*
CD16+CD64+	96,51±1,36	700±40	99,82±0,065	171±15	0,13 0,001*
CD16+CD62L+	99,94±0,03	7827±447	94,65±5,11	2614±306	0,11 0,001*
CD16+CD58+	99,92±0,05	1310±85	96,78±1,37	1299±111	0,002* 0,94
CD16+CD182+	99,95±0,027	6797±663	99,75±0,12	14234±1398	0,03* 0,003*
CD16+CD177+hi	56,22±5,57	38448±3360	56,37±6,99	17176±2060	0,9 <0,001*
CD16+CD172+	99,98±0,019	1498±107	99,46±0,48	1672±110	0,31 0,18
CD16+CD170+	99,96±0,025	6513±742	98,76±1,15	6747±1460	0,094 0,7
CD16+CD18+	99,37±0,24	1066±147	99,73±0,18	3152±525	0,27 0,0006*

Примечание: * достоверно значимые различия.

Анализ показателей средней интенсивности флуоресценции маркеров широко используется в сравнительных исследованиях [12, 14]. Так, в отличие от нормального (моногогенного) распределения в контрольной группе, экспрессия FcγRIII (CD16) на «мобилизованных» нейтрофильных гранулоцитах характеризовалась сниженной экспрессией и разделением CD16+ клеток на две субпопуляции с высокой и средней степенью экспрессии маркера (рис. 4). На долю CD16dim субпопуляции нейтрофилов приходилось $56,9 \pm 1,02\%$ клеток с СИФ = 3265 ± 170 у.е.; клеток с СИФ = 3265 ± 170 у.е.; для CD16hi – $44,82 \pm 1,027\%$ клеток с СИФ = 13608 ± 619 у.е. ($n=23$) ($p<0,001$). Для CD16dim нейтрофилов было характерно снижение степени экспрессии CD13+ (в 4 раза) и CD10+ (в 8 раз), что свидетельствует о присутствии менее зрелых нейтрофилов. Интенсивность экспрессии CD33, CD11b, CD15, CD64, CD58 не различалась среди CD16dim и CD16hi субпопуляций нейтрофильных гранулоцитов от «стимулированных» доноров и доноров крови.

Полученные данные укладываются в общепринятое представление о том, что при «стимуляции» доноров Г-КСФ и дексаметазоном из их костного мозга выбрасываются в периферическую кровь как зрелые (около 80%), так и незрелые клетки (около 20%) нейтрофильные гранулоциты [16].

Полученные данные указывают на наличие среди нейтрофильных гранулоцитов, полученных методом афереза от «стимулированных» доноров, популяции незрелых

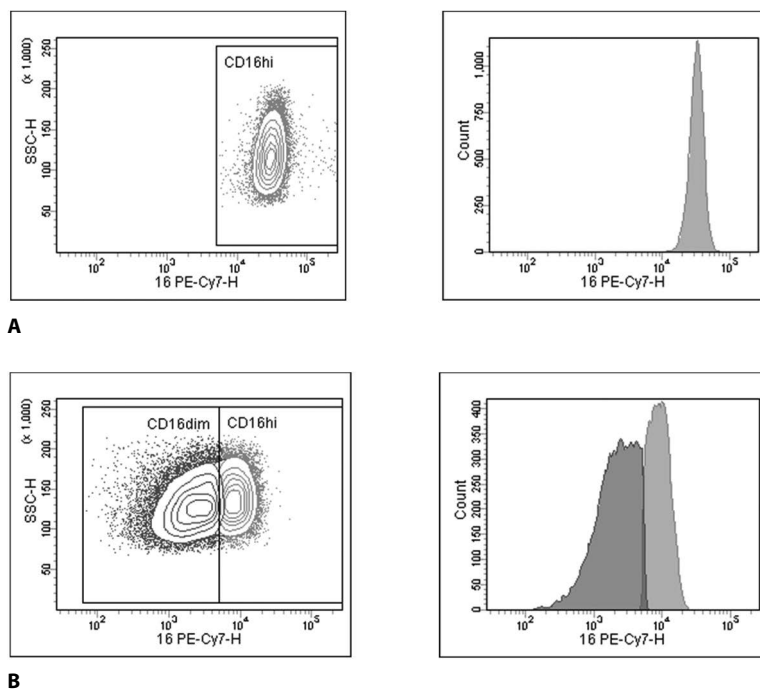


Рис. 4. Экспрессия FcγRIII (CD16) на нейтрофильных гранулоцитах: А – доноров крови; В – «стимулированных» доноров гранулоцитов
Fig. 4. Expression of FcγRIII (CD16) on neutrophil granulocytes: A – blood donors; B – ‘stimulated’ granulocyte donors



нейтрофилов, мигрировавших из костного мозга в периферическую кровь (CD10-негативных CD62L-позитивных клеток), и активированных нейтрофилов (CD64+ клеток) в результате введения донорам дексаметазона и Г-КСФ.

Нейтрофилы – достаточно пластичный тип клеток. Зрелые нейтрофилы человека демонстрируют характерное сегментоядерное ядро и высокую поверхностную экспрессию CD16 (FcγRIII), CD62L (L-селектин) и CD10 (нейтральная эндопептидаза), а также специфичные маркеры – CD15 и CD66b. Маркер дифференцировки и активации CD15 обнаруживается на всех субпопуляциях нейтрофилов и вместе с CD66b появляется на стадии промиелоцитов – это основные маркеры линии нейтрофилов. CD16 – маркер, связанный с фагоцитарной способностью клеток, начинает экспрессироваться на стадии метамиелоцитов с нарастающей экспрессией на палочкоядерных и сегментоядерных нейтрофилах, в то время как маркер активации CD11b появляется на стадии миелоцитов и далее остается относительно стабильным. Для периферической крови здоровых лиц (доноров крови) характерна однородная популяция зрелых нейтрофилов с фенотипом CD11b+CD16^{hi}CD62L^{hi}CD10^{hi}. В периферической крови «стимулированных» доноров после введения Г-КСФ появляются дополнительные популяции, включая незрелые клетки (CD11b^{low}CD16^{low}CD62L^{hi}CD10^{low}) и клетки с фенотипом активированных зрелых клеток (CD11b^{hi}CD16^{hi}CD62L^{low}CD10+) [13, 17–19]. Незрелые нейтрофилы, высвобождаемые из костного мозга после стресса, включая стимуляцию Г-КСФ и дексаметазоном, представляют собой CD16^{low} CD10^{low}-популяцию с палочковидной морфологией ядра. Также незрелые нейтрофилы демонстрируют повышенный уровень CD33 (Siglec-3) и более низкий CXCR2 (CD182). При активации мобилизация внутриклеточных гранул переносит на поверхность нейтрофилов сформированные мембранные белки, к которым относятся CD66b, α- и β-цепи интегрина β2 – CD11b / CD18 (Mac-1) и CD177 [13, 19].

После выявления особенностей фенотипа нейтрофильных гранулоцитов, полученных от «стимулированных» доноров, нами была оценена их функциональная активность. Как видно из рис. 5 и 6, нейтрофильные гранулоциты, полученные от «стимулированных» доноров методом афереза, имеют повышенный фоновый уровень активации (по показателю СИФ). После воздействия ФМА *in vitro* нейтрофильные гранулоциты «стимулированных» доноров и контроля повышали уровень активации в 3 и 4 раза соответственно, то есть обе популяции клеток функционально полноценны. При этом уровень показателей спонтанного и индуцированного «кислородного взрыва» был в 2 раза выше в популяции нейтрофильных гранулоцитов, полученных методом афереза от «стимулированных» доноров гранулоцитов, по сравнению с контролем.

Выявленные некоторые различия между уровнями ФМА-индуцированной активации нейтрофильных гранулоцитов, полученных от «стимулированных» доноров гранулоцитов и доноров крови, возможно, связаны с дополнительным появлением среди «мобилизованных» нейтрофильных гранулоцитов, полученных от «стимулированных» доноров, функциональной(ых) субпопуляции(й) популяции клеток с повышенным уровнем ответа на воздействие *in vitro* ФМА. При этом, как отмечалось ранее, функциональная активность нейтрофильных гранулоцитов не связана прямо с определенными субпопуляциями клеток, а определяется типом воздействующего индуктора [18–20]. Учитывая первостепенную роль функциональной активности, другие авторы оценивали ее у «мобилизованных» гранулоцитов. Так, Drewniak A.

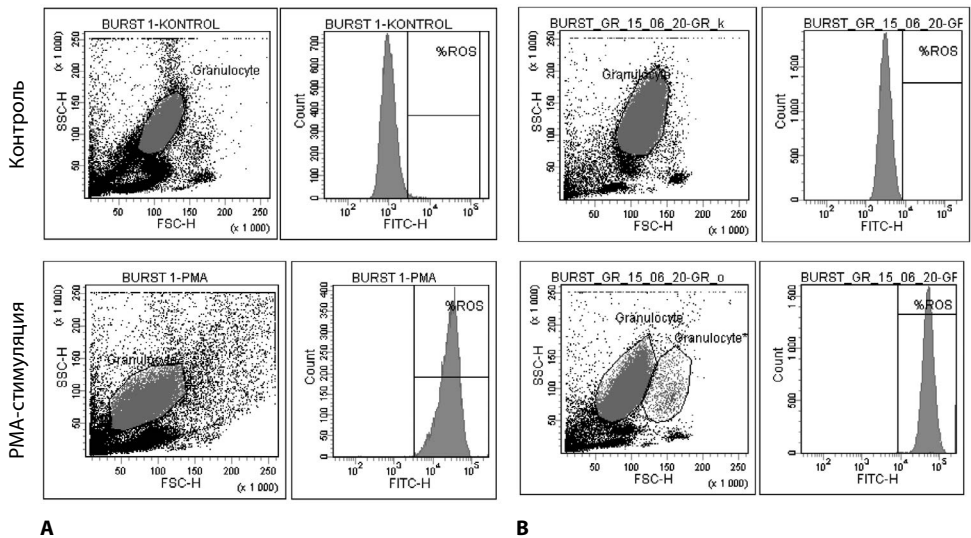


Рис. 5. Анализ методом проточной цитометрии «кислородного взрыва» нейтрофилов:
A – донора крови, B – «стимулированного» донора гранулоцитов (приведены результаты
типичного эксперимента)
Fig. 5. Analysis of the 'respiratory burst' of neutrophils by flow cytometry: A – blood donor,
B – 'stimulated' granulocyte donor (the results of a typical experiment are shown)

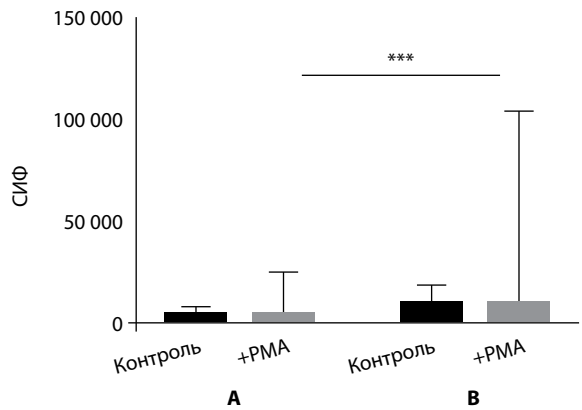


Рис. 6. Зависимость уровня спонтанного (контроль) и индуцированного фобол миристат
ацетатом (+PMA) «кислородного взрыва» нейтрофильных гранулоцитов от источника получения:
A – доноров крови (n=14), B – «стимулированных» доноров гранулоцитов (n=7)

Примечание: *** статистически значимые различия при $p < 0.001$.

Fig. 6. Dependence of the level of spontaneous (control) and phorbol myristate acetate (+PMA) induced
'oxygen explosion' of neutrophil granulocytes on the cell source: A – blood donors (n=14),
B – 'stimulated' donors of granulocytes (n=7)

Note: *** statistically significant differences at $p < 0.001$.



с соавт. не нашли различий между гранулоцитами от здоровых лиц и от «мобилизованных» доноров в тестах клеточной адгезии к эндотелиальным клеткам HUVEC, миграции через монослой HUVEC клеток, способности убивать *E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans*, *A. fumigatus* [12]. Van de Geer A. с соавт. не нашли существенных различий нейтрофильных гранулоцитов, полученных из периферической крови здоровых лиц – доноров крови, и «мобилизованных» нейтрофильных гранулоцитов, полученных от «стимулированных» доноров гранулоцитов. Эти популяции гранулоцитов не отличались функционально по показателям прилипания к пластику и хемотаксису (несколько снижен в «мобилизованных» гранулоцитах в ответ на интерлейкин-8). «Мобилизованные» гранулоциты имели одинаковую антибактериальную активность в отношении *E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans*, *A. fumigatus*, но сниженную на 40–50% способность убивать *C. albicans* [14]. Основываясь на наших данных, это может быть связано с некоторым снижением интенсивности «респираторного» взрыва этих клеток, так как АФК-зависимый путь является ведущим в способности нейтрофильных гранулоцитов убивать *C. albicans* [21].

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Трансфузия донорских гранулоцитов была и остается средством выбора при лечении тяжелых инфекционных осложнений пациентов с онкологическими/онкогематологическими заболеваниями, в том числе после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток [22]. Существующие дебаты вокруг их клинической эффективности связаны прежде всего с недостаточностью доз перелитых гранулоцитов для пациента. Наши исследования, а также и других авторов показали, что при этом «мобилизованные» нейтрофильные гранулоциты, полученные от «стимулированных» доноров, могут иметь иммунофенотипические и в меньшей степени функциональные отличия от нейтрофильных гранулоцитов периферической крови здоровых лиц – доноров крови. Это подтверждает положение о гетерогенности субпопуляций нейтрофильных гранулоцитов, у которых иммунофенотипические признаки и функции могут варьировать, особенно в условиях их стимуляции и мобилизации.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Kalinin N.N. Collection of concentrate of leukocytes (neutrophils). Clinical Application. Vorobiev A.I., editor. *Essays on industrial and clinical transfusiology*. Moscow: Nyudiamed; 2006; 231–235. (in Russian)
2. Strauss R.G. (2015) Neutrophil/granulocyte transfusions collected from G-CSF+ dexamethasone-stimulated donors. *Curr. Opin. Hematol.*, 22: 565–567. DOI: 10.1097/MOH.0000000000000189
3. Nygell U.A., Sollen-Nilsson A., Lundahi J. (2015) Eighteen years experience of granulocyte donations – acceptable donor safety? *J. Clin. Apheresis*, 30; 265–272 DOI: 10.1002/jca.21373
4. West K.A., Gea-Banacloche J., Stroncek. et al. (2017) Granulocyte transfusions in the management of invasive fungal infections. *Brit. J. Hematol.*, 177(3): 357–374. DOI: 10.1111/bjh.14597
5. Berglund S., Wattz E., Remberger M. et al. (2019) Granulocyte transfusions could benefit patients with severe oral mucositis after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Vox sanguin.*, 114: 769–777. DOI: 10.1111/vox.12835
6. Morton S., Mijovic A., Marks D.J., et al. (2018) Use of granulocyte transfusions among haematology units in England and North Wales. *Transfusion Medicine*, 28 (3): 243–248. Available at: <https://doi.org/10.1111/tme.12542>
7. Peters C. (2009) Granulocyte transfusions in neutropenic patients: beneficial affects proven? *Vox sanguinis*, 96: 275–283. DOI: 10.1111/j.1423-0410.2008.01159.x
8. Hushchyna L., Aleinikova O., Potapnev M. et al. (2019) Neutrophilic granulocytes as blood component for transfusion. Technology of preparation and experience of clinical use for therapy of fungal infections in children with oncohematological disorders. *Hematology. Transfusiology. Eastern Europe*, 5(3): 271–280. (in Russian)
9. Savchenko A.A., Kudryavtsev I.V., Borisov A.G. (2017) Methods of estimation and the role of respiratory burst in the pathogenesis of infectious and inflammatory diseases. *Rus. J. Infection Immun.*, 7(4): 327–340. DOI: 10.15789/2220-7619-2017-4-327-340 (in Russian)

10. Lakschevitz F.S., Hassanpour S., Rubin A., et al. (2016) Identification of neutrophil surface marker changes in health and inflammation using high-throughput screening flow cytometry. *Exp. Cel. Res.*, 342(2): 200–209. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2016.03.007>
11. Fortunati E., Kazemier K.M., Grutters J.C., et al. (2009) Human neutrophils switch to an activated phenotype after homing to the lung irrespective of inflammatory disease. *Clin. Exp. Immunol.*, 155: 559–566. DOI: 10.1111/j.1365-2249.2008.03791.x
12. Drewniak A., Boelens J.J., Vrieling H. et al. (2008) Granulocyte concentrates: prolonged functional capacity during storage in the presence of phenotypic changes. *Haematologica*, 93(7): 1058–1067. DOI: 10.3324/haematol.12489
13. Elghetany M.T. (2002) Surface antigen changes during normal neutrophilic development: a critical review. *Blood cells, Molecules and Diseases*, 28(2): 260–274. DOI: 10.1006/bcmd.2002.0513
14. Van de Geer A., Gazendam R.P., Tool A.T.J. et al. (2017) Characterization of buffy coat – derived granulocytes for clinical use: a comparison with granulocyte colony-stimulating factor/dexamethasone-pretreated donor-derived products. *Vox sanguinis*, 112(2): 173–182. DOI: 10.1111/vox.12481
15. Bai M., Grieshaber-Bouyer R., Wang J. et al. (2017) CD177 modulates human neutrophil migration through activation-mediated integrin and chemoreceptor regulation *Blood*, 130(19): 2092–2100. DOI: 10.1182/blood-2017-03-768507
16. Aarts C.E.M., Hiemstra I.H., van Bruggen R. et al. (2020) Different MDSC activity of G-CSF/dexamethasone mobilized neutrophils: benefits to the patients? *Front. Oncol.*, 10: art. 1110. DOI: 10.3389/fonc.2020.01110
17. Marini O., Costa S., Bevilacqua D., et al. (2017) Mature CD10+ and immature CD10- neutrophils present in G-CSF-treated donors display opposite effects on T cells, *Blood*, 129: 1343–1356 DOI: 10.1182/blood-2016-04-713206
18. Potapnev M.P., Hushchyna L.M., Moroz L.A. (2019) Human neutrophil subpopulations and functions heterogeneity in norm and pathology. *Immunologiya*, 40(5): 84–96. DOI: 10.24411/0206-4952-2019-15009 (in Russian)
19. Grieshaber-Bouyer R., Nigrovic P.A. (2019) Neutrophil heterogeneity as therapeutic opportunity in immune-mediated disease. *Front. Immunol.*, 10: art.346. DOI: 10.3389/fimmu.2019.00346
20. Miralda I., Uriarte S.M., McLeish K.R. (2017) Multiple phenotypic changes define neutrophil priming. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 7: art.217. DOI: 10.3389/fcimb.2017.00217
21. Gazendam R.P., van de Geer A., Roos D. et al. (2016) How neutrophils kill fungi. *Immunol. Rev.*, 273: 299–311. DOI: 10.1111/imr.12454
22. Gale R.P., Schiffer C.A., Lazarus H.M. (2021) Granulocyte transfusions in haematopoietic cell transplants and leukaemia: the phoenix or beating a dead horse? *Bone marrow transplant.*, 56: 2046–2049. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41409-021-01399-3>