

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Государственный научный центр Российской Федерации -
Институт медико-биологических проблем
Российской академии наук

На правах рукописи

Пономарёв Сергей Алексеевич
**Молекулярно-клеточные основы иммунного гомеостаза человека при
космическом полёте и других экстремальных воздействиях**

3.3.7. «Авиационная, космическая и морская медицина»
Диссертация на соискание ученой степени доктора медицинских наук

Научный консультант:
Орлов Олег Игоревич, доктор медицинских наук, академик РАН

Москва – 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
Актуальность темы исследования	4
Теоретическое значение.	9
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	13
1.1. Общие принципы организации и работы иммунной системы.....	15
1.2.1. Влияние температуры окружающей среды на иммунитет человека.....	20
1.2.2. Влияние давления и газового состава на иммунитет человека.....	24
1.2.3. Влияние факторов, ассоциированных с космическим полётом, на иммунную систему человека....	29
1.2.3.1. Наземные аналоговые исследования	48
1.2.3.2. Влияние гипомагнитных условий на систему иммунитета человека.....	54
1.2.3.3. Влияние моделируемой микрогравитации на иммунокомпетентные клетки in vitro	55
1.2.3.4. Миграция клеток и цитоскелетная архитектура в условиях измененной гравитации.....	59
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	61
2.1. Общие принципы организации экспериментов.....	61
2.2. Объём исследований	61
2.2. Экспериментальные условия.....	63
2.2.1. Наземный модельный эксперимент с 21-суточной “сухой” иммерсией.....	63
2.2.2. Изоляционные эксперименты	64
2.2.3. Эксперимент в глубоководном водолазном комплексе.....	66
2.2.4. Эксперимент с воздушной криосауной	68
2.2.5. Эксперимент в гипомагнитной установке “АРФА”	68
2.2.7. Полёты на Международной космической станции	74
2.3. Методы исследований.....	75
2.3.1 Проточная цитофлуориметрия	75
2.3.2. Работы с клеточными культурами.....	76
2.3.3. Мультиплексный анализ.....	78
2.3.4. Постановка ПЦР в реальном времени	78
ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	82
3.1. Особенности функционирования иммунной системы человека при кратковременном воздействии низких температур.....	82
3.2. Иммунный статус после 18-часовой экспозиции в гипомагнитных условиях (эксперимент “АРФА”)	90
3.3. Состояние иммунитета человека во время нахождения в условиях искусственной среды обитания .	97
3.3.1. Изоляционные эксперименты в гермообъекте с искусственной средой обитания различной продолжительности.....	97
3.3.1.1. 9-суточная изоляция (эксперимент “Луна-2015”).....	97

3.3.1.2. Эксперимент с 17-суточной изоляцией в гермообъекте с искусственной средой обитания (проект “SIRIUS”)	107
3.3.1.3. Эксперимент с 14-суточной изоляцией в гермообъекте (проект “ЭСКИЗ”)	120
3.3.1.4. Эксперимент со 120-суточной изоляцией в гермообъекте (проект “SIRIUS”)	135
3.3.1.5. Эксперимент с 11-суточным пребыванием в гипербарической кислородно-азотно-аргоновой среде (“Аргон-13”)	146
3.4. Молекулярно-клеточные процессы в иммунной системе человека во время моделирования эффектов микрогравитации и искусственной силы тяжести	155
3.4.1. Эксперимент с созданием ИСТ в течение часа при помощи центрифуги короткого радиуса	155
3.4.2. Эксперимент с 21-суточной “сухой” иммерсией без средств профилактики.....	165
3.5. Реакция системы иммунитета на длительные космические экспедиции на МКС	185
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	195
ВЫВОДЫ	199
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	200
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	203
Приложения	238
Приложение 1. Экспрессия генов стимулированных коктейлем лигандов TLR моноцитарных культур	238
Приложение 2. Синтез цитокинов в стимулированных лигандами TLRs в 24-часовых культурах моноцитов.	239

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

В классическом определении, иммунную систему человека можно разделить на две основные части: врождённый иммунитет, иначе именуемый системой естественной резистентности, и адаптивный или приобретённый иммунитет. Каждая из частей иммунитета в свою очередь состоит из клеточных и гуморальных составляющих (Parkin J et al 2001). Понимание роли иммунной системы в норме и патологии кардинально отличается от точки зрения, преобладающей чуть более 20 лет назад. В то время основное внимание уделялось способности иммунной системы различать “своё” от “чужого” и защищать организм преимущественно от внешних инфекционных агентов, таких как вирусы и патогенные микроорганизмы различного уровня организации (McComb S et al, 2019). Работы последних десятилетий убедительно показали, что роль иммунной системы не ограничивается только защитой организма, но и распространяется на развитие, гомеостаз и восстановление тканей других физиологических систем организма. Кроме того, различные типы клеток, которые обычно не считаются частью иммунной системы, например фибробласты, миоциты, эндотелиальные клетки и др., взаимодействуют с иммунокомпетентными клетками, принимая непосредственное участие в функционировании системы иммунитета (Satter S., 2017). Именно поэтому система иммунитета представляет собой одну из самых сложноорганизованных многоуровневых физиологических систем организма человека, которая состоит из множества различных клеточных и гуморальных компонентов, обладающих определёнными функциями и находящихся в постоянном динамическом взаимодействии между собой, а также с другими физиологическими системами организма в норме и патологии, включая нейроэндокринную (Dantzer R., 2018), опорно-двигательную (Xue B, et al, 2020, Walsh MC et al 2018, De Paere B., 2020, Forcina L., et al 2019), выделительную (Rucker J, 2018), сердечно-сосудистую (Vinh A et al., 2019, Swirski F et al, 2018), дыхательную (Wirsching E et al 2020) и пищеварительную (Yang X et al. 2020). На сегодняшний день трудно назвать физиологический или патологический процесс в организме человека, в котором напрямую или опосредованно не принимала бы участие иммунная система. Являясь важным интегративным звеном, иммунная система одной из первых физиологических систем реагирует на изменение гомеостаза организма человека (Stucian B et al 2018). Изменения в иммунной системе могут быть вызваны инфекционными агентами, токсинами, появлением собственных клеток с изменённой антигенной структурой, в первую очередь, клеток злокачественных образований. Перечисленные факторы приводят к формированию классического иммунного ответа с последующей элиминацией антигенной структуры. Стоит отметить, что помимо факторов, приводящих к развитию иммунного ответа, на систему иммунитета оказывает существенное

влияние ряд факторов, связанных с условиями окружающей среды, такие как температура (Brazaitis M et al, 2014), изменение газового состава (М.П. Рыкова и др 2009), вызываемый напряжёнными условиями психологический стресс (Breen M, 2016), изменение гравитационного градиента (Mann V et al. 2019), давление (Brenner I et al, 1999), радиация (Fernandez-Gonzalo R, 2017), которые не приводят к развитию классического иммунного ответа, однако способствуют изменению иммунного гомеостаза и, как следствие, изменению степени выраженности иммунного ответа (Sonnenfeld G 1999, Buchheim J-I et al, 2019).

Актуальность исследования молекулярно-клеточных процессов адаптации организма человека к различным экстремальным воздействиям объективирована в решении фундаментальных и прикладных задач. На фундаментальном уровне актуальным остаётся вопрос о природе механизмов, вызывающих изменения в работе иммунитета человека при действии неблагоприятных факторов окружающей среды, взаимодействию иммунной системы с другими физиологическими системами организма в экстремальных условиях среды обитания. На прикладном уровне чрезвычайно остро стоит вопрос о возможных границах адаптации иммунной системы, за которыми заканчиваются резервные возможности иммунной системы и начинается декомпенсация, приводящая к инфекционным заболеваниям и утрате иммунологического надзора за развитием онкологических процессов в случае снижения иммунной функции или развития синдрома гиперактивного иммунитета, приводящего к аллергическим и аутоиммунным патологиям. Не вызывает сомнения тот факт, что для разработки эффективных мер профилактики и перехода к персонализированной медицине необходимо глубоко понимать процессы, происходящие в системе иммунитета при экстремальных воздействиях, что в ближайшем будущем ляжет в основу индивидуальных программ таргетной терапии, направленной на поддержание тех звеньев иммунитета, которые претерпели наиболее выраженные негативные изменения, с целью предотвращения развития болезни или уменьшения времени её течения.

Степень разработанности темы исследования

В сложившейся ситуации роста числа заболеваний, связанных с пребыванием человека в неблагоприятных условиях, одной из главных задач “Стратегии развития медицинской науки в Российской Федерации до 2025 года” является исследование закономерностей и механизмов воздействия факторов окружающей среды (как природных, так и антропогенных) на здоровье человека. На сегодняшний день не вызывает сомнения тот факт, что экстремальные факторы окружающей среды оказывают существенное влияние на иммунный гомеостаз организма и, в конечном итоге, могут привести к развитию ряда заболеваний различной этиологии. Этим обуславливается широкий интерес мирового сообщества к изучению вопроса влияния экстремальных факторов на процессы, происходящие в иммунитете человека.

Так, в работах, рассматривающих влияние давления и различного газового состава показано, что гипербарическое действие кислорода и инертных газов *in vitro* меняют физико-химические свойства клеточной мембраны (D'Agostino DP et al 2009). Ning и др. *in vitro* и *in vivo* на мышинной модели продемонстрировали, что аргон уменьшает время заживления ран (Ning J, et al 2019). В работе М.П. Рыковой и др.. в эксперименте с девятисуточным пребыванием человека в гермокамере в условиях гипербарической нормоксической и гипоксической кислородно-азотно-аргоновой среды приводит к усилению индуцированной продукции цитокинов клетками моноцитарно-макрофагального ряда и снижению синтеза про и противовоспалительных цитокинов лимфоцитами в периферической крови (М.П. Рыкова., 2009). Tillmans F и др.. показали, что у глубоководных ныряльщиков сдвигается баланс в сторону провоспалительного иммунного ответа по сравнению с контрольной группой (Tillmans F et al 2019).

В исследованиях, изучающих влияние температурного фактора на иммунитет человека было показано, что холодное воздействие приводит к достоверным изменениям функционирования системы иммунитета, проявляющимся в повышении продукции противовоспалительных и снижении уровня провоспалительных цитокинов в сыворотке крови, что приводит авторов к заключению о противовоспалительном действии низких температур (Lubkowska A et al 2010, Lubkowska A et al, 2011). Что же касается действия высоких температур, то исследований в данной области крайне мало, однако в имеющемся материале прослеживаются тенденции к увеличению числа иммунокомпетентных клеток после недели сеансов в сухой сауне (Tomiyama C et al., 2015).

Стоит отметить, что наибольшее количество статей посвящено действию факторов космического полёта на иммунную систему. Рядом авторов было показано, что после завершения КП наблюдается ряд перестроек в иммунной системе, включающих изменение количества и функциональной активности Т- и В-лимфоцитов, существенные изменения Th1/Th2 иммунного баланса, усиления продукции IL-10, подавляющего пролиферативный ответ Т-лимфоцитов (Sonnenfeld G, 2002, Morukov B. 2011, Stowe R 2013 Рыкова М.П., 2013), были показаны изменения и в системе естественной резистентности (Пономарёв С.А. и др., 2011).

Изменения в иммунной системе возникают в ходе моделирования эффектов факторов КП. Так, в экспериментах с изоляцией были отмечены комплексные перестройки в адаптивном и врождённом компонентах иммунной системы человека, проявляющиеся в увеличении различных субпопуляций лимфоцитов, снижении гранулоцитарных лейкоцитов, повышению синтеза провоспалительных цитокинов и снижению клеток системы естественной резистентности, экспрессирующих TLRs с внутриклеточной и поверхностной локализацией

(Crucian B. et al 2014, Yi B et al 2014, Б. В. Моруков., 2013).

В экспериментах с антиортостатической гипокинезией, было показано достоверное снижение продукции провоспалительных цитокинов активированными Т- и В-клетками, снижения содержания Т-хелперов, увеличения количества регуляторных Т-клеток (Hoff P, 2015 Navasiolava NM, 2013).

В модели с пребыванием добровольцев-испытателей в условиях СИ показано увеличение С4 компонента комплемента в сыворотке, наблюдается увеличение количества Т и В-лимфоцитов (Navasiolava NM et al, 2011), изменения сывороточной концентрации про-и противовоспалительных цитокинов, а также цитокинов, синтезируемых мононуклеарными клетками в культурах in-vitro (Берендеева Т.А и др, 2009), выявлены разнонаправленные изменения со стороны системы TLRs (Пономарёв С.А., 2011).

Исследований в области влияния гипомагнитных условий на систему иммунитета практически нет, существуют лишь единичные работы на животных, демонстрирующие негативное влияние ГМУ на различные функции системы иммунитета (Roman A., 2009).

Как видно из вышеизложенного, экстремальные факторы оказывают существенное влияние на процессы функционирования иммунной системы, однако в целом реакция иммунной системы на молекулярно-клеточном уровне, преимущественно её врождённого компонента остаётся практически не исследованной.

Цель исследования: изучить молекулярно-клеточные процессы, происходящие в иммунной системе человека при экстремальных воздействиях различного генеза, в первую очередь, ассоциированных с космическим полётом.

Задачи исследования:

1. Исследовать особенности функционирования иммунной системы при кратковременном холодовом воздействии.
2. Оценить влияние гипомагнитных условий на состояние иммунной системы.
3. Изучить состояние системы иммунитета во время пребывания в условиях искусственной среды обитания.
4. Изучить реакции иммунной системы при адаптации к условиям моделируемой гравитационной разгрузки.
5. Изучить влияние искусственной силы тяжести на состояние иммунитета.
6. Исследовать влияние условий космических полётов на показатели иммунного статуса космонавтов.

Научная новизна

Впервые проведено комплексное исследование молекулярно-клеточных реакций системы иммунитета при широком спектре экстремальных воздействий.

В результате проведённой работы было впервые показано, что воздействие сверхнизких температур оказывает преимущественно активирующее влияние на клеточные факторы адаптивного и врождённого компонентов иммунной системы человека.

Впервые было установлено, что моделирование эффектов невесомости в эксперименте с 21-суточной СИ приводит к разнонаправленной реакции различных звеньев иммунитета человека.

Впервые выявлено, что 21-суточная СИ приводит к увеличению содержания в периферической крови человека активированных Т-регуляторных лимфоцитов, оказывает значительное негативное влияние на клеточные показатели системы естественной резистентности. Выявлены различные изменения как в абсолютном, так и в относительном количестве моноцитов и гранулоцитов периферической крови, экспрессирующих TLRs с различной локализацией.

Впервые установлено снижение содержания моноцитов, экспрессирующих TLRs с внутриклеточной и поверхностной локализацией в ответ на стимуляцию клеток соответствующими лигандами *in vitro*, свидетельствующее об уменьшении активационного потенциала клеток моноцитарно-макрофагального ряда.

Выявлен сдвиг Th1/Th2 баланса в направлении усиления гуморального ответа с одновременным снижением возможности моноцитов продуцировать про и противовоспалительные цитокины в ответ на стимуляцию различными лигандами TLRs. Во время эксперимента были выявлены разнонаправленные изменения в экспрессии генов проводящих путей TLRs. Было установлено, что 21-суточная СИ приводит к преимущественному снижению цитокинпродуцирующей способности клеток врождённого и адаптивного иммунитета

Впервые было показано, что вращение на ЦКР в течение часа в различных режимах не приводит к существенным фенотипическим и функциональным изменениям в иммунной системе человека.

Впервые установлено, что пребывание в ГМУ в течение 16 часов не приводит к существенным изменениям в иммунной системе человека.

Впервые показано, что изоляция в гермообъекте с искусственной средой обитания приводит к разнонаправленным изменениям в клеточном составе и функциональной активности эффекторных клеток естественной резистентности и адаптивного иммунитета.

Впервые охарактеризовано состояние клеточного звена врождённого компонента иммунной системы человека в условиях пребывания в 10-ти суточной изоляции человека в гермообъекте в гипербарической кислородно-азотно-аргоновой среде. Было показано, что пребывание в гермообъекте с кислородно-азотно-аргоновой гипоксической газовой смесью при избыточном давлении оказывает преимущественно активирующее влияние на адаптивный и врождённый компоненты иммунитета организма человека.

В изоляционных экспериментах впервые была проведена оценка раннего периода адаптации иммунной системы человека. Было продемонстрировано, что в ранней фазе адаптации системы иммунитета к условиям краткосрочной изоляции в гермообъекте, наибольшие изменения наблюдаются в системе сигнальных образ-распознающих рецепторов клеток врождённого иммунитета.

Впервые показано, что длительный КП приводит к разнонаправленной реакции адаптивного и врождённого иммунитета, заключающейся либо в преимущественной активации, либо угнетении экспрессии генов сигнальных путей TLRs, а также количественном содержании лимфоцитов и клеток системы естественной резистентности, экспрессирующих TLRs с внутриклеточной и поверхностной локализацией.

Теоретическая и практическая значимость

Теоретическое значение. В данной работе сформулирована и подтверждена гипотеза о том, что функционирование иммунитета человека во время действия экстремальных факторов различного генеза, в первую очередь, ассоциированных с космическим полётом, объективировано в комплексной разнонаправленной молекулярно-клеточной реакции её отдельных компонентов. Она может кардинально отличаться у одного и того же человека в разные периоды времени и не является специфичной для рассмотренных действующих факторов. Полученные в исследовании результаты существенно расширяют фундаментальные представления о работе системы иммунитета во время воздействия на организм человека экстремальных факторов окружающей среды, позволяют более полно понять механизмы адаптации иммунной системы к изменяющимся условиям среды обитания.

Практическая значимость работы связана с обоснованием принципов формирования комплекса профилактических мероприятий, направленных на поддержание функционирования иммунной системы человека, находящегося в неблагоприятных условиях, который должен начинаться ещё до начала самого воздействия и продолжаться не менее одной недели после его завершения. Кроме того, полученные данные о разнонаправленной реакции иммунной системы при повторных воздействиях дополняют сформулированное ранее предложение о включении тестов оценки резервных возможностей иммунной системы для отбора и прогноза адаптационных возможностей «устойчивых» к воздействию экстремальных факторов

окружающей среды лиц, чья профессиональная деятельность связана с пребыванием в неблагоприятных условиях. В проведённом исследовании показано, что для адекватной оценки резервного потенциала иммунной системы необходимо неоднократное повторение функциональных тестов, по результатам которых можно прийти к выводу о превалирующем для конкретного человека варианте реакции иммунной системы на экстремальные воздействия. В работе также предложен оригинальный метод оценки цитокинпродуцирующей способности моноцитов периферической крови человека при стимулировании различными лигандами TLR, отражающий функциональную активность моноцитов. Кроме того, полученные в результате проведения исследования данные, не выявили существенных изменений в иммунной системе человека после вращения на ЦКР в разных режимах, что позволяет рассматривать ЦКР с иммунологической точки зрения, как перспективное средство профилактики действия негативных эффектов микрогравитации.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту

1. Кратковременное гипер-гравитационное воздействие, а также пребывание здорового человека в гипомагнитных условиях не сопровождаются существенными молекулярно-клеточными изменениями в иммунной системе.
2. Реакция иммунной системы человека на действие факторов, ассоциированных с космическим полётом, холодовым и гипербарическим воздействием осуществляется за счёт разнонаправленных молекулярно-клеточных процессов её отдельных компонентов.
3. Выявляемые на разных этапах иммунного процесса изменения в системе иммунитета не являются специфичными по отношению к характеру вызывающих их экстремальных факторов среды обитания.
4. Повторные воздействия экстремальных факторов окружающей среды у одного и того же человека могут вызывать разнонаправленную реакцию со стороны одних и тех же эффекторов иммунной системы.

Степень достоверности и апробация результатов

Диссертационная работа выполнена при поддержке Минобрнауки России в рамках соглашения № 075-15-2022-298 от 18.04.2022 г. о предоставлении гранта в форме субсидий из федерального бюджета на осуществление государственной поддержки создания и развития научного центра мирового уровня “Павловский центр “Интегративная физиология - медицине, высокотехнологичному здравоохранению и технологиям стрессоустойчивости””, базовой тематике ГНЦ РФ-ИМБП РАН 65.1. “Изучение механизмов адаптации живых систем различного уровня организации при моделировании основных особенностей освоения ближнего и дальнего космического пространства с целью разработки медико-биологического обеспечения сверхдлительных орбитальных и межпланетных космических полётов”, гранта

Российского научного фонда (РНФ № 18-75-10086, 18-75-10086-П “Состояние системы сигнальных образ-распознающих рецепторов семейства toll-like при моделировании некоторых факторов КП”), гранта Российского фонда фундаментальных исследований (РФФИ “мол_а” 14-04-31446 “Исследование изменений в системе сигнальных образ-распознающих рецепторов клеток врождённого иммунитета человека под воздействием факторов длительного космического полёта”, грантом Президента РФ: «Поддержка ведущих научных школ НШ-371.2014.4», Программы научных исследований президиума РАН «Биомедицинские технологии: инновационные разработки» грант “ Комплексное исследование иммунологических механизмов ремоделирования костной ткани и ее регуляции при воздействии на организм факторов космического полета для создания персонифицированных технологий предупреждения и коррекции изменений в процессе длительных пилотируемых космических экспедиций ”, а также космического эксперимента “Иммунорецепторы”, проведённого с участием российских членов экипажей МКС.

Достоверность полученных в диссертационной работе результатов и сформулированных выводов подтверждается проведением исследований при помощи современных методов анализа, включая проточную цитометрию, ПЦР в реальном времени, мультиплексный анализ, постановку клеточных культур, а также адекватной статистической обработке массива полученных данных. Материалы диссертации были доложены на международных и российских конференциях, включая XI Конференции молодых ученых, специалистов и студентов, посвященная дню космонавтики Москва, 2012, 40 международная ассамблея COSPAR, Москва, 2014, XIV Конференция молодых ученых, специалистов и студентов, посвященная 65-летию со дня рождения врача-космонавта Б.В.Морукова, Москва, 2015, 66-ой Международный Астронавтический Конгресс (IAC-2015), Иерусалим, 2015, Международный симпозиум по гравитационной физиологии (ISGP), Тулуза, 2016, XIV Королёвские чтения, Королёв-2017, 68-ой Международный Астронавтический Конгресс (IAC-2017) Аделаида, XVII Конференция по космической биологии и авиакосмической медицине с международным участием, Москва-2018, Международная научная конференция “Человек в космосе” (HIS-2019), Дубай, 2019, Международная научная конференция “Человек в космосе” (HIS-2021), Москва, 2021., Международный симпозиум в области космической биологии и медицины, организуемый NASA HRP (IWS-2023), Галвестон-2023.

Результаты диссертационной работы были представлены на межинститутском семинаре, посвященного проблемам экстремальных воздействий, в первую очередь, ассоциированных с космическим полётом, на систему иммунитета человека, проведённого между Федеральным государственным бюджетным учреждением науки Государственным научным центром Российской Федерации Институтом медико-биологических проблем Российской академии наук

и Федеральным государственным бюджетным учреждением Государственным научным центром Институтом иммунологии Федерального медико-биологического агентства России (протокол №1 от 04 октября 2022 года).

Диссертационная работа апробирована на секции по «Космической медицине» Учёного Совета Федерального государственного бюджетного учреждения науки Государственного научного центра Российской Федерации – Института медико-биологических проблем Российской Академии наук (протокол №8 от 19.12.2022)

Внедрение результатов исследований.

Основные положения диссертации вошли в программу клинико-физиологического обследования космонавтов до и после КП, а также оценки иммунного статуса испытуемых-добровольцев, участников наемных модельных экспериментов, имитирующие факторы космических экспедиций.

Личный вклад автора

Личный вклад заключается в создании научной концепции, планировании и проведении экспериментов, сборе данных и анализе полученных результатов, формулировании положений диссертационной работы, выносимых на защиту, постановке цели и задач исследования, написании текста диссертационной работы, формировании выводов диссертации, подготовке публикаций по материалам диссертации.

Публикации

По результатам диссертационной работы опубликовано 30 статей в отечественных и зарубежных научных журналах, входящих в перечень изданий, рекомендованных ВАК, РИНЦ, Scopus и Web of Science. 10 работ опубликованы в изданиях, входящих в Q1 (по версии SJR), в Q2-1 статья.

Структура и объём диссертации

Результаты диссертационной работы изложены на 248 страницах машинописного текста, содержат 47 таблиц, 46 рисунков, а также 2 приложения. Диссертация построена по традиционному принципу и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы, включающего 427 источников, из которых-30 в отечественных и 397 в зарубежных изданиях.

ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Начало современной иммунологии традиционно связывается с именами Paul Ehrlich и Ильи Ильича Мечникова, заложивших концепцию гуморального и клеточного иммунитета. Следующим этапом развития иммунологии стало создание клонально-селективной теории работы иммунитета, предложенной в 50-е годы XX столетия сэром Frank M. Burnet, согласно которой в организме возникают определённые клоны клеток, обладающих иммунокомпетенцией по отношению к различным антигенам. Один клон клеток избирательно контактирует с соответствующей антигенной детерминантой, причём каждая клетка (Т или В-лимфоцит) экспрессирует на своей мембране рецепторные структуры только одной специфичности (Ribatti D. 2009). Фактически работы F. Burnet и его последователей заложили основы современной иммунологии, дав определение иммунологической памяти, толерантности и специфичности.

Долгое время считалось, что иммунная система эволюционировала в первую очередь для обеспечения защиты организма от инфекционных агентов. Было высказано предположение о том, что между иммунной системой и разнообразными инфекционными агентами развернулось многотысячелетнее противостояние, в котором патогенные микроорганизмы и вирусы пытаются преодолеть иммунный барьер организма, а иммунитет, в свою очередь, создает новые формы защиты от постоянно усиливающегося давления со стороны экзогенных патогенов (Woolhouse ME, 2002). Этот процесс хорошо известен как непрерывная “гонка вооружений” между иммунитетом и инфекционными агентами (Decaestecker E et al, 2007)

К середине 60-х годов XX столетия были сформулированы основные теории, объясняющие функционирование адаптивного иммунитета, однако вопрос о роли врождённого иммунитета в становлении и развитии иммунного ответа оставался открытым. Переломный момент наступил в 1989 году, когда Charles Janeway предложил свою «теорию распознавания образов», которая до сих пор обеспечивает концептуальную основу для нашего текущего понимания процессов распознавания антигенных структур врождённым иммунитетом и его роль в активации адаптивного иммунитета. С. Janeway первым предположил существование эволюционно консервативной первой линии защиты организма, состоящей из антигенпрезентирующих клеток, экспрессирующих образ-распознающие рецепторы, которые распознают консервативные паттерны микроорганизмов, отличающиеся от антигенной структуры организма-хозяина. АПК обеспечивают процессинг и презентацию антигенов лимфоцитам, формируя начало адаптивного иммунного ответа (Janeway CA Jr, 1989). Модель С. Janeway также предполагает, что система естественной резистентности эволюционировала для обеспечения защиты от болезнетворных микроорганизмов (Janeway CA Jr, 1991). Несколько лет спустя было открыто семейство Toll-подобных рецепторов,

принадлежащих к классу клеточных образ-распознающих рецепторов, распознающих консервативные структуры микроорганизмов и вирусов с последующей инициацией адаптивного иммунного ответа (Takeda K, 2009). Все это, казалось, решительно поддерживает идею о том, что первостепенная роль иммунной системы заключается в защите организма-хозяина от болезнетворных инфекционных агентов, однако накапливалось всё больше фактов, свидетельствующих о вовлечённости иммунной системы в гомеостатические процессы. Теория С. Janeway и по сей день считается верной, однако довольно упрощённой и не дающей объяснения феноменам развития иммунного ответа в условиях отсутствия инфекционных агентов и развития иммунологической толерантности. В 1994 году Polly Matzinger выдвинула так называемую «гипотезу опасности». Ее модель, опять же на чисто теоретической основе, предполагает, что основной движущей силой иммунной системы является необходимость обнаружения и защиты от опасности тогда, когда помимо наличия патогена появляется повреждение собственных тканей (Matzinger P.,1994). Важно отметить, что в том же году группа учёных-трансплантологов, обсуждая случаи отторжения пересаженной почки, обратила внимание на факт усиления процесса отторжения в результате повреждения тканей аллотрансплантата (Land W.,1994). С тех пор активация врожденного иммунитета, вызванная повреждением тканей, демонстрировалась бесчисленное количество раз (Manson J et al, 2012., Muir P et al.,2020). Были обнаружены эндогенные лиганды, активирующие систему естественной резистентности, такие как нуклеиновые кислоты (Roers A et al ,2016), белки теплового шока (Tamura Y et al 2012), белки клеточного цитоскелета(Ahrens S et al, 2012), цитокины (Eigenbrod T et al 2008), HMGB-1 (Keyel P.,2014) и многие другие, включая фибронектин, F-актин, гранулизин и др. (Roh JS 2018) Эти лиганды были объединены в общую группу, называемую “молекулярные фрагменты, ассоциированные с повреждениями” (DAMP). Таким образом можно выделить две основные функции иммунной системы: защитную (направленную на элиминацию как экзо- так и эндогенных угроз) и гомеостатическую, тесно переплетённых между собой. Нарушения в каждой из этих функций способны приводить к развитию патологических состояний. На сегодняшний день в контексте рассмотренных теорий существует колоссальное количество статей, описывающих гомеостатическую и защитную функции иммунной системы человека, однако работ, посвящённых функционированию иммунитета в экстремальных условиях среды обитания крайне мало, а теории, описывающей работу иммунной системы в подобных условиях, не существует. Далее в рамках имеющихся в мировой литературе источников рассматриваются воздействия отдельных экстремальных факторов, связанных с условиями окружающей среды на иммунную систему человека и животных.

1.1. Общие принципы организации и работы иммунной системы

В ходе миллионов лет эволюции были сформированы механизмы защиты организма от попадания инфекционных агентов и ответа на внутренние угрозы. Условно их можно представить в виде трёх линий, к первой линии относятся ткане-специфические механические (плотные эпителиальные соединения), химические (желудочный сок, легочный сурфактант, ферменты) и микробные (синантропная микрофлора кожи и кишечника) барьеры (Dabrowska AK, et al 2018., Dumpa V, et al 2018, Heintz-Buschart A, et al 2018). Эпителиальные ткани, такие как кожа, лёгкие или кишечник, обеспечивают барьер на пути патогенов. Слизистый эпителий дыхательных путей содержит специализированные реснички для облегчения транспорта слизи, вязкого вещества, выделяемого эпителиальными клетками, которое содержит различные гликопротеины (муцины). Они помогают предотвратить адгезию микроорганизмов, а движение ресничек приводит к экскреции патогенов, инактивированных слизью. (Grondin JA et al 2020) Важную роль в противомикробной защите играют ферменты, синтезируемые железистыми клетками, такие как лизоцим, специфически расщепляющий полимеры глюкозы (глюканы), клеточной стенки грамположительных бактерий (Liu J et al 2018, Wu T et al 2019).

Низкий уровень pH и ферменты желудочного сока препятствуют проникновению микроорганизмов в брюшную полость, а эпителий кишечника является своеобразной матрицей для разнообразных синантропных бактерий, также выполняющих барьерную функцию (Adak A et al 2019). Важную роль на первой линии защиты играют антимикробные пептиды, такие как дефенсин, кателицид и дермисидин, продуцируемые эпителиальными и иммунными клетками. Они способствуют разрушению клеточной стенки попадающих в организм бактерий, грибов, многих оболочечных и безоболочечных вирусов и даже раковых клеток (Alvarez AH et al 2018., Sharma K et al 2018).

В случае, если инфекционный агент преодолевает первую линию защиты, он сталкивается с системой врождённого иммунитета или второй линией защиты организма, оказывающей немедленную неспецифическую реакцию непосредственно на анатомической границе с окружающей средой посредством гуморального и клеточного компонентов. К гуморальному компоненту относятся система комплемента, белки острой фазы (с-реактивный протеин, фибриноген, сывороточный амилоид А, церулоплазмин и др.), цитокины, а также, так называемые, нейтрофильные внеклеточные ловушки или сети (NET), защищающие организм от инфицирования бактериями, грибами, а также простейшими микроорганизмами (Doni A et al 2017, Inforzato A et al 2012). NET играют ключевую роль на ранних этапах защиты от грибка *Candida albicans* (Santocki M et al 2020).

В последние годы большое внимание уделяется системе комплемента, эффективно

опсонизирующей инфекционные агенты для последующей элиминации их фагоцитами, или воздействуя на микроорганизмы напрямую, создавая специальные комплексы, перфорирующие клеточную стенку бактерий. (Heesterbeek et al. 2018). Кроме того, в недавних исследованиях была показана способность системы комплемента регулировать функции В- и Т-лимфоцитов (West et al. 2018) и процессы клеточного апоптоза. Чтобы подчеркнуть растущую роль системы комплемента в регуляции клеточных процессов, был специально разработан термин “комплосома” (West et al. 2020), обозначающий внутриклеточную регуляторную функцию комплемента. Стоит отметить, что особые компоненты клеточной мембраны патогенов обнаруживаются и распознаются не только системой комплемента.

К клеточным факторам системы естественной резистентности относятся базофилы, нейтрофилы, тучные клетки, моноциты, макрофаги, эозинофилы, NK-клетки и NKT-клетки (Nikzad R et al 2019, Kriegsmann K et al, 2018.). Важнейшую роль в формировании клеточной резистентности играют специализированные рецепторные структуры, именуемые образ-распознающими рецепторами (PRRs), с внутриклеточной и поверхностной локализацией, распознающие консервативные патоген-ассоциированные молекулярные паттерны (PAMPs) и молекулярные фрагменты, ассоциированные с повреждением (DAMP), способные инициировать неинфекционный воспалительный ответ (Peng Y et al 2018.). DAMP являются собственными молекулами организма-хозяина и представляют собой эндогенные лиганды PRR (Hetmann A et al 2018). Относительно недавно были обнаружены секретируемые PRRs, такие как белок распознавания пептидогликана (PGRP-S) и пентраксин 3 (PTX-3), содержащимися в гранулах нейтрофильных лейкоцитов растворимыми соединениями, действующими подобно антителам при секреции (Cho JH, et al 2005, Wolf AJ et al 2018). PTX-3 играет решающую роль резистентности к инфекции *Aspergillus fumigatus* благодаря своим свойствам опсонизации и активации каскада системы комплемента (Bottazzi et al 2010). Система PRR также включает в себя toll-подобные рецепторы (TLR), NOD-подобные рецепторы (NLR), RIG-рецепторы, лектиновые рецепторы С-типа (CLR) и некоторые другие. PRR имеют поверхностную и внутриклеточную локализацию (Du K et al 2018, Yang X et al 2019., Brisse M et al 2019). К поверхностной относятся некоторые TLRs (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 TLR6), CLR, а к внутриклеточной NLR, RIG, а также ряд TLRs (TLR3, TLR8, TLR9). Поверхностные рецепторы, как правило, распознают PAMP бактерий и грибов, а внутриклеточные-фрагменты РНК и ДНК вирусов. PRR участвуют в синтезе цитокинов, процессах фагоцитоза, апоптоза а также регуляции иммунного ответа (Kumar V et al 2019, Owen A.M. et al 2021). Некоторые CLR, такие как Дектин-1, экспрессируемые на поверхности всех фагоцитирующих клеток, участвуют в распознавании β -1,3-связанного глюкана, являющегося компонентом большинства грибов,

помимо фагоцитоза, запускают и каскад реакций, приводящий к синтезу цитокинов (Hou H et al, 2017).

Представления о роли PRR в регуляции начальных этапов развития адаптивного иммунного ответа находят все большее количество экспериментальных подтверждений. В современной иммунологии сформировалось представление о взаимной позитивной регуляции систем врожденного и приобретенного иммунитета. С одной стороны, активированные через PRR клетки системы врожденного иммунитета в процессе презентации антигена активируют Т-лимфоциты и индуцируют формирование приобретенного иммунитета. С другой стороны, в эффекторной фазе приобретенного иммунного ответа Th1 активируют клетки врожденного иммунитета, привлекая их к участию в реализации защитных реакций (Ponchel F et al 2020).

Фагоциты могут быть ткане-специфичными резидентами, например, тканевыми макрофагами в легких, печени или кишечнике, циркулирующими в качестве предшественников (моноцитов), которые мигрируют в различные ткани, где и проходят клеточную дифференцировку. (Buscher et al 2017).

Элиминация патогенов достигается с помощью ряда токсичных химических веществ (например, активных форм кислорода) и активации системы комплемента, что приводит к опсонизации патогенов, способствующих поглощению и последующему уничтожению микроорганизмов фагоцитами (Ling M et al 2019). Гранулоциты, также называемые полиморфно-ядерными лейкоцитами (PMNs), из-за их неправильной формы ядер, имеют в своём арсенале различные типы антимикробных белков внутри цитоплазматических гранул. Они делятся на нейтрофилы, эозинофилы и базофилы в зависимости от их окраски (Hickey MJ et al 2009). Наиболее сильная фагоцитарная активность свойственна нейтрофилам (Manfredi AA et al 2018).

PMNs и клетки моноцитарно-макрофагального ряда способны уничтожать микробы самостоятельно без предварительной опсонизации. PMNs содержат G-белок, связанный с рецептором fMet-Leu-Phe (fMLP) с высоким сродством к бактериальным белкам, начиная с остаточного N-формилметионина (fMet). При активации данного рецептора запускается каскад реакций, активирующий гидролитические ферменты и активные формы кислорода, такие как супероксидный анион, перекись водорода и некоторые другие высокотоксичные молекулы (Tap X et al 2019). Эти реактивные соединения наносят значительный ущерб не только попавшим внутрь клетки патогенам, но и собственным тканям организма, если они попадают во внеклеточное пространство, что во многом обеспечивает гомеостатическую функцию врождённого иммунитета, однако при действии неблагоприятных условий способны привести к неконтролируемому воспалению и повреждению тканей (Nussler AK et al 1999, Castanheira FVS et al 2019).

Интересно, что нейтрофилы способны “чувствовать” размер своего микробного противника и использовать внеклеточные ловушки для атаки патогенов большего размера, которые были бы слишком большими для фагоцитоза в целом (Branzk et al. 2014).

Важным клеточным фактором естественной резистентности являются НК-лимфоциты. НК-клетки осуществляют немедленный ответ на инфицирование вирусами и внутриклеточными бактериями, уничтожая инфицированные клетки, а также обеспечивают противоопухолевый иммунитет (Vargas-Hernández A et al 2019). В отличие от Т-лимфоцитов, НК-клетки распознают поражённые клетки без ко-рецепции с главным комплексом гистосовместимости (МНС) и антител, вследствие чего ответ НК-клеток развивается довольно быстро (Frutoso M et al 2019). НК-клетки активируются цитокинами, например интерферонами, секретируемые другими клетками иммунной системы. НК -лимфоциты обладают способностью сканировать клетки различных тканей организма на наличие МНС I. В случае обнаружения атипичного МНС или отсутствия его МНС I, запускается процесс клеточного апоптоза. Ингибирующий сигнал НК активируется, если клетка несёт на своей поверхности неизменённый МНС I, характерный для конкретного организма (Martinet L et al 2015). Ранее считалось, что НК-лимфоциты не способны формировать клеточную память, однако исследования последних лет показывают, что НК-лимфоциты способны к формированию некоего подобия иммунологической памяти, когда активированные клетки сохраняются длительное время и способны инициировать более быстрый и эффективный ответ на вирусные инфекции (Pahl JHW et al 2019).

Дендритные клетки - гетерогенная группа фагоцитирующих клеток, роль которых заключается в диссоциации патогена на компоненты и представление его Т-клеткам, поэтому они также причисляются к группе антигенпрезентирующих клеток (АПК) и, возможно, являются наиболее важным компонентом этой группы. ДК являются неким связующим звеном между врождённым и адаптивным иммунитетом (Collin M et al 2019, Patente TA et al 2019).

Эффективность врождённых иммунных реакций основана на сочетании различных независимых и в то же время взаимосвязанных стратегий. Таким образом, система естественной резистентности не является “автономной” программой в иммунной системе человека, а участвует в перекрестных процессах с адаптивной иммунной системой, в частности, в активации, рекрутировании, дифференцировке и пролиферации лимфоцитов, а те, в свою очередь, оказывают влияние на клетки врожденной иммунной системы (Murphy et al. 2012).

Третьей линией защиты организма человека является приобретённый или адаптивный иммунитет, состоящий из Т и В лимфоцитов. Основными свойствами адаптивного иммунитета являются высокая специфичность по отношению к конкретному антигену, отсроченность реакций, а также способность формировать иммунологическую память, что отличает его от

системы естественной резистентности (Mayer A et al 2019). Последующее повторное воздействие одного и того же патогена приводит к значительно большему и более быстрому антиген-специфическому ответу из-за присутствия циркулирующих В- и Т-клеток памяти (Seifert M et al 2016, 208. Schreiner D. et al 2018). Как и во врождённом иммунитете, в адаптивном можно условно выделить два основных компонента: гуморальный, опосредованный антителами и цитокинами и клеточный, опосредованный лимфоцитами и дифференцированными из них плазматическими клетками (Sigvardsson M. 2018). Гуморальный иммунитет опосредуется антителами, вырабатываемыми В-лимфоцитами и плазматическими клетками. АТ подразделяются на несколько основных изотипов (IgA, IgG, IgM, IgD и IgE), отличающихся друг от друга особенностями конформационной структуры, и как следствие, выполняющие разные функции (Sun Y et al. 2020). Высокая степень вариабельности АТ обеспечивается перестройками особых локусов, кодирующих так называемые лёгкие и тяжёлые цепи, в процессе V(D)J-рекомбинации (Roth D., 2014). Основными функциями АТ являются:

- нейтрализация - процесс блокирования части поверхности инфекционного агента, в результате которого происходит его инактивация (Zhao H, et al 2020);
- агглютинация и преципитация, два схожих по своему механизму процесса, в которых происходит «склеивание» антигенов антителами с последующим фагоцитозом (Velmurugan R et al 2018);
- активация системы комплемента, при которой АТ присоединяются к поверхности клеточного патогена, после чего она становится уязвимой для лизиса компонентами комплемента (Goldberg BS et al 2020);
- антителозависимая клеточная цитотоксичность-феномен, при котором АТ связывает АГ на поверхности клетки-мишени и через Fc-рецептор привлекает для ее деструкции эффекторные клетки, такие как NK-лимфоциты, моноциты, эозинофилы. АЗКЦТ не зависит от системы комплемента (de Vries RD et al 2017). Антитела к конкретным возбудителям могут сохраняться от нескольких месяцев до многих лет (Krammer F 2019, Moss WJ, 2017).

Клеточный приобретённый иммунитет опосредуется $CD8^+$ цитотоксическими Т-лимфоцитами, которые уничтожают инфицированные внутриклеточными патогенами клетки, опухолевые клетки и обеспечивают реакцию отторжения трансплантата (Martin MD et al 2018). Клеточный и гуморальный компоненты адаптивного иммунитета регулируются $CD4^+$ хелперными Т-лимфоцитами (Fernandes JS et al 2019).

Для того, чтобы детально описать процессы работы системы иммунитета потребуется не одна сотня страниц, однако как можно видеть из вышеизложенного, иммунитет человека представляет собой сложную многоуровневую систему, состоящей из ряда взаимосвязанных компонентов, главная задача которой является защита организма от внутренних и внешних

угроз. Экстремальные условия окружающей среды приводят к изменению в работе иммунитета человека и животных. Использование животных моделей, таких как грызуны (Ward et al. 2018) и земноводных (Bascove et al. 2011) позволяет лучше контролировать условия эксперимента и обходиться относительно небольшими лабораторными объёмами, что становится особенно актуальным в свете проведения исследований на борту космического аппарата. Тем не менее, совершенно очевидно, что животные модели упрощают многие сложные и изменчивые физиологические и эмоциональные условия, связанные с полётом человека в космос. Стресс и связанные с ним нейроэндокринные реакции у животных, особенно у организмов более низкого порядка, вряд ли точно отражают те, которые происходят у людей. Кроме того, было замечено, что экспрессия клеточных генов может существенно отличаться у людей и грызунов в ответ на различные модели микрогравитации (Paulsen et al. 2015). Поэтому в этой главе и далее основное внимание уделяется исследованиям влияния экстремальных факторов окружающей среды, проведенным с участием человека.

1.2. Влияние экстремальных факторов среды обитания на иммунную систему человека

1.2.1. Влияние температуры окружающей среды на иммунитет человека

Температура является одной из основных характеристик окружающего пространства. Организм человека обладает рядом систем для поддержания заданной температуры для обеспечения оптимального протекания различных метаболических процессов. Изучение процессов физиологической адаптации, а также оценка резервных возможностей организма человека является актуальной задачей при освоении регионов с экстремальными температурными режимами людьми, неадаптированными к воздействию высоких и низких температур (Солонин Ю. Г и др., 2015, Cariappa MP et al., 2018).

Известно, что холодовое воздействие – это один из самых мощных адаптогенных факторов, влияющих практически на все физиологические системы человеческого организма, включая иммунную (Becker M et al 2019, Manolis AS et al,2019, Jones DM et al 2017). Несмотря на довольно большое количество исследований о влиянии низких и ультранизких температур на организм человека, остаётся открытым вопрос о механизмах влияния на иммунитет человека. К настоящему моменту известно, что холодовое воздействие приводит к ряду изменений, затрагивающих врождённый и адаптивный компоненты иммунитета (Lubkowska A et al 2010, Lubkowska A et al,2011, Lubkowska A et al 2019). Разными авторами используются различные модели низкотемпературных воздействий, отличающиеся как по физическим свойствам, так и по продолжительности действия. В этих моделях исследуются различные показатели иммунитета. Кроме того, время забора крови у разных авторов отличаются, в связи с чем не представляется возможным сравнивать полученные данные между собой. По

имеющимся в литературе данным можно говорить о конкретно неспецифическом для иммунитета холодом воздействии и реакции на него в каждой из моделей (Lubkowska A et al 2010).

Подходы к оценке влияния низких температур на иммунитет человека можно условно разделить на два типа. В первом используют иммерсионное погружение в холодную воду, во втором – пребывание на воздухе при отрицательных значениях температуры, а также специальные низкотемпературные криосауны (Lubkowska A et al 2010).

На начальных этапах исследований в данной области чаще всего применялись иммерсионные модели, что связано с относительно недавним появлением и распространением воздушных криосаун. С использованием моделей первого типа было установлено, что единовременное погружение в холодную воду при температуре 14 °C в течение одного часа не вызывало значимых изменений в иммунной системе человека, однако систематические погружения на один час в течение шести недель приводили к достоверному увеличению концентрации IL-6, количества лимфоцитов, экспрессирующих на своей поверхности рецептор IL-2 CD25 и моноцитов в периферической крови. Также была отмечена тенденция к увеличению общего числа Т-лимфоцитов (CD3⁺), Т-хелперов (CD3⁺CD4⁺), цитотоксических лимфоцитов (CD3⁺CD8⁺), а также активированных Т- и В-клеток. Концентрация TNF-α значимо повышалась, но при этом содержание С3, С4 компонентов комплемента, CRP, IgG, IgM, IgA, а также общее количество лейкоцитов и гранулоцитов достоверно не изменялось (Jansky L., et al 1996).

В другом проведённом эксперименте сорок добровольцев-испытателей однократно находились в иммерсионной ванне при температуре 14 °C в течение 170 минут, причём каждые двадцать минут организовывался десятиминутный перерыв, сопровождаемый выходом добровольцев-испытателей из ванны. В ходе исследования было показано, что общее число лейкоцитов, нейтрофилов, моноцитов достоверно увеличивается с одновременным значимым снижением общего количества лимфоцитов. Также была выявлена тенденция к повышению содержания провоспалительного цитокина IL-6. Концентрация TNF-α в сыворотке крови достоверно не менялась, однако было показано, что у одной части испытуемых прослеживалась тенденция к её увеличению, а у другой, наоборот, – к снижению (Brazaitis M et al 2014). В ещё одном исследовании, проводимом с участием четырнадцати спортсменов, было установлено, что кратковременное и циклически повторяющееся на протяжении шести недель холодное воздействие (15 минут при 10 °C) приводит к снижению активационного потенциала Т-лимфоцитов и моноцитов периферической крови, не зависящей от физической работоспособности атлетов. Важной частью проведённого эксперимента является исследование *in vitro* активационного потенциала указанных выше клеток. В ходе эксперимента было

обнаружено, что культивируемая при 5 °C смешанная культура моноцитов и лимфоцитов продуцирует значительно меньшее количество неоптерина при стимуляции IFN- γ и PMA (phorbol myristate acetate) по сравнению с культурой, инкубируемой при 37 °C. Моноцитарная монокультура реагирует таким же образом, как и смешанная (Lindsay A et al, 2016).

Во втором типе моделей с использованием низкотемпературной криосауны было показано, что пятидневный курс криотерапии, в котором каждый сеанс проводился в течение тридцати секунд при температуре воздуха -60 °C с последующим переходом и пребыванием при -110 °C в течение двух минут, у десяти добровольцев-испытателей наблюдалось значимое увеличение концентрации противовоспалительного цитокина IL-10, достоверное снижение провоспалительных цитокинов IL-8 и IL-2, а также тенденция к снижению в периферической крови концентрации CRP, повышению IgG, IgA, IgM. Концентрация C3 компонента комплемента не имела статистически значимых различий (Banfi G. et al 2016).

В другом эксперименте в ходе десятидневного курса криотерапии с трёхминутным пребыванием в криосауне при -130 °C было продемонстрировано достоверное повышение уровня лимфоцитов, моноцитов и гранулоцитов периферической крови, а также повышение сывороточного уровня IL-6 (Lubkowska A et al, 2010).

В исследовании уровня цитокинов в сыворотке крови 45 добровольцев-испытателей было показано достоверное повышение IL-6, IL-10, а также снижение уровня IL-1 α после пяти сеансов криотерапии при температуре воздуха – 130 °C. После десяти и двадцати сеансов статистически значимых изменений по сравнению с пятыми сутками выявлено не было. Концентрация других цитокинов на протяжении эксперимента почти не менялась (Lubkowska A et al, 2011).

Большая часть исследователей склоняется к тому, что именно цикл холодových воздействий приводит к изменению иммунореактивности, однако накапливается всё больше данных, свидетельствующих о том, что адаптивные перестройки начинаются уже после однократных экспозиций, в которых показано, что даже кратковременное воздействие может оказать существенное влияние на показатели иммунной системы человека (Brazaitis M et al, 2014). Следует также отметить, что подавляющее большинство существующих к настоящему моменту работ посвящено влиянию сверхнизких температур на гуморальный компонент иммунной системы человека. Кроме того, работ, посвящённых влиянию низких температур на клеточное звено врождённого иммунитета человека, до сих пор практически нет. Вместе с тем, изменения в системе естественной резистентности способны вызывать дисфункцию приобретённого иммунитета, поэтому изучение вопроса о влиянии низких температур на вторую линию защиты организма является чрезвычайно актуальным (Lubkowska A et al 2010).

Воздействию высоких температур посвящено не так много работ, как низким, однако имеющиеся в литературе данные показывают, что в отличие от последних, однократные воздействия не вызывают значимых изменений в системе иммунитета. В работе Tomiyama и др. выбирался наиболее оптимальный режим с точки зрения повышения температуры тела. Показано, что наиболее выраженное влияние на температуру тела шести испытуемых по сравнению с другими режимами (90 °С. 10% влажность, 40° С ванна, 48 °С 80-100% влажность) оказывает пребывание в сауне при температуре 40° С со 100% влажностью. В данной модели наблюдалось повышение температуры тела до 37.5 °С после 20 минут пребывания в гипертермических условиях (Tomiyama C et al 2015).

В цитируемой работе было изучено влияние семидневного цикла 20-минутных сеансов в сауне при температуре 40° С при 100% влажности на некоторые клеточные показатели врождённого и адаптивного компонентов иммунитета. Показано, что данное воздействие приводит к достоверному повышению активности NK-клеток, выявленных в тесте со стандартной клеточной культурой K562. Кроме того, наблюдается значимое увеличение относительного содержания в периферической крови Т-клеток. Изменение содержания В-лимфоцитов, а также NKT- клеток с фенотипом CD3⁺CD56⁺ в периферической крови значимым не было, равно как и достоверных изменений всех изучаемых иммунологических параметров после однократного воздействия высоких температур (Tomiyama C et al 2014). В то же время, в работе Wang XX и др. показано снижение количества Т-клеток и NK-лимфоцитов после пребывания в условиях гипертермии (Wang XX et al 1999). В другом исследовании показано, что пребывание в иммерсионных условиях при температуре воды на 2 °С превышающей температуру тела приводит к достоверному повышению содержания в плазме крови IL-6 и IL-8 при отсутствии статистической разницы для IL-1 α и TNF- α (Leicht CA et al 2015).

Ещё одним коллективом авторов оценивалось влияние различной воды: поверхностной и глубинной морской (полученной с глубины 300 м), а также водопроводной на клеточные показатели иммунитета человека. Было показано, что 10-минутное пребывание в воде при температуре 42 °С по-разному влияет на иммунную систему при сравнении трёх типов воды. Так, пребывание в глубинной морской воде приводит к статистически значимому снижению абсолютного количества моноцитов и увеличению числа цитотоксических CD8⁺ -лимфоцитов периферической крови через один час после завершения воздействия. Пребывание в морской воде, взятой с поверхности, -к снижению абсолютного числа эозинофилов сразу после завершения воздействия с сохранением тенденции через один час. Воздействие водопроводной-приводит к снижению абсолютного содержания лимфоцитов за счёт CD8⁺ и CD16⁺CD56⁺ клеток через час после пребывания в условиях гипертермальной иммерсии. Изменения в

остальных исследованных клеточных популяциях ($CD3^-CD19^+$, $CD3^+CD4^+$), а также общего содержания лейкоцитов, нейтрофилов и базофилов отмечены не были (Tsuchiya Y et al 2003).

Анализируя работы по влиянию температурного фактора на иммунную систему человека, можно прийти к выводу, что холодовое воздействие оказывает большее влияние на иммунитет человека, чем гипертермическое. Полиморфизм иммунореактивности в ответ на воздействие температурного фактора, выявленный в изученных литературных источниках, свидетельствует в пользу выдвинутой в настоящей работе гипотезы о влиянии неспецифических воздействий окружающей среды на иммунную систему организма человека.

1.2.2. Влияние давления и газового состава на иммунитет человека

Изучение влияния давления и газового состава на различные системы организма человека, включая и систему иммунитета, является актуальной задачей в контексте создания пожаробезопасных газовых сред в герметически замкнутых пространствах, повышения эффективности гипербарической кислородной (ГБО) терапии (Gajendrareddy PK et al 2017, Thom SR et al 2011, Tamura T et al 2012) и минимизации медицинских рисков при глубоководном дайвинге (Torti SR et al 2004, Nyquist P et al 2007).

Проблема пожаров в герметически замкнутых пространствах остаётся до сегодняшнего дня нерешённой. Одним из способов недопущения возгораний в условиях герметически замкнутых пространств является создание гипоксической газовой среды с содержанием в ней инертных газов и увеличенным давлением кислорода. Было показано, что при содержании кислорода в среде менее 15% возгорание не происходит, однако сохраняется возможность дыхания (Тюрин В.И. 1998), а включение инертных газов приводит к улучшению переносимости подобной гипоксии (Höllig A et al 2014).

Гипербарическая кислородная терапия является хорошо известным традиционным методом лечения пациентов с тканевой гипоксией. Она повышает содержание кислорода в тканях и ускоряет заживление ран (Broussard CL et al 2004, Poyrazoglu Y et al 2015), модулирует противовоспалительную функцию иммунной системы, что способствует ускорению реконвалесценции от инфекционных заболеваний (Shinomiya N et al 2000). ГБО терапия применяется при отравлениях угарным газом (Lin CH et al, 2018), лечении поражения лёгких у пациентов с вирусной пневмонией, вызванной, прежде всего, коронавирусной инфекцией (Thibodeaux K et al 2020, Guo D et al 2020), лечении некротизирующих инфекций мягких тканей (Jallali N et al 2005), диабетической стопы (Williams RL 1999). Рекомпрессия является золотым стандартом лечения декомпрессионной болезни (Liou K, et al 2015).

Широкий ареал использования изменённого давления и газового состава является прочным основанием для изучения влияния данных факторов на систему иммунитета человека.

Этот вопрос является особенно важным с точки зрения выявляемых в некоторых случаях проблем, связанных с дисфункцией иммунной системы.

В частности, было показано, что у людей, занимающихся дайвингом, развиваются инфекционные заболевания (Ahlen C et al 2001, Wang J et al 2003, Wingelaar TT et al 2017), что может быть связано с развитием ситуативной иммуносупрессии, ассоциированной с погружением (Semko VV et al 1991). Ранее исследование показало увеличение базофильных гранулоцитов и атипичных лимфоцитов в конце серии погружений, что с точки зрения авторов свидетельствует о воспалительных изменениях, связанных с вызванными декомпрессией воздушными пузырьками в венах (Eckenhoff RG et al 1994). Наблюдаемые иммунологические изменения, связанные с дайвингом, в основном включают снижение CD4⁺ Т-клеток и изменение соотношения Т-хелперных и цитотоксических лимфоцитов с увеличением количества нейтрофилов и активации путей комплемента (Nyquist P et al 2007, Huang KL, et al 1997). Недавние исследования также подтвердили участие пузырьков после декомпрессии в подавлении функций лимфоцитов и реципрокной активации нейтрофилов / макрофагов (Eftedal I, et al. 2013), а также в повышении экспрессии регуляторных генов воспалительных цитокинов, таких как NF-κB, IL-6 и TLR4 (Sureda A et al 2014).

Фридайвинг - это особая область дайвинга, в которой ныряльщики задерживают дыхание во время погружения, тем самым индуцируя гипоксию и гиперкапнию, влияющих на систему иммунитета, что проявляется в увеличении количества нейтрофильных гранулоцитов с активацией генов MMP9, TLR3, TLR 2 и IL-8 на фоне снижения содержания цитотоксических лимфоцитов и естественных киллеров (Eftedal I et al 2016). Ряд авторов придерживается той точки зрения, что иммуносупрессивные изменения в основном возникают на стадиях высокого давления, а не вовремя или после декомпрессии (Shinomiya N et al 1994, Matsuo H et al 2000). У дайверов, подвергшихся воздействию высокого давления, наблюдается уменьшение числа лимфоцитов и моноцитов с одновременным увеличением полиморфно-ядерных лейкоцитов в периферической крови, при этом также наблюдается уменьшение содержания Т-клеток, особенно с фенотипом CD4⁺, что приводит к изменению баланса CD4/CD8. В то же время демонстрируется резкое увеличение в лейкоцитарном пуле доли NK-клеток и их функциональной цитотоксичности (Krog J et al 2010), на фоне снижения содержания провоспалительных цитокинов (Al-Waili NS et al 2006). Этот тип иммуносупрессии может быть вызван сочетанием гипербарического стресса, гипербарического кислорода и психологическим стрессом (Shinomiya N et al 1994). Поскольку на иммунную систему существенно влияет высокое давление, гипербарический стресс рядом авторов рассматривается как наиболее важный фактор с точки зрения возникновения изменений иммунореактивности (Shinomiya N et al 1995). Примечательно, что гипербарический стресс по-разному действует на

адаптивный и врождённый компоненты иммунитета: если для адаптивного звена характерно преобладание процессов угнетения, проявляющееся в снижении количества лимфоцитов (Shinomiya N et al 1994, Krog J et al 2010), то для врождённого- наоборот, активация, выраженная в увеличении числа и киллерной способности NK-клеток. (Krog J et al 2010) Воздействие гипербарической оксигенации на функцию лимфоцитов может зависеть от кислородной нагрузки. Показано, что активность цитотоксических Т-лимфоцитов, стимулированных ConA, усиливалась воздействием низкой дозы ГБО (100–150 кПа), но подавлялась воздействием более высокого давления большей продолжительности (Liu W, et al. 2009).

Таким образом, по мнению ряда авторов, изменение субпопуляций лимфоцитов наряду с увеличением функциональной активности NK-лимфоцитов, можно использовать в качестве биомаркера обнаружения гипербарического стресса человека (Matsuo H et al 2000). Причины изменений в системе иммунитета при гипербарических воздействиях остаются до конца не изученными. На рисунке 1 представлена схема, иллюстрирующая потенциальные механизмы изменений в системе клеточного компонента адаптивного иммунитета при гипербарическом воздействии.



Рисунок 1. Схема иммуносупрессивного механизма при гипербарическом погружении (Shinomiya N et al 1994).

Приведённая схема является довольно наглядной и отражает современные представления о причинах изменения иммунореактивности адаптивного компонента иммунитета, однако не отражает изменений, происходящих с системой естественной резистентности. Стоит отметить, что работ, детально рассматривающих действие гипербарии на систему иммунитета крайне мало. По имеющимся литературным источникам, гипербарический стресс оказывает влияние на содержание протеинов с антиоксидантными свойствами, в

частности, HSP (Domoto H et al 2016, Djurhuus R et al 2010), являющихся главными эндогенными лигандами TLRs (Asea A. 2008).

Как было отмечено ранее, гипербарические условия часто совмещаются с воздействием инертных газов с целью создания пожаробезопасных сред, пригодных для дыхания. О действии инертных газов на организм человека имеется ничтожно малый объём информации, несмотря на ряд работ, демонстрирующий, что инертные газы способны вызывать ряд серьёзных биофизических и биохимических эффектов, что неизбежно приводит к изменению в работе ряда физиологических систем организма.

В исследованиях Spaggiari и др.. было показано, что аргон и ксенон обладают ярко выраженной антиапоптотической активностью, снижая клеточную гибель, вызванную ингибитором тирозинкиназы широкого спектра действия- ставропоринном, повреждающим ДНК агентом митоксантроном и несколькими митохондриальными токсинами. Вероятным цитопротекторным механизмом является поддержание целостности митохондрий, что было продемонстрировано с помощью митохондриального трансмембранного потенциалчувствительного красителя и оценкой высвобождения цитохрома С в цитозоль. В соответствии с этим представлением аргон и ксенон ингибировали апоптотическую активацию каспазы-3, определяемой при помощи иммунофлуоресцентной микроскопии в сочетании с автоматизированным анализом изображений. Таким образом установлено, что аргон и ксенон обладают клинически значимыми цитопротективными эффектами (Spaggiari S et al 2013). Данное утверждение подтверждается в ряде работ, демонстрирующих цитопротективные эффекты аргона для разных типов клеток, включая кардиомиоциты (Mayer B, et al 2016), эндотелиальные клетки (Hafner C et al 2016), нейроны (Loetscher PD et al 2009), причём в данном случае было показано, что антиапоптотические эффекты достигаются благодаря блокированию сигнального пути TLR2 и TLR4, причём точный механизм действия остаётся до сих пор неизвестным (Ulbrich F et al 2015). В другой работе также высказано предположение о том, что подавление синтеза провоспалительного цитокина IL-8 осуществляется также посредством блокирования проводящего пути TLR2/TLR4/STAT3/NF-κB (Ulbrich F et al 2016). В настоящее время выделены потенциальные мишени действия аргона на молекулярно-клеточном уровне, однако ответа на вопрос, каким же именно образом аргон действует на данные мишени, до настоящего момента остаётся открытым. Примечательно, что иногда для реализации эффектов действия аргона требуется создание гипербарических условий (Ulbrich F et al 2016a). Аргон оказывает также цитопротективное действие на тубулярные клетки почки (Rizvi M et al 2010), доказаны его тромболитические эффекты (David HN et al 2013). Примечательно, что не все инертные газы вызывают схожие эффекты, а в случае, когда результат их действия одинаков, например в случае нейропротекции, механизмы влияния

различаются (Koziakova M et al 2019, Zhuang L., et al 2012). Рассмотренные эффекты изучаются действия инертных газов рассматриваются в основном с точки зрения нейропротекции *in vitro* и *in vivo* с применением животных моделей, однако механизмы действия на другие клетки, в том числе на иммунные, могут быть схожими, в особенности это утверждение справедливо в части действия аргона на систему сигнальных PRR.

Исследований, демонстрирующих влияние благородных газов на систему иммунитета крайне мало. В одном из исследований было установлено, что гелий не оказывает существенное влияние на стимулированную LPS продукцию моноклеарными клетками цитокинов, а также не влияет на субпопуляционный состав лейкоцитов в периферической крови (Gezina TML et al 2012). В исследованиях, проводимых ранее в ГНЦ РФ-ИМБП РАН, изучалось влияние гипербарической кислородно-аргоновой среды в нормоксических и гипоксических условиях на состояние иммунной системы человека во время 9-суточной изоляции в барокамере. В ходе эксперимента было отмечено выраженное повышение как абсолютного, так и относительного количества в периферической крови CD19⁺ -лимфоцитов как в условиях нормоксии, так и гипоксии. При этом наблюдалось увеличение содержания в периферической крови добровольцев-испытателей количества клеток памяти с фенотипом CD45RO⁺ как в абсолютных, так и относительных значениях. Содержание цитотоксических лимфоцитов, а также “наивных” клеток с фенотипом CD45RA⁺ в эксперименте практически не изменялось. Развитие иммунного ответа в значительной степени связано с активационной способностью клеток адаптивного иммунитета. В проведенном исследовании определялось содержание CD19⁺CD69⁺ и CD4⁺CD69⁺ лимфоцитов *in vitro* при стимуляции клеток митогенами МЛ и ФГА. Было показано, что количество В-лимфоцитов, экспрессирующих ранний активационный маркер (CD69) практически не изменялось. При этом способность Т-хелперов экспрессировать CD69 выражено снижалась к концу эксперимента, а в ряде случаев была показана тенденция к снижению экспрессии позднего активационного маркера CD25 на CD3⁺ - и CD4⁺- Т - лимфоцитах в 48-часовых клеточных культурах, стимулированных ФГА. Исследование способности лимфоцитов продуцировать цитокины *in vitro* показало, что пребывание добровольцев-испытателей в условиях гипербарии приводит к снижению индуцированного ФГА синтеза IL8, TNF α , IL6, IFN γ , IL10, IL1 β , и TNF β . В проведенном исследовании также была выявлена тенденция к повышению содержания специфических антител к некоторым внутриклеточным персистирующим вирусным инфекциям (IgG к HSV-1,2 и EBV-NA) по сравнению с фоновыми значениями, что говорит об ослаблении иммунологического контроля за инфекционными агентами (М.П. Рыкова и др. 2009). К сожалению, в проведенном исследовании участвовала небольшая по своему объёму группа испытуемых, которая не позволила провести статистический анализ на предмет выявления достоверных изменений. Тем

не менее, полученные результаты показывают, что аргон в сочетании с гипербарией в нормоксических и гипоксических условиях оказывает существенное влияние на клеточный и гуморальный компоненты иммунитета, что, безусловно, требует дальнейшего изучения отдельных и сочетанных эффектов, а также механизмов действия этих физических факторов среды обитания.

1.2.3. Влияние факторов, ассоциированных с космическим полётом, на иммунную систему человека

Исследование Вселенной неразрывно связано с развитием пилотируемой космонавтики. Количество людей, совершающих орбитальные, а затем и межпланетные полёты будет в ближайшие десятилетия стремительно расти, а следовательно, находиться в других условиях обитания, принципиально отличающихся от земных (Lopez JV et al 2019). Эти воздействия рядом авторов небезосновательно выделяются в так называемую космическую экспосому (Crucian B et al, Niedzwiecki MM et al 2019), в которой мощные стрессоры физического, физиологического и психологического генеза сливаются воедино и оказывают существенное влияние на здоровье, работоспособность и психологический статус человека (Газенко О.Г и др. 1990, Tanaka K et al 2017, Mann V et al 2019).

Дисфункция иммунной системы, возникающая после КП, была показана ещё в 70-х годах прошлого столетия на экипажах космических кораблей Союз и Аполлон (Konstantinova IV et al 1973, Hawkins W et al 1975, Kimzey SL 1977). В дальнейшем эти данные были подтверждены в ходе четырёх десятилетий исследований, однако масштабы и клиническое значение этих изменений остаются пока неизвестными. К настоящему моменту подавляющее большинство исследований было проведено после завершения космических экспедиций, поэтому наблюдаемые изменения могут быть вызваны не только действием факторов, связанных непосредственно с пребыванием человека на борту космической станции, но и влиянием физиологического стресса во время входа в плотные слои атмосферы и перегрузок во время посадки, а также реадaptации к Земным условиям. (Gueguinou N et al 2009). К счастью, с введением в эксплуатацию МКС, появилась возможность проводить отбор проб крови непосредственно на станции для заморозки и последующей обработки получаемых проб, однако высокая стоимость доставки реактивов и биоматериала, наряду с чувствительностью некоторых видов иммунологического анализа к заморозке, затрудняют получение данных непосредственно во время КП, поэтому до настоящего времени на борту станции было проведено не так много исследований. Немногочисленные исследования, проведённые во время КП, выявили реактивацию латентных вирусных инфекций, отражающую дисфункцию системы иммунитета. Так, Mehta и соавторы выявили реактивацию вирусов простого герпеса и цитомегаловируса во время кратковременных КП (Mehta SK et al 2000, Mehta SK et al 2004). Во

время длительных КП было выявлено снижение активности NK-клеток и изменение синтеза цитокинов (Crucian BE et al 2014, Simpson RJ et al 2016), а кроме того, как и во время кратковременных КП, наблюдалась реактивация латентных внутриклеточных вирусных инфекций (Mehta SK et al 2014, Mehta SK et al 2017).

Как было сказано ранее, большая часть экспериментов по изучению влияния условий КП, проводится после завершения миссии. К настоящему времени накоплен большой материал, иллюстрирующий изменения в системе иммунитета после завершения КП. Субпопуляционный анализ клеток иммунной системы (как адаптивного, так и врождённого её компонентов) методом проточной цитофлуориметрии является одним из самых простых, но вместе с тем надёжных способов оценки состояния иммунитета человека (McKinnon KM et al 2018). В зависимости от физиологического состояния иммунной системы, различные субпопуляции иммунных клеток в периферической крови могут увеличиваться за счёт клональной экспансии или уменьшаться за счёт миграции из периферической крови в локализованные очаги воспаления (Kokuina E et al 2019, Salzer U et al 2019). Также клетки могут погибать в результате апоптоза или их популяция может сокращаться за счёт нарушений в процессе клеточного созревания (Cabral-Marques O et al 2019).

За последние десятилетия многими авторами изучался вопрос о распределении субпопуляций иммунных клеток после завершения КП. Обобщённые данные представлены в таблице 1.

Примечательно, что полученные результаты по представленным типам клеток в разных исследованиях с участием человека и использованием животных моделей отличаются значимой вариабельностью. Тем не менее, большинство авторов относит к наиболее распространенным изменениям увеличение в периферической крови относительного содержания гранулоцитов (Allebban Z et al 2019, Ichiki AT et al 1996) на фоне уменьшения лимфоцитов, в первую очередь за счёт сокращения субпопуляций Т-клеток и NK-клеток (Stowe RP et al 2001, Stowe RP et al 2003, Stowe RP et al 1999), а также CD14⁺ клеток (Chapes SK et al 1999a, Chapes SK et al 1999b). Относительное содержание CD19⁺-лимфоцитов, равно как и количество CD4⁺ и CD8⁺ - клеток по данным разных исследователей может, уменьшаться, увеличиваться или оставаться неизменным (Taylor GR et al 1986, Crucian BE et al 2000, Mills PJ et al 2001, Pecaute MJ et al 2003). Количество активированных Т-лимфоцитов с фенотипом CD25 увеличивается, равно как и процентное содержание некоторых минорных субпопуляций, например санесцентных CD3⁺-лимфоцитов и Т-клеток памяти (Gridley DS et al 2003, Gridley DS et al 2009). Содержание таких лимфоцитов в периферической крови невелико, однако как показали Ponchel F. с соавторами, изменение минорных субпопуляций лимфоцитов могут иметь существенное клиническое значение даже в случае отсутствия динамики основных субпопуляций лимфоцитов (Ponchel F et

al 2020). Согласно проведённым исследованиям, иммунорегуляторный индекс, определяемый как соотношение Т-хелперов к цитотоксическим лимфоцитам ($CD3^+CD4^+/CD3^+CD8^+$), наглядно отражающий изменения иммунного статуса, остается неизменным или незначительно увеличивается (Rykova MP, et al 2008, Crucian BE et al 2008). Выявленный в разных экспериментах гранулоцитоз с одновременным снижением процентного содержания лимфоцитов, скорее всего обусловлен демаргинацией (перераспределением клеток из маргинальной зоны в циркулирующий пул) нейтрофилов в периферическую кровь в ответ на повышение уровня гормонов стресса, вызванного посадкой (Ortega MT et al 2009, Crucian B et al 2015).

В принципе, выявляемые после завершения КП изменения в иммунной и других системах во многом могут быть обусловлены перегрузками и последующей реадаптацией к земным условиям, являющимися значимыми стрессорными факторами после длительного пребывания в условиях микрогравитации (Simpson RJ et al 2016, Navasiolava N et al 2020).

Найденные рядом исследователей закономерности изменения субпопуляционного состава целесообразно использовать не только в научных целях, но и в качестве мониторинга состояния системы иммунитета членов экипажей длительных космических миссий. Некоторые исследователи предпринимают попытки объяснить стойкое повышение концентрации лейкоцитов и гранулоцитов обезвоживанием организма во время КП (Kunz H et al 2017). Однако на сегодняшний день показано, что во время КП происходит изменение $CD8^+$ Т-клеток в сторону более зрелого фенотипа (Crucian BE et al 2014), что скорее может быть связано с генерализованной активацией иммунитета в ответ на реактивацию латентных внутриклеточных инфекций (Rooney BV et al 2019).

Анализ периферических лейкоцитарных субпопуляций сразу после завершения КП демонстрирует увеличение количества нейтрофилов. Однако большая часть этих данных получена после краткосрочных (менее трёх недель) космических экспериментов (Stowe et al. 1999; Taylor et al., 1986). Более поздние работы показали, что полугодовые миссии на МКС приводят к двукратному увеличению абсолютного количества нейтрофилов по сравнению с фоновыми значениями на первые сутки после приземления экипажей, однако довольно быстро возвращаясь к дополётному уровню (Crucian et al. 2015). Этот эффект может быть связан с процессом посадки, который может оказывать интенсивное физическое воздействие на человеческий организм из-за резкого перехода от условий микрогравитации к гипергравитации на этапе посадки и последующей реадаптацией к земным условиям.

Таблица 1. Распределение лейкоцитов в периферической крови после завершения космического полёта

Автор	Объект исследования	Полёт	Типы клеток				Субпопуляции лимфоцитов						Примечание
			Лейкоциты	Гранулоциты	Лимфоциты	Моноциты	T	B	NK	CD4	CD8	Соотношение CD4/C D8	
Taylor et al. (1986)	Человек	К			↓	↓		↓					
Allebban et al. (1994)	Крыса	К	↓	↑	↓	↓		0		0	0		
Ichiki et al. (1996)	Крыса	К	↓	↑	↓	↓	↓	↓		↓	↓		

Chapes et al. (1999a)	Крыса	К		↑	↓	↓							
Chapes et al. (1999b)	Крыса	К			↓	↓							
Stowe et al. (1999)	Человек	К		↑	↓	В							Наблюдалось увеличение количества клеток, экспрессирующих на своей поверхности интегрин-Альфа М (CD11b); показано увеличение концентрации L-селектина.
Crucian et al. (2000)	Человек	К		↑	0	0	↓	0	0			↑	Выявлено уменьшение числа CD14/CD16 моноцитов.
Mills et al. (2001)	Человек	К	↑	↑		↑		↑	↓	↑			Недельный КП был ассоциирован с повышением уровня симпатических гормонов стресса и содержания циркулирующих лейкоцитов, в то время как при двухнедельной миссии выявляемые изменения были недостоверными
Stowe et al. (2003)	Человек	К	↑	↑		В			В	↑			Показана вариабельность реакции иммунной системы между 9 и 16 суточными миссиями.

Pecaut et al. (2003)	Мышь	К											Не выявлены изменения субпопуляций лейкоцитов периферической крови. Показано увеличение процентного содержания лимфоцитов в селезёнке и костном мозге.
Gridley et al. (2003)	Мышь	К											Выявлено повышенные CD25 ⁺ лимфоцитов на фоне снижения CD71 ⁺ клеток во время КП.
Rykova et al. (2008)	Человек	К/ Д					0		↑	0	0	0	
Crucian et al. (2008)	Мышь	К/Д		↑	↓	0	0	↑	↓	0	0	0	Короткий полёт. Обнаружено повышение уровня Т-клеток памяти с иммунофенотипом CD4 ⁺ /CD45RO ⁺ , снижение содержания стареющих Т -лимфоцитов CD8 ⁺ (CD28 ⁻ /CD244 ⁺ . Длительный полёт. Выявлено повышение процентного содержания Т-клеток памяти CD45RO ⁺ для Т-хелперов и цитотоксических лимфоцитов.
Gridley et al. (2009)	Мышь	К						↓	↓	↑			Показано увеличение числа Т и В клеток в селезенке, на фоне повышения содержания НК-клеток в периферической крови.
Ortega et	Мышь	К											Исследование созревания/активации клеток гранулоцитарной

al. (2009)												линии в костном мозге не выявило значимых изменений. Было показано повышение уровня CD11b в субпопуляции R2 нейтрофилов, что свидетельствует об их активации. Кроме того, выявленное снижение экспрессии других антигенов говорит о том, что клетки костного мозга после КП были более дифференцированными.
Crucian et al. (2013)	Человек	К	↑	↑						↓		Было показано, что кратковременный КП не влияет на большинство исследованных популяций клеток периферической крови.
Crucian et al. (2015)	Человек	Д	↑	↑								Полученные во время КП данные свидетельствуют о повышении общего числа лейкоцитов, гранулоцитов и перераспределении субпопуляций CD8 ⁺ лимфоцитов в зависимости от состояния созревания.
Simpson et al. (2016)	Человек	Д						0				Длительный КП приводит к снижению функциональной активности НК-клеток на фоне снижения перфоринов и гранзимов. Экспрессия НК NKG2C и NKG2A оставалась неизменной, за исключением члена экипажа, у которого была обнаружена реактивация цитомегаловирусной инфекции с соответствующим увеличением количества NKG2C ⁺ клеток.

К-короткий, Д-длительный, 0-изменения не выявлены, Р-выявлены разнонаправленные изменения, обусловленные гетерогенной индивидуальной реакцией, В-вариабельность данных в зависимости от срока пребывания в условиях КП. Пустая ячейка означает отсутствие данных.

Поскольку количество клеток не всегда коррелирует с их функциональным потенциалом, (Kaur et al. 2000), было проведено изучение окислительной способности и фагоцитарной активности нейтрофилов астронавтов и, если в течение 5-суточных миссий существенных изменений не наблюдалось, то уже после 11-суточных миссий приводили к значительному снижению способности к кислородному взрыву и снижению фагоцитарной активности, что было изучено на примере *E. coli*. Предварительные результаты исследования эксперимента “Иммуно” также показали, что продукция нейтрофилами активных форм кислорода после стимуляции fMLP сохраняется после 6 месяцев пребывания на орбите, но при этом была отмечена высокая активация нейтрофилов по сравнению со значениями, полученными до КП (Buchheim et al. 2019).

В отличие от однонаправленных изменений, наблюдаемых в количестве нейтрофилов, количество моноцитов может варьировать после завершения КП. Kaur и др. (Kaur et al. 2005) продемонстрировали снижение способности моноцитов к фагоцитозу *E. coli* после кратковременного КП. Кроме того, реакция моноцитов, подвергнутых воздействию LPS, была дифференциально модулирована космическими полётами (Kaur et al. 2008). С одной стороны, наблюдалось снижение внутриклеточных провоспалительных цитокинов, таких как интерлейкин-6 (IL-6) и интерлейкин-1 (IL-1), а с другой - увеличение внутриклеточного IL-8, хемоаттрактанта семейства CXC. В другом исследовании было показано, что КП приводит к повышению уровня провоспалительных цитокинов в плазме крови, таких как TNF, IL-8 и IL-1ra (Crucian et al. 2014), что может сопровождаться повышением температуры тела (Stahn et al. 2017). Классический гормон стресса кортизол, управляемый гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системой, или катехоламины - норэпинефрин и адреналин являются мощными модуляторами иммунных реакций (Sorrells et al 2007). Таким образом, стресс может нарушать работу иммунной системы, в частности, уменьшать продукцию активных форм кислорода моноцитами периферической крови и, как следствие, приводить к дефектному иммунному ответу на *Candida* (Buchheim et al. 2018).

Макрофаги также способны к восприятию метаболических и эндокринных сигналов, экспрессируя на своей поверхности значительное количество нейроэндокринных рецепторов (Jurberg et al. 2018), демонстрируя различные функциональные фенотипы. Провоспалительный (классически активированный) фенотип запускается IL-12 и IFN- γ и участвует в иммунной защите или восстановлении тканей, в то время как гетерогенная группа макрофагов противовоспалительного типа, запускаемая Th2 цитокинами, такими как IL-4, IL-10, стимулируя эозинофильные реакции и атопию, или глюкокортикоиды и TGF- β , ускоряя процессы заживления тканей (Jurberg et al. 2018).

В недавних исследованиях был выявлен ряд дерматологических симптомов, сопровождаемых аллергией и гиперчувствительностью, а также стойкими кожными высыпаниями у астронавтов на борту МКС (Crucian et al. 2016), что свидетельствует о серьёзных нарушениях в работе иммунитета во время КП (Crucian et al. 2016).

В конце 2010-х годов был разработан специальный тест *in vitro* (Immumed Inc., Германия), который оценивает иммунный ответ по выработке цитокинов после инкубации цельной крови с соответствующими антигенами. Предварительные данные, полученные с применением данного анализа после 6-месячных полётов на МКС (Buchheim et al. 2019), показали значительное ослабление противовирусного иммунитета, что подтверждает выявленная ранее реактивация латентных вирусных инфекций во время КП. Интересно, что иммунный ответ цельной крови (TNF и IL-1 β) после стимуляции смесью грибковых антигенов был выше после КП по сравнению с исходным уровнем и количественно выше, чем ответ на другие антигены. Концентрация цитокинов IL-1 β в плазме крови также была значительно повышена во время полёта, что согласуется с результатами, полученными ранее (Crucian et al. 2014), но при этом возвратилась к исходным значениям уже на первые сутки после посадки (Buchheim et al. 2019). До сих пор остается неясным, с чем может быть связано увеличение продукции цитокинов в ответ на стимуляцию грибковыми Аг. По-видимому, это может быть связано с превалированием ответа врождённого иммунитета или увеличением нагрузки на иммунную систему за счёт β -глюканов клеточной мембраны грибов, количество которых сильно повышается за счёт агрессивной колонизации поверхностей МКС грибами. (Novikova et al 2006), а также их поразительно более агрессивные черты (Knox et al. 2016; Romsdahl et al. 2018).

До сих пор остаётся открытым вопрос о том, может ли длительный КП ещё больше усилить это провоспалительное состояние, некоторые типичные особенности которого были обнаружены у астронавтов (Crucian et al. 2016, Mehta et al. 2017).

Интересно, что наблюдаемые изменения в типопозе, обусловленные стрессом КП (Benjamin et al. 2016), напоминают иммунное старение, сходное по своим характеристикам, наблюдаемым у пожилых пациентов (Bauer et al 2016; Pawelec et al 2006; Sanada et al. 2018). Данные наблюдения безусловно лягут в основу будущих исследований.

КП оказывает влияние и на систему PRR клеток врождённого иммунитета. Было показано, что после завершения длительных космических экспедиций наблюдается увеличение содержания главных эндогенных лигандов TLR2 и TLR4 - HMGB1, а также HSP60, HSP70. Одновременно с повышением уровня эндогенных лигандов TLRs у большинства космонавтов происходит увеличение содержания моноцитов и гранулоцитов периферической крови,

экспрессирующих на мембране TLR2 и TLR4 (Crucian et al 2014). Описанные изменения могут обуславливаться превалирующей эндогенной активацией PRR во время КП или, что более вероятно, на этапе посадки.

Одними из наиболее изученных клеток в плане влияния условий КП являются NK-лимфоциты. Первые исследования функциональной активности NK были проведены у советского космонавта после 185-дневного полёта на станции "Салюте-6" в 1980 году, после чего цитотоксическая активность NK была исследована после длительных полётов на "Салют-6,7", "Мир" и МКС у 88 членов экипажа (Konstantinova et al 1991; Konstantinova et al. 1993; Rykova et al. 2001, 2008). Продолжительность полёта варьировалась от 65 до 438 суток. Проведенные исследования показали высокую степень индивидуальной изменчивости цитотоксической активности NK. Таким образом, более чем у 60% членов экипажа после длительных полетов наблюдалось снижение цитотоксической активности NK по сравнению с предполетными значениями. На первые сутки после посадки снижение цитотоксической активности было умеренным у 15 из 74 космонавтов (снижение на 20-50%), средним у 17 космонавтов (снижение на 51-90%) и в значительной степени у 7 космонавтов (цитотоксичность была близка к нулю). На 7-9-е сутки после посадки цитотоксическая активность NK только у 4 членов экипажа увеличилась до своих предполётных значений, но у 16 космонавтов цитотоксическая активность NK продолжала снижаться. Исследование, проведённое с участием космонавтов с четырнадцатых по девятнадцатые сутки после посадки, выявило снижение цитотоксической активности NK-лимфоцитов 30% всех обследованных космонавтов. В отличие от полётов равной продолжительности на космической станции "Салют", в которых 100% обследованных членов экипажа демонстрировали более низкую активность NK после КП, не у всех космонавтов с орбитальной станции "Мир" и МКС было обнаружено снижение функциональной активности NK на первые сутки после длительных полётов. Кроме того, по сравнению с дополётными данными у некоторых космонавтов было отмечено усиление цитотоксической активности NK-лимфоцитов, как правило приближающаяся к фоновым значениям в течение 7 дней после завершения КП. В результаты проведённых экспериментов были выявлены 4 различных типа реакций NK-клеток на условия длительных космических экспедиций. Первый тип - это снижение цитотоксической активности NK-лимфоцитов на первые сутки после завершения длительных КП с последующим восстановлением до фоновых значений в течение 7 дней после посадки. Второй тип реакции - это отсутствие изменений цитотоксической функции NK-лимфоцитов на первые сутки после завершения КП и её снижение на седьмые сутки после посадки. Третий тип реакции — это снижение цитотоксической активности NK-клеток на первые сутки после посадки с

сохранением динамики вплоть до седьмых суток реадаптации к земным условиям. Четвёртый тип реакции- повышение цитотоксичности естественных киллеров на первые сутки после завершения КП с тенденцией к восстановлению до фоновых значений (Рыкова М.П. 2013).

НК-клетки осуществляют свою цитотоксичность последовательным образом, что включает в себя несколько стадий:

а) образование конъюгата между НК-лимфоцитом и клеткой-мишенью; б) передачу активных веществ; в) диссоциацию клетки-мишени и НК. Диссоциированный НК может перезапускаться и связываться с новыми целями, запуская в них процессы апоптоза. (Ullberg et al 1981). Для определения характера изменений активности НК после длительных полётов были проведены исследования НК-клеток в агарозном геле с моноклеарными клетками (Grimm et al 1979). С помощью этого метода стало возможным оценить способность эффекторных клеток связываться с клетками-мишенями, литическую активность НК в образующихся конъюгатах и процент активных НК. Обследование 27 космонавтов, совершивших КП на борту отечественной орбитальной станции "Мир" в течение 2-12 месяцев, выявило значительное снижение числа лимфоцитов, связывающих клетки-мишени, и процента активных НК в моноклеарах периферической крови (PVMCs) в течение 7 дней после посадки (Meshkov et al 1995). В большинстве случаев эти изменения коррелировали со снижением общей цитотоксической активности НК-лимфоцитов. Индукция многих эффекторных функций НК-лимфоцитов, включая, собственно, цитотоксичность, запускается при контакте НК со своей клеткой-мишенью. Поэтому вероятным объяснением обнаружения снижения цитотоксической активности НК у членов экипажа после длительных КП может быть дефект начальной стадии формирования иммунологического синапса НК и клетки-мишени. Поскольку ранние этапы формирования иммунологических синапсов требуют заякоревания интегриновым семейством молекул адгезии (Orange 2008), представляется возможным, что НК космонавтов не способны "прилипнуть" к своим клеткам-мишеням, что приводит к дефектной цитотоксичности, основанной на низкоафинных иммунологических синапсах. Эта гипотеза подтверждается наблюдением выраженного снижения экспрессии молекул адгезии CD11b на НК-лимфоцитах после завершения КП по сравнению с предполетными значениями. Стоит отметить, что КП не вызывал значительных изменений в событиях, которые происходят после взаимодействия между НК-лимфоцитом и клеткой-мишенью. В то же время, после 179-суточного полёта на борту космической станции "Мир" суммарная цитотоксическая активность НК у одного космонавта значительно снизилась, но способность лимфоцитов связывать клетки-мишени практически не изменилась. Это может объясняться ингибированием функции НК-лимфоцитов, которые ранее уже участвовали в процессах клеточной цитотоксичности. В последние годы

ведутся споры о том, отражают ли изменения в распределении клеток изменения общей цитотоксической активности NK-лимфоцитов. По-видимому, изменения в циркулирующем количестве NK-клеток составляют большую часть изменения общей цитотоксической активности NK-лимфоцитов после длительных КП. Таким образом, у большинства членов экипажа снижение общей цитотоксической активности NK-лимфоцитов после посадки сопровождалось аналогичным снижением процента циркулирующих $CD3^+CD56^+CD16^+$ клеток. Однако не все эффекты влияния длительных КП на общую цитотоксическую активность NK можно объяснить исключительно изменениями числа NK-клеток. В частности, у некоторых космонавтов относительное содержание NK-клеток не только не было изменено, но даже наблюдалась выраженная тенденция к повышению по сравнению с дополётными значениями, при этом уровень цитотоксичности NK-лимфоцитов был снижена. У других членов экипажей содержание в периферической крови естественных киллеров был снижен, но общая цитотоксическая активность NK-лимфоцитов была значительно повышена. Эти результаты показали, что исследования влияния условий КП на NK-лимфоциты должны включать одновременное изучение активности и количества NK-клеток (Рыкова М.П. 2013).

В последнее время NK-лимфоциты были классифицированы по группам в зависимости от уровня экспрессии CD56 (CD56 dim и bright) (Cooper et al. 2001). $CD56^+dim$ NK-лимфоциты преобладают среди других популяций естественных киллеров периферической крови, составляя порядка 95% от всей популяции, и проявляют высокие уровни экспрессии рецептора CD16 - Fc- γ III. В лимфоцитах с фенотипом $CD56dim$ ex vivo содержится детектируемый перфорин опосредующий функцию цитотоксичности. Напротив, $CD56bright$ NK проявляют низкие уровни содержания перфорина, но высокие уровни цитокинов и считаются важной провоспалительной и регуляторной субпопуляцией. (Iniesta P et al 2018). За прошедшие годы было сделано лишь несколько попыток дополнительно изучить особенности распределения субпопуляций NK-лимфоцитов во время стресса. Так, Bosch и соавторы (Bosh et al 2005) показали, что острый психологический стресс увеличивает количество цитотоксических $CD56dim$ NK-клеток без изменения регуляторных показателей $CD56bright$ NK. И наоборот, длительные стрессоры, такие как месяц интенсивных соревновательных спортивных тренировок вызывали увеличение количества $CD56bright$ NK-лимфоцитов, но не изменяли количество $CD56dim$ NK (Suzuki et al. 2004). В то же время обследование девяти космонавтов, совершивших 187-196-дневные полеты на борту МКС, показало, что количество $CD56dim$ и $CD56bright$ NK (среди $CD16^+CD56^+$ и $CD16^-CD56^+$ NK-лимфоцитов) уменьшалось в течение первых 7 дней после посадки. Полученные данные свидетельствуют о том, что условия космических экспедиций способны приводить не только к снижению количества циркулирующих NK-лимфоцитов с высокой

цитотоксической активностью, но и к снижению уровня основной цитокинпродуцирующей субпопуляции NK-клеток.

Хорошо известно, что цитокины приводят к активации NK-клеток (Widowati W et al 2020), в частности, IL-2 быстро индуцирует экспрессию CD69 (Romee R et al 2012). Этот активационный антиген представляет собой триггерный поверхностный маркер NK-клеток, поскольку его стимуляция является пусковым сигналом каскада реакций цитолитической активности. (Grudzien M et al 2018.) Помимо своей роли в цитотоксичности NK-лимфоцитов, CD69 участвует в регуляции других функций, например таких как синтез фактора некроза опухоли и продукция других функционально значимых активационных антигенов, в первую очередь ICAM-1, при помощи мобилизации Ca^{2+} (Borrego et al. 1999).

У десяти космонавтов, совершивших длительный КП на МКС была оценена экспрессия CD69 на мембране NK-клеток, индуцированных IL-2. Было показано значимое снижение содержания CD56⁺ NK, экспрессирующих CD69 на первые и седьмые сутки после посадки. Такой эффект может частично отражать снижение функционального потенциала NK-лимфоцитов после длительного КП. Интересно, что длительность КП не оказывает существенного влияния на состояние цитотоксической активности NK-клеток. Стоит отметить, что у некоторых космонавтов наблюдалась достаточно высокая активность NK -клеток даже после КП, длительностью 12-15 месяцев (Рыкова М.П., 2013).

Отличительной особенностью орбитальных станций “Мир” и МКС по сравнению с космической станцией “Салют” является введение системы профилактики, включающей физические методы, направленные на поддержание распределения жидкостей на уровнях, близких к земным; физические упражнения и нагрузочные костюмы, направленные на загрузку опорно-двигательного аппарата и сердечно-сосудистой системы; меры, предотвращающие потерю жидкостей, главным образом водно-солевые добавки, способствующие поддержанию ортостатической толерантности и выносливости к гравитационным перегрузкам при возвращении на Землю; сбалансированное питание и медикаменты, направленные на коррекцию возможных негативных реакций организма на невесомость. Выполнение протоколов контрмер в полете тщательно контролировалось (Kozlovskaya et al 2004; Kozlovskaya et al. 1995). Относительно недавно были получены данные, свидетельствующие о сильной чувствительности NK-клеток к физическим упражнениям (Peake JM, et al 2017). Возможными механизмами, лежащими в основе вызванных физической нагрузкой изменений функции NK-лимфоцитов, является цитокиновая сеть, гипертермия и гормоны стресса, включая катехоламины, гормон роста, кортизол и бета-эндорфины. Инфузионные исследования, имитирующие уровень гормона стресса в крови во время физической нагрузки, показывают,

что повышенный уровень адреналина в плазме крови составляет, по крайней мере, часть вызванной физической нагрузкой модуляции функции NK-лимфоцитов (Capellino S, 2020). Многие исследования показали, что за тяжелой физической нагрузкой следует иммунодепрессия, но умеренная регулярная физическая нагрузка благотворно влияет на функцию $CD3^+CD56^+CD16^+$ клеток (Evans 2017). В связи с этим повышенная цитотоксичность NK-лимфоцитов после длительных космических полётов у некоторых космонавтов могла быть связана не только с индивидуальными особенностями конкретных членов экипажа, но и с выполнением космонавтами на борту комплекса профилактических мероприятий, прежде всего умеренных регулярных физических нагрузок.

Альтернативным объяснением повышения цитотоксичности NK-клеток у некоторых космонавтов после длительных КП является реактивация латентных вирусных инфекций во время КП (Pierson et al. 2005; Cohrs et al. 2008; Mehta et al. 2017). Действительно, ещё с 1970-х годов сообщалось, что нормальным ответом NK-лимфоцитов на вирусную инфекцию должно быть первоначальное повышение активности, за которым следует повышенная активность в течение инфекции, а затем постепенное возвращение к исходному уровню, в то время как количество NK-клеток может быть уменьшено во время разгара инфекции (Whiteside TL et al 1989). Более поздние исследования показали, что активация NK вирусами происходит преимущественно через не прямой путь - вовлечение цитокинов и клеточных контакт-зависимых сигналов от вспомогательных клеток (Jabrane-Ferrat N. 2019). Тем не менее, взаимосвязь NK-лимфоцитов и реактивации латентных внутриклеточных инфекций в КП до сих пор не установлена равно как до сих пор нет ответа на вопрос о том, вызваны ли наблюдаемые изменения непосредственно факторами КП или они связаны со стрессом посадки.

Основными эффекторами адаптивного иммунитета являются Т- и В-лимфоциты, обеспечивающие стойкую специфическую защиту организма и играющие важную роль в регуляции иммунного гомеостаза (Costa S et al 2019). Процесс активации Т и В-клеток сопровождается экспрессией на их поверхности специфических ранних и поздних маркёров активации. К ранним активационным маркёрам лимфоцитов принадлежит мембранный гликопротеин семейства С-лектинов CD69, экспрессируемый уже в течение нескольких часов с начала процесса активации (Cibrián D et al 2017). К более поздним маркёрам принадлежит CD25, рецептор IL-2, экспрессируемый через 24 часа с момента активации (Grywalska E, et al 2018). Зрелые активированные клетки представлены фенотипом $CD3^+HLA-DR^+$ для В-лимфоцитов и $CD3^+HLA-DR^+$ для Т-клеток. HLA-DR начинает экспрессироваться примерно через 72 часа с момента начала процесса активации (Oba R et al 2019).

Проведённые на заре пилотируемой космонавтики исследования активности Т-клеток выявили ряд негативных изменений. Так, Константиновой и др.. было выявлено снижение активности Т-клеток после длительного КП (Konstantinova et al 1973), выраженное снижение митоген-стимулированной активности синтеза РНК и ДНК лимфоцитами после 28 и 59 суточных КП было показано (Kimzey et al. 1975). Факторы КП приводят к отчётливому снижению пролиферативной активности лимфоцитов, что было показано во время КП (Cogoli et al 1984). Интересно, что условия КП приводят также к нарушению процессов бластогенеза (Hashemi et al. 1999).

Описанные выше феномены можно объяснить несколькими факторами. Во-первых, влиянием гормонов стресса, подавляющих иммунную функцию, повышенный уровень которых наблюдается после полёта (Gmunder et al. 1994; Meehan et al. 1992; Mills et al. 2001). Во-вторых, изменения могут быть связаны с непосредственным влиянием таких факторов КП, как изменённая по отношению к земной, гравитация. В последнее десятилетие были опубликованы результаты нескольких комплексных исследований состояния иммунной системы астронавтов во время кратковременных КП на борту космического Шаттла (Crucian et al. 2013), а также во время длительных полётов на МКС (Crucian et al. 2015). В первом исследовании образцы крови 19 астронавтов были взяты непосредственно перед возвращением, чтобы исключить влияния перегрузок и стресса, вызванного ими на этапе посадки и сопоставлены с 30-ми сутками после посадки. Было показано, что функция Т-лимфоцитов в эксперименте с реакцией на стафилококковый энтеротоксин была снижена во время и после кратковременного КП, равно как и вирус-специфическая реакция Т-клеток. Профили продукции цитокинов после митогенной стимуляции были значительно изменены как во время, так и после КП: синтез IFN- γ , IL-17 и IL-10 был снижен во время КП на фоне повышения продукции TNF и IL-8. Во втором исследовании осуществлялся забор крови у 23 астронавтов до, во время и после 6-месячной экспедиции на МКС. Образцы в полёте были возвращены на землю в течение 48 часов после забора для немедленного анализа. Было показано снижение функции CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов, оцениваемое по экспрессии ранних и поздних маркёров активации (CD69 и CD25), которое сохранялось в течение всего КП, причём снижение функциональной активности реакции происходило на различные митогены, что предполагает сдвиг порога активации. Значительное снижение синтеза митоген-стимулированных цитокинов таких как IFN- γ , IL-10, IL-5, TNF и IL-6 сохранялось во время всего КП.

Как было описано выше, цитокины являются сигнальными молекулами иммунной системы и отвечают за межклеточное взаимодействие, рекрутирование и активацию иммунокомпетентных клеток. Они регулируют тип, интенсивность и продолжительность любой

иммунной реакции. Цитокины обычно обладают коротким периодом полураспада и функционируют в сверхнизких концентрациях. Связывая соответствующие рецепторы на поверхности клеток-мишеней, цитокины могут индуцировать экспрессию генов активации, запускать синтез новых белков и инициировать пролиферацию и функцию клеточных эффекторов. CD4⁺-клетки являются основными цитокин-продуцирующими клетками адаптивного иммунитета, регулируя протекания иммунных реакций по клеточному или гуморальному типу, а также внося существенный вклад в инициацию или терминацию иммунного ответа. Последние достижения в области цитокиновой биологии выявили несколько специфических категорий Т-клеточных иммунных реакций, основанных на специфических паттернах экспрессии цитокинов. Этими категориями являются Th1-/Th2-/Th9-/Th17-клеточные реакции, обладающие не только локальными эффектами на моноцитарно-макрофагальные и лимфоидные факторы врождённого и адаптивного иммунитета, но и системным действием на отдаленные органы и ткани других физиологических систем. Эти категории цитокинов обычно ингибируют продукцию друг друга, поэтому может быть реализовано только одно иммунное смещение. Правильная регуляция цитокинов Т-клетками важна для нормального функционирования системы иммунитета; смещение баланса в ту или иную сторону может привести к развитию серьёзных патологий. Так, ревматоидный артрит является Th17-опосредованным заболеванием, в то время как чрезмерные Th2-реакции могут привести к аллергии и гиперчувствительности (Jager et al 2010).

Было проведено достаточно большое количество исследований, в которых изучались профили продукции цитокинов, связанные с КП различной продолжительности. Встречающиеся в литературе данные о влиянии КП на продукцию цитокинов в значительной степени различаются в зависимости от продолжительности полёта, используемого митогена, сроков получения биоматериала и, наконец, выбора объекта исследования. Данные по проведённым ранее исследованиям отражены в таблице 2.

Таблица 2. Влияние факторов КП различной продолжительности на индуцированный синтез цитокинов.

Автор	Фаза полёта	Объект исследования	Клетки	Митоген	Полученные результаты
Gould et al. (1987) Sonnenfeld et al. (1988)	После, короткий	Крысы	спленоциты	Concavalin A (Con-A)	Продукция IFN γ сильно ингибирована, продукция IL-3 не изменилась

Chapes et al. (1994)	Во время, короткий		Линия макрофагов костного мозга	LPS	Выработка TNF, IL-1, IFN- β , IFN- γ повышается во время космического полета
Miller et al. (1995)	После, короткий	Крысы	Спленоциты, тимоциты	Con-A or LPS	И селезенка, и тимус секретировали повышенный уровень IL-2, но только тимус выделял повышенный уровень IL-6
Sonnenfeld et al. (1996)	После, короткий	Макаки-резус	лейкоциты		Синтез IL-1 и экспрессия рецептора IL-2 снижались после космической экспедиции
Crucian B et al. (2000)	После, короткий	Человек	Мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC)	PMA/I	Внутриклеточная продукция IL-2 снижена в CD4 ⁺ и CD8 ⁺ клетках; продукция IFN- γ снижена только в CD4 ⁺ T-клетках
Kaur et al. (2008)	После, короткий	Человек	моноциты	LPS	После КП моноциты продуцировали более низкие уровни IL-6 и IL-1 β , а также более высокие уровни IL-1 α и IL-8
Gridley et al. (2009)	После, короткий	Мышь	Спленоциты	Anti-CD3	Снижение продукции IL-2, увеличение синтеза IL10, IFN γ , MIP-1 α после кратковременного космического полета
Fitzgerald et al. (2009)	Во время	Человек	Лимфоидная ткань	Polyclonal антигенный	Культура клеток на борту МКС, лимфоидные клетки не реагировали на антигенную или поликлональную стимуляцию, теряя способность продуцировать

					антитела или цитокины (клетки, стимулированные перед запуском, сохраняли свою способность на борту МКС)
Gridley et al. (2009)	После, короткий	Мышь	Спленоциты	LPS	Отмечено повышение продукции IL-6 и IL-10.
Morukov et al. (2010)	После, короткий	Человек	PBMC	LPS + PHA	Изменения баланса Th1/Th2 после КП в сторону Th2
Mehta et al (2013)	Во время, длительный	Человек	Плазма	Нет	Содержание IL-10, IFN α , IFN γ , IL-1 β , IL-4, IL-12 и TNF было значительно повышено во время КП
Crucian et al. (2015)	Во время, длительный	Человек	PBMC	Anti-CD3, PMA+I	Наблюдалось снижение продукции различных цитокинов Th1, Th2 и Th17

Как видно из таблицы 2, факторы КП оказывают существенное влияние не только на индуцированную продукцию цитокинов, но и на их содержание в плазме крови (Mehta et al 2013). Данные, полученные разными исследователями, довольно гетерогенны, однако в процессе анализа можно прийти к некоторым общим выводам. Установлено, что продукция IFN- γ подавляется во время/после КП, вне зависимости от использованных объектов и условий полёта (Gould et al 1987; Sonnenfeld et al 1988; Crucian et al. 2000, 2008), а изменение синтеза провоспалительных цитокинов, таких как IL-1, IL-6, IL-8 носит разнонаправленный характер (Chapes et al. 1994; Miller et al. 1995; Sonnenfeld et al. 1996; Kaur et al. 2008)). Разными авторами подтверждается и сдвиг баланса Th1/Th2 в сторону усиления Th2 ответа во время и после завершения КП (Crucian et al. 2008, Morukov et al 2010). Сдвиг в сторону Th2 косвенно подтверждается другими доказательствами, такими как снижение клеточного иммунитета во время КП (Taylor et al 1992). В конце прошлого столетия Sonnenfeld и Miller предположили, что изменения цитокинов во время КП не будут затрагивать тотальное “отключение” цитокиновой сети, а скорее будут включать селективные изменения их баланса и функций (Sonnenfeld et al 1993), что в последствии было подтверждено рядом авторов (Fitzgerald et al. 2009) Для полного понимания роли цитокиновой дисрегуляции при действии на организм человека условий КП и

определения связанных с ней клинических рисков потребуются ряд дополнительных исследований с использованием полученных комплексных цитокиновых массивов.

В-клеточное звено адаптивного иммунитета не было исследовано в такой же степени, как Т-клеточное звено. Проведённые исследования не выявили у космонавтов изменений в концентрации иммуноглобулинов и их изотипов Ig (Fuchs and Medvedev 1993) за исключением IgA, отмеченное Константиновой И.В. и др. (Konstantinova et al 1993) Аналогичные результаты были получены у американских членов экипажей после полётов на космических шаттлах (Stowe et al. 1999) и у российских космонавтов после длительного полета на борту космических станций (Rykova et al. 2001; 2008).

К настоящему времени существует лишь одна работа, описывающая состояние гуморального иммунного ответа в условиях КП. Взрослые особи P.Waltl были иммунизированы во время 5-месячного пребывания на борту космической станции "Мир" Параллельно на Земле другие P.Waltl того же возраста и пола были выращены в лаборатории в тех же условиях, что и те, которые находились на борту космической станции и иммунизированы тем же антигеном. Количественная оценка IgY (физиологический аналог человеческого IgA —Schaerlinger et el. 2008) и мРНК тяжелой цепи IgM в селезенке этих животных показало, что уровень транскрипции IgM не был затронут у животных, находящихся на орбитальной станции, в то время как уровень транскрипции IgY был по крайней мере в три раза выше в ткани селезенки животных, иммунизированных на борту станции "Мир" (Boxio et el. 2005). Эти данные подтверждают увеличение IgA, ранее отмеченное у космонавтов Константиновой и др. (1993). Наблюдаемое увеличение может быть результатом роста числа IgY-продуцирующих В-клеток.

Более детальное изучение гуморальных реакций амфибий выявили индуцированные космическим полетом изменения в экспрессии сегментов генов VHII и VHVI, принимающих непосредственное участие в синтезе специфических антител в ответ на антигенную стимуляцию. Подгруппы VHII и VHVI были обнаружены в 28% и 58% случаев IgM тяжелых цепей у животных, иммунизированных на Земле, соответственно, и в 61% и 24% тяжелых цепей IgM у животных, иммунизированных на борту станции «Мир». Точнее, было показано, что P.waltl, которые были иммунизированы на Земле или в космосе, использовали тот же самый сегмент гена VII для построения своих тяжелых цепей IgM, но экспрессия этого сегмента была в два раза выше в условиях космического полета. Было также показано, что животные, иммунизированные на Земле, использовали четыре различных сегмента гена VHVI для построения своих тяжелых цепей IgM, в то время как животные, иммунизированные на борту «Мир», использовали только два из них. Сильное снижение экспрессии тяжелых цепей мРНК IgM, кодируемых сегментами VHVI.A и VHVI.B, были отмечены у животных во время КП

(Bascove et al. 2009). Эти данные указывают на то, что животные, находящиеся в условиях КП экспрессировали другие варианты мРНК тяжелой цепи Ig по сравнению с животными, иммунизированными на Земле. Наконец, были проанализированы соматические гипермутации в вариабельных доменах тяжелой цепи (VH) IgM-антител. Соматические гипермутации позволяют В-лимфоцитам повышать avidность связывания с сайтами антител. Исследование показало, что соматическая гипермутация происходит в космосе после иммунизации, но с частотой в два раза меньшей, чем на Земле (Bascove et al. 2011). Это наблюдение позволяет предположить, что во время КП может происходить нарушение гуморального иммунного ответа.

Исследование репертуара IgM космонавтов после полёта на МКС с использованием технологии секвенирования показало, что репертуар IgM космонавтов отличался от репертуара контрольных испытуемых до старта и что у двух из пяти проанализированных космонавтов наблюдались значительные изменения в репертуаре IgM во время полета. Эти модификации сохранялись до 30 дней после посадки, и, вероятно, влияли на специфичность сайтов связывания IgM, а также коррелировали с изменениями в процессе рекомбинации V(D)J, ответственном за создание антител генов. Эти данные подтверждают гипотезу о том, что иммунная система примерно половины космонавтов, проводивших на МКС 6 месяцев, чувствительна к условиям КП и индуцирует индивидуальные реакции, указывающие на то, что меры профилактики, разрабатываемые как для орбитальных, так и для межпланетных полётов должны опираться на подходы персонализированной медицины (Buchheim et al. 2020).

1.2.3.1. Наземные аналоговые исследования

Во время КП действует целый комплекс факторов, оказывающих воздействие на систему иммунитета. Система наземных модельных исследований применяется для двух основных задач:

- 1) понять, насколько конкретный фактор оказывает существенное влияние на состояние иммунитета и изучить механизмы его действия;
- 2) апробировать систему профилактики, направленной для нивелирования негативных эффектов воздействия данных факторов. Кроме того, важно отметить, что часто отсутствует техническая возможность проведения тех или иных экспериментов на борту орбитальной космической станции. Для моделирования эффектов космического полёта используются аналоги, в которых в качестве объекта исследования выступает сам человек, животные, а также клеточные культуры. В роли аналогов, в которых исследования проводятся с участием человека, выступают изоляция в гермообъекте с искусственным микроклиматом, антиортостатическая гипокинезия, “сухая” иммерсия, параболический полёт, центрифуги, а

также установки, создающие гипоманнитные условия. Для животных, в первую очередь грызунов, дополнительно применяют систему с вывешиванием, а удобной моделью создания эффектов микрогравитации для клеточных культур выступают так называемые клиностаты, постоянно меняющие градиент гравитационного поля для помещенных в него клеточных культур, а также специальные высокие башни, в которых клеточная культура находится в течение нескольких секунд в свободном падении.

Стоит отметить, что к настоящему времени для иммунной системы не существует какой-то одной ключевой модели, как например для опорно-двигательной системы, для которой главным фактором является микрогравитация, действие которой изучается в соответствующих экспериментах. Подавляющее большинство факторов отражаются на процессах работы системы иммунитета, будь то изоляция или моделируемая невесомость, поэтому исследования проводятся с использованием разных по своей физической природе аналогов.

В проведенных ранее исследованиях было показано, что во время параболического полёта снижается экспрессия CD3 и IL-2 рецепторов на мембране Т-лимфоцитов, (Tauber et al 2015) а также снижается способность нейтрофилов генерировать активные формы кислорода в ответ на активацию fMLP $\pm$ TNF после параболического полета по сравнению с предполётными значениями, при этом спонтанная продукция активных форм кислорода не изменилась. (Kaufmann et al. 2009). В других работах было показано усиление способности аденозина, важного иммуносупрессора (Sitkovsky et al., 2004), снижать генерацию АФК после параболического полёта. (Kaufmann et al., 2011).

В отличие от параболического полета, АНОГ и СИ позволяют исследовать долговременное воздействие моделируемых эффектов микрогравитации на состояние различных физиологических систем человека, включая и иммунную систему. Эффекты АНОГ могут быть реализованы путём перераспределения жидкостей или нейроэндокринных механизмов и тогда здесь ведущую роль играет фактор психологического стресса. Было показано, что 120-суточная АНОГ с углом наклона 6° привела к повышению уровня стресса и изменению циркадности кортизола. В данном эксперименте было выявлено увеличение количества фагоцитов и NK-лимфоцитов. Кроме того, наблюдалось повышение β 2-интегрина, выполняющего адгезионные функции на поверхности нейтрофилов и повышение уровня IL-6, свидетельствующего о провоспалительном состоянии (Chouker et al., 2001). В других исследованиях АНОГ также было выявлено повышение провоспалительного цитокина -TNF (Shearer et al. 2009). В работе Crucian et al., 2009 было показано, что продолжительная АНОГ не приводит к специфичным изменениям адаптивного иммунитета, которые наблюдаются у астронавтов в КП. Например, на протяжении всего эксперимента с гипокинезией не было

обнаружено изменения в общем числе лейкоцитов или процентном содержании нейтрофилов. Кроме того, не было выявлено значительных изменений в субпопуляционном составе лимфоцитов и функциональной активности Т-клеток.

В недавнем эксперименте было показано, что ранняя адаптация к условиям АНОГ (первые 5 суток) сопровождается повышением экспрессии CD62L нейтрофилами без какого-либо системного воспалительного ответа. Авторы выдвинули теорию о возможности повышения экспрессии вследствие перераспределения жидкости (Feuerecker et al. 2012).

Влияние АНОГ на иммунитет человека в настоящее время является спорным и, вероятно, зависит от различной продолжительности и условий проведения эксперимента (Crucian et al. 2009; Mehta et al. 2007). В эксперименте Crucian et al 2009 не было обнаружено изменений в уровне гормона стресса (кортизоле) в слюне и плазме во время АНОГ. Активация гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы наряду с реактивацией латентных вирусных инфекций в данном исследовании также не наблюдалась (Mehta et al. 2007). Это, вероятно, объясняет отсутствие иммунных изменений при длительном АНОГ, а также указывает на то, что иммунные изменения, наблюдаемые во время КП, не связаны с эффектами физической детренированности.

Интересный эксперимент был проведён в 2008 году. Была разработана модель на основе АНОГ и центрифуги, имитирующая действия сразу нескольких факторов КП: перегрузок и микрогравитации. В исследовании был использован тот же профиль величин ускорения, что и у астронавтов на этапах вывода космического корабля на орбиту и возвращения на Землю. Для воспроизведения микрогравитации между симуляцией взлёта и посадки, испытуемые подвергались АНОГ в течение 16 суток. В ходе эксперимента происходило сравнение уровня гормона стресса и субпопуляций лейкоцитов с результатами 9- и 16-суточных миссий космического Шаттла (Stowe et al., 2008).

Сначала авторы сравнивали данные по уровню гормона стресса из описанной выше модели с прежними результатами из реальных КП. Исследование показало, что пик кортизола был обнаружен сразу после симулированного взлёта. После моделирования взлёта не было обнаружено увеличения катехоламинов в моче, но их уровень был значительно повышен после симуляции приземления. Это соответствует данным, полученным после кратковременных КП на Шаттле. (Stowe et al., 2003). Как и в миссиях Шаттла, уровень кортизола в плазме был значительно снижен при симуляции приземления. У всех испытуемых в проведённом АНОГ не было выявлено значимого увеличения общего числа лейкоцитов и нейтрофилов после симулированного приземления. Лимфоциты были значительно увеличены после 16-суточной АНОГ, в то время как незначительное увеличение лимфоцитов было также показано после 16-

суточных КП. После 9-суточных миссий никаких изменений обнаружено не было. Количество моноцитов было значительно увеличено при моделировании посадки. Незначительное увеличение количества моноцитов было обнаружено после 9-суточных КП, тогда как значительное уменьшение было обнаружено после 16-суточных миссий. После 9-суточных КП и 16-суточной АНОГ количество эозинофилов значительно снизилось. Различия в распределении нейтрофилов, моноцитов и эозинофилов после вращения на центрифуге опровергают возможность гемоконцентрации как потенциального объяснения перераспределения циркулирующих лейкоцитов. В целом, полученные результаты свидетельствуют о том, что вызываемый перегрузками на этапах взлёта и посадки стресс является одной из ведущих причин выявляемых после КП изменений в иммунной системе человека.

Ещё одной моделью действия эффектов микрогравитации является СИ. В эксперименте с 7-суточной СИ было показано увеличение общего числа лейкоцитов на 7 сутки эксперимента по сравнению с фоновыми значениями. Также было отмечено повышение абсолютного содержания лимфоцитов за счёт $CD3^+CD4^+$ клеток.

Анализ динамики индивидуальных значений выявил у большинства обследованных существенное (более 20% от фона) увеличение содержания в периферической крови цитотоксических лимфоцитов и В-клеток. В этом же исследовании было показано, что условия СИ не оказали влияния на спонтанную и индуцированную продукцию цитокинов монулеарными клетками периферической крови. При этом индивидуальный анализ выявил у большинства добровольцев-испытателей снижение в условиях СИ соотношения ИФН- γ /ИЛ-10, а также ИФН- γ /ИЛ-4, отражающих Th1/Th2 баланс, что говорит о смещении баланса в сторону преобладания гуморального типа реагирования, повышая вероятность дифференцировки лимфоцитов по Th2 пути. В проведённом исследовании не было показано достоверных изменений как абсолютного, так и относительного содержания естественных киллеров в периферической крови, равно как и статистически значимых изменений в гуморальном иммунитете. Уровень иммуноглобулинов (IgG, IgA, IgM), не выходил за пределы физиологических норм и достоверно не менялся на протяжении эксперимента (Берендеева и др. 2009).

В пятисуточной СИ было показано, что со стороны врождённого иммунитета человека наблюдается гетерогенная реакция на пребывание в условиях экспериментального воздействия. Было выявлено две группы лиц, у одних было показано повышение моноцитов и гранулоцитов периферической крови, экспрессирующих на своей мембране TLR2, TLR4, и TLR6. У второй группы испытуемых-добровольцев было показано их снижение. Примечательно, что число

моноцитов и гранулоцитов, экспрессирующих на своей мембране эндоцитозные PRR, такие как CD206, CD36, Fc-рецептор (CD16), а также молекулы межклеточной адгезии (CD24 CD54, CD11 CD18), практически не меняется на протяжении эксперимента (Пономарев С.А. и др., 2011).

Отсутствие гравитационной силы - лишь один из многих стрессоров, влияющих на человека в космосе. Длительные периоды социальной изоляции, сенсорная монотония, ограничение личного пространства, и коммуникаций, высокая автономность и нарушение циркадных ритмов- это те основные факторы, оказывающие (Salam et al, 2012) влияние на организм человека, в частности на иммунное равновесие. Изоляционные эксперименты как правило проводятся либо в специально построенных для этого комплексах, имитирующих внутреннюю среду космического корабля, либо на арктических и антарктических станциях.

За последние несколько десятилетий в рамках описанных выше моделей был проведен ряд экспериментов, оценивающих влияние факторов, связанных с изоляцией на иммунитет человека. В 240-суточном изоляционном проекте SFINCSS были получены свидетельства активации системы естественной резистентности, что проявляется в увеличении количества нейтрофилов, экспрессирующих $\beta 2$ -интегрин на поверхности нейтрофилов (Chouker et al., 2002).

В эксперименте с 520-суточной изоляцией шести добровольцев испытуемых (проект “Марс-500”) наблюдалось снижение числа моноцитов и гранулоцитов с фенотипом $TLR2^+$, $TLR4^+$, а также $TLR6^+$ начиная со 120 суток изоляции, сохраняющееся до конца эксперимента. При этом отмечалось увеличение фагоцитарной функции моноцитов и гранулоцитов практически на протяжении всего экспериментального воздействия. В этом же эксперименте было показано снижение функциональной активности NK-лимфоцитов после 120 суток пребывания в изоляции в гермокомплексе, проявляемое в снижении экспрессии раннего маркера активации-CD69 в стимулированных и в не стимулированных IL-2 клеточных культурах наряду с относительным и абсолютным снижением содержания NK-клеток (Моруков Б.В., 2013) Также было показано увеличение продукции АФК клеточными факторами врождённого иммунитета на всём периоде экспериментального воздействия (Strewe et al. 2015)

Адаптация приобретённого иммунитета к условиям 520-суточной изоляции сопровождалось увеличением числа $CD3^+CD4^+$ и $CD3^+CD8^+$ лимфоцитов практически на всём протяжении эксперимента по сравнению с фоновыми значениями, в то время как количество В-лимфоцитов снижалось на 168 сутки изоляции, достоверно не меняясь в другие временные точки. Увеличение содержания Т-хелперов достигалось за счёт увеличения клеток памяти с фенотипом $CD4^+CD45RO^+$ и “наивных” Т-клеток $CD4^+CD45RA^+$. Число регуляторных Т-клеток

CD4⁺CD25^{+bright} на протяжении изоляции практически достоверно не изменялось, однако у трёх членов экипажа наблюдалась тенденция к увеличению их числа. Также после пяти месяцев эксперимента наблюдалось достоверное увеличение функциональной активности Т и В-лимфоцитов, проявляемое в повышении экспрессии активационного маркера CD69. Кроме того, было показано увеличение ФГА-индуцированной продукции цитокинов CD4⁺ лимфоцитами с выраженным смещением баланса в сторону Th2-опосредованного иммунного ответа.

Уровень антител классов А, М, G в сыворотке крови достоверно не менялся в течение всего эксперимента (Моруков Б.В., 2013). Интересно, что на протяжении почти всего периода изоляции была отмечена активация эндоканнабиноидной системы и повышенной концентрации кортизола в слюне (Jacubowski et al. 2015; Yi et al. 2014, 2015)

Говоря об изоляционных факторах, нельзя обойти стороной полярные зимовки. Большинство полярных станций являются прибрежными, характеризуются сравнительно умеренными температурами и более простым с точки зрения логистики морским или воздушным транспортом по сравнению со станциями, расположенными на высоком внутреннем плато Антарктики. Условия на внутренних станциях более жесткие в плане температур, высоты и изоляции. Многие психосоциальные стрессоры во время зимовки в Антарктике крайне схожи по происхождению и степени с теми, что предстанут перед космонавтами во время длительных КП (Palinkas et al., 2000; Salam, 2012).

Все эти стрессоры усиливаются на внутриматериковых станциях, делая их более подходящими в качестве аналога глубокого космоса. Станции Восток и Конкордия возможно являются одними из лучших аналогов длительного КП или жизни на другой планете.

Исследования системы иммунитета во время антарктической зимовки. (Mehta et al. 2000) выявили реактивацию вируса Эпштейна-Барр (ВЭБ) на фоне снижения клеточного иммунного ответа. В другом исследовании (Zwart et al. 2011) было показано, что у участников с высоким уровнем кортизола и витамина D в сыворотке крови реже происходила реактивация вируса Эпштейна-Барр. Данные также доказывают, что витамин D во время стресса способен снижать риск реактивации латентных вирусов во время зимовки. Интересно, что гуморальный иммунитет почти не меняется в течение пребывания в условиях Антарктики (Shearer et al., 2001). Следует отметить, что схожие данные получаются и во время КП, факторы которого оказывают большее воздействие на клеточный иммунитет, чем на гуморальный.

Примечательное исследование было проведено на немецкой антарктической станции Неймар III, главной целью которого было выявление гендерных различий в реакциях иммунной и нейроэндокринной систем на длительную зимовку. В зимовке принимало участие 10 женщин и 16 мужчин. В ходе эксперимента было показано, что уровень кортизола у женщин был выше,

чем у мужчин, в то время как уровень катехоламинов был выше у мужчин. Других межгендерных отличий выявлено не было. При этом было показано существенное влияние факторов антарктической зимовки на состояние иммунитета как мужчин, так и женщин. Так, было выявлено повышение общего количества лейкоцитов, лимфоцитов и гранулоцитов в течение всего периода антарктической зимовки. Наряду с клеточными факторами, характеризующими состояние системы иммунитета, в данном эксперименте изучалось содержание цитокинов в сыворотке крови, а также синтез цитокинов в стимулированных и нестимулированных клеточных культурах. В качестве изучаемых параметров были выбраны IFN- γ , IL-10, IL-2 и TNF. Результаты эксперимента показали, что уровень цитокинов в сыворотке крови достоверно изменялся только для IL-2 во второй месяц пребывания на станции. Индукцию выработки цитокинов проводили на цельной гепаринизированной крови. Стимулированный фунгальными антигенами (*Candida*) синтез привёл к увеличению секреции IFN- γ на 4 и 6 месяцы пребывания, а также IL-10 и IL-2 после завершения изоляции. При стимулировании PWM наблюдалось достоверное повышение концентрации IFN- γ на 2 и 4 месяцы, IL-10 в первый месяц зимовки. Следует отметить, что значимых различий по сравнению с фоновыми значениями в группе мужчин было больше, однако это скорее связано с большим количеством мужчин, что позволило получить достоверные различия (Strewe C et al 2019).

1.2.3.2. Влияние гипомангнитных условий на систему иммунитета человека

Одним из факторов межпланетного перелёта являются гипомангнитные условия. К настоящему моменту исследований функционирования системы иммунитета в ГМУ крайне мало. В основном эти эксперименты были посвящены изучению про-и антиоксидантных свойств клеток врождённого иммунитета. Было показано снижение мембранного потенциала мононуклеаров крови человека, сопровождающееся изменением баланса между системами генерации и ингибирования АФК, в сторону увеличения антиоксидантной активности при кратковременной (30 мин) экспозиции цельной крови в ГМУ (Куликов и др., 2009). Снижение способности генерировать АФК наблюдается и на примере 40-минутного экспонирования перитонеальных нейтрофилов мышей в ГМУ, что свидетельствует о снижении бактерицидной активности этих клеток. Прослеживается чёткая зависимость эффекта от степени снижения индукции магнитного поля (Новиков и др. 2020). Аналогичные результаты получены также с использованием перитонеальных макрофагов и клеток костного мозга мышей после часовой экспозиции, причем прооксидантная активность мононуклеаров человеческой крови в тех же условиях экспонирования не уменьшалась (Куликов и др. 2011). Эффекты снижения способности клеток врождённого иммунитета синтезировать АФК проявлялись при экспозиции

в ГМУ не только цельной крови или культур клеток, но и живых объектов (Roman A et al 2009). Отдельно стоит подчеркнуть, что в этом исследовании использовалось очень длительное время экспозиции. Мыши провели полгода в камере с низкой индукцией МП, способность их перитонеальных макрофагов к синтезу оксида азота и супероксид-аниона снизилась на фоне одновременного увеличения числа данных клеток. При этом замедлялась физиологическая инволюция тимуса. Увеличение количества моноцитов, снижение числа макрофагов при одновременном росте их фагоцитарной активности отмечалось и при продолжительной (2-4 недели) экспозиции крыс в условиях МП слабой индукции (Dorofteiu M et al 1995). Однако есть свидетельства об усилении способности к оксидативной активности иммунокомпетентных клеток, помещенных в ГМУ, которые говорят об увеличении спонтанной продукции активных форм кислорода моноцитами и гранулоцитами в человеческом организме (Колмаков 2002).

1.2.3.3. Влияние моделируемой микрогравитации на иммунокомпетентные клетки in vitro

Описанное выше исследование действия факторов КП на систему иммунитета проводилось в системе *in vivo*, что не позволяет исключить влияние нейроэндокринных механизмов. Для того, чтобы проверить, воздействует ли напрямую физический фактор на систему иммунитета, необходимо проводить исследования *in-vitro*, позволяющие отсекаать нейроэндокринные влияния.

Несмотря на существенные вариации в протоколах исследования, полученные данные позволяют заключить, что действие микрогравитации индуцирует целый ряд клеточных эффектов, связанных с экспрессией поверхностных рецепторных структур, синтеза цитокинов, изменения внутриклеточного сигналинга, регуляции клеточного цикла.

Первая информация о том, что иммунокомпетентные клетки чувствительны к факторам КП, появились в начале 80-х годов XX столетия. Было показано, что мононуклеарные клетки периферической крови, полученные от здорового донора, экспонированные в течение одной недели на борту космического аппарата «Салют-6», более интенсивно синтезировали IFN- α по сравнению с клетками, находящимися на Земле (Talas et al., 1983).

Влияние микрогравитации на клетки иммунной системы начали активно изучать после публикации работы (Cogoli et al., 1984), в которой было показано, что на борту космической лаборатории «Spacelab-1», Т-клетки *in vitro* практически не отвечают на пролиферативную стимуляцию. На сегодняшний день прямое влияние микрогравитации доказано в отношении клеточных эффекторов врождённого и адаптивного иммунитета.

NGS исследование экспрессии генов активированных КонА/анти-CD28 Т-клетках крови здоровых добровольцев после культивирования в течение полутора часов на борту МКС выявил

по сравнению с земным контролем снижение экспрессии 47 генов, вовлечённых согласно Gene Ontology, в процессы регуляции клеточного цикла, проведение, синтез цитокинов, транскрипционных факторов и поверхностных рецепторов. (Chang et al., 2012). В других работах было показано, что культивирование Т-лимфоцитов на борту МКС приводит к усилению процессов апоптоза, что проявляется в увеличении фрагментации ДНК, экспрессии поли(АДФ-рибоза)-полимеразы (PARP), усилении активности 5-липоксигеназы (5-LOX), а также повышению мРНК p53 и кальпаина, (Battista et al., 2012). Схожие результаты были получены в наземных модельных экспериментах. (Gasperi et al., 2014).

Важные результаты для понимания процессов влияния разных уровней гравитации на клетки человека были получены в экспериментах на суборбитальных баллистических ракетах. Было показано, что 20 секунд экспозиции интактных CD4⁺-лимфоцитов в фазе гипергравитации и создаваемых эффектов невесомости, наблюдались однотипные изменения, проявляющиеся в понижении экспрессии Т-клеточного рецептора и поверхностной молекулы IL-2R. (Tauber et al., 2015). Следует отметить, что анализ экспрессии генов неактивированных Т-лимфоцитов линии Jurkat при культивировании в условиях параболического полёта и на борту суборбитальной баллистической ракеты выявил следующие закономерности: после 20-секундного пребывания в условиях моделируемой микрогравитации обнаружено изменение только 0,41% транскриптов, при этом после 5-минутного – 2,77%. (Thiel C. et al. 2017)

На сегодняшний день известно, что практически любой клеточный стресс приводит к разному уровневому изменению транскриптома. In vitro показано, что при действии УФ-излучения наблюдается изменение порядка 8,8% всех генов, гипоксии – 5,4%, ионизирующего излучения – 4,7% (Rieger et al 2004; Herranz et al., 2013). В связи с вышеизложенным можно считать обоснованным предположение (Thiel C. et al. 2017) о том, что микрогравитация вносит вклад в изменение экспрессии транскриптов не сильнее других экстремальных факторов.

Пилотные эксперименты, посвященные изучению влияния моделируемой невесомости на дендритные клетки, показали, что при экспозиции на RPM CD34⁺-предшественников и CD14⁺-моноцитов, выделенных из периферической крови здоровых испытуемых-добровольцев, наблюдались эффекты, связанные с ингибированием формирования дендритных клеток, снижение уровня экспрессии комплекса HLA-DR и CD80 (Savary et al., 2001). Представляется возможным способность микрогравитации супрессировать дифференцировку ДК, провоцируя появление незрелых ДК, способность которых к активации Т-лимфоцитов значительно снижена. Важные результаты были получены при культивировании Т-клеточных гибридом с фенотипом CD4⁺ (OT-II TCH) в течение пяти суток в специальном ротационном биореакторе. Был продемонстрирован супрессивный эффект на секрецию IL-2 при активации зрелыми ДК

линии JAWS II в условиях моделируемой невесомости по сравнению с контрольной культурой. При этом наблюдалась повышенная экспрессия рецептора CTLA-4, обладающего ингибирующей активностью, который ввиду своей высокой авидности к своим лигандам CD80/CD86, экспрессируемым на ДК, может ингибировать их костимулирующее действие, а также формирование связи с CD28 Т-клетками, подавляя активацию хелперных и цитотоксических Т- лимфоцитов (Bradley et al., 2017).

Не меньший интерес представляют исследования влияния микрогравитации на другие клетки иммунной системы. За последнее время экспериментов, посвящённых действию реальной и моделируемой невесомости на В-клеточное звено, было проведено относительно небольшое количество. Так, было показано, что 12-ти суточная экспозиция плазматических клеток, как во время КП, так и в специальной ротационной камере на Земле в присутствии PWM приводит к подавлению синтеза IgM (Fitzgerald W. et al. 2009), при этом предварительная стимуляция данным митогеном в значительной степени снижала выявляемые изменения продукции IgM. Дополнительно было показано, что экспозиция в RWV снижает пролиферативную активность данных клеток в ответ на 72-часовую стимуляцию *Staphylococcus aureus* Cowan I strain.

Изучение цитотоксической и цитокинпродуцирующей способности NK-лимфоцитов человека при совместном культивировании с клетками-мишенями линии K-562 в сериях полётных и наземных экспериментов с применением клиностата, продемонстрировало сохранение способности NK-лимфоцитов к межклеточному синапсу, распознаванию и разрушению опухолевых клеток (Buravkova et al., 2007).

В дальнейшем исследовании на борту МКС с применением специально разработанной аппаратуры “KUBIK”, в состав которой входила центрифуга, что позволяло обеспечивать 1g контроль на борту МКС, подтвердил полученные в ранее проведённом эксперименте «Межклеточное взаимодействие» данные о том, что невесомость не приводит к прямым ингибирующим эффектам функциональной активности NK-клеток, более того, условия КП приводят к увеличению цитотоксического индекса (Буравкова и др., 2011). Причины повышения цитотоксической активности NK-лимфоцитов до настоящего времени остаются неизвестными. Одной из возможных причин, объясняющих описанный выше феномен, может быть постоянное нахождение клеточной культуры во взвешенном состоянии, когда не происходит оседания клеток, и, соответственно, увеличивается число контактов между NK-лимфоцитами и клетками-мишенями. (Буравкова и др., 2013).

Другой группой исследователей было показано, что культивация NK-лимфоцитов в течение 12 часов в RPM приводит к снижению цитотоксической активности в отношении

клеток-мишеней линий K-562, U-266, трансфицированной HLA-E лимфомы (221.АЕН) и В-лимфомы (721.221) на фоне снижения внутриклеточной экспрессии перфорины. Также было показано уменьшение продукции $\text{TNF}\alpha$ и $\text{IFN-}\gamma$ экспонируемыми НК-лимфоцитами. (Mylabathula et al., 2017). Разницу в получаемых результатах можно объяснить различными применяемыми моделями, а также используемым оборудованием, что в конечном итоге нашло отражение в вариабельности адаптационного потенциала системы естественной цитотоксичности.

Экспозиция активированных IL-2 НК-лимфоцитов в условиях моделируемой микрогравитации в течение 24-48 часов приводила к снижению цитотоксической способности, снижению пролиферативной активности, а также способности синтезировать $\text{IFN-}\gamma$ с одновременным снижением экспрессии генов, кодирующих IL-12 $\beta 1$ и $\beta 2$ рецепторы (Liu et al., 2015).

Условия реальной и моделируемой микрогравитации оказывают влияние и на клетки моноцитарно-макрофагального ряда. Так в исследовании *in vitro* на макрофагах, генерированных из активированных РМА клеток моноцитарной линии человека U-937, было показано, что 5-суточное культивирование данных клеток в условиях реального КП приводит к уменьшению экспрессии Fc-рецептора, играющего ключевую роль в процессах фагоцитоза и взаимодействии с Т-лимфоцитами (Paulsen et al., 2014).

Анализ эффектов воздействия моделированного в параболическом полёте действия невесомости на микроглиальные мышинные клетки линии BV-2 выявил сильное снижение экспрессии молекулы межклеточного взаимодействия ICAM-1. При этом экспозиция в этих же условиях макрофагов, полученных из активированных РМА клеток линии U937, экспрессия ICAM-1 увеличивалась (Paulsen et al., 2015). Экспрессия молекул ICAM-1 и макрофагов человека после 11 дней экспозиции в условиях КП снижалась, в то время как экспрессия маркёров CD14 и CD18 не претерпевала значимых изменений (Tauber, et al., 2017). Гетерогенность получаемых данных до настоящего момента не имеет научно подтверждённых объяснений. Существующие теории объясняют полиморфность получаемых результатов разницей в типе экспонируемых клеток и особенностями оборудования.

11-суточное экспонирование на борту МКС макрофагов человека привело к изменению уровня секреции 6 из 75 проанализированных метаболитов. Наиболее значимое увеличение содержания в супернатантах клеточных культур метаболитов показано для такого метаболита, как фукозы. По мнению авторов исследования, подобные изменения свидетельствуют о выходе фукозы из олигосахаридов поверхностной мембраны макрофагов, что может проявляться в ослаблении их функций. (Tauber et al., 2017).

1.2.3.4. Миграция клеток и цитоскелетная архитектура в условиях измененной гравитации

Миграция клеток также является существенной характеристикой многих нормальных и патологических процессов в человеческом организме, включая эмбриональное развитие, защиту от инфекций, заживление ран и метастазирование опухолей (Horwitz et al 1999). Для осуществления своих функций, клеткам иммунной системы необходимо перемещаться на большие расстояния в организме человека всего за несколько часов. Их высокая пластичность является необходимым условием для адаптации к изменяющейся окружающей среде (Vargas et al., 2017). Наглядным примером могут служить нейтрофильные гранулоциты, локомоция которых является неотъемлемой частью иммунной эффекторной функции, поскольку эти клетки должны покидать кровеносные сосуды и перемещаться в места инфекции и повреждения, чтобы выполнить свою основную задачу фагоцитоза. Они обладают способностью проходить через промежутки размером менее 1,5 мкм, варьируя организацию цитоскелета в различных средах (Thiam et al. 2016).

В проведённых исследованиях, изменения гравитации приводило к ингибированию локомоторных функций лимфоцитов посредством нарушения в организационной структуре коллагена I типа (Sundaresan et al. 2002), а культивирование CD34⁺ клеток костного мозга человека с использованием RPM способствовало снижению миграционного потенциала (Plett et al. 2004). Снижение локомоторной активности в условиях микрогравитации было показано также для лейкоцитов и Т-клеток Jurkat (Sciola et al. 1999). С другой стороны, Т-клетки становятся более подвижными после культивирования в условиях гипергравитации 10 g (Galimberti et al., 2020).

Клетки человеческого организма должны реагировать на изменение условий окружающей среды. До сих пор некоторыми авторами обсуждается, являются ли силы, генерируемые земной гравитацией способными вызвать клеточный ответ (Vorselen et al. 2014). Однако большинство современных авторов полагают наличие механизмов клеточной чувствительности к гравитации (Najrana and Sanchez-Esteban 2016). Потенциальной мишенью восприятия и трансдукции механических сил может являться цитоскелет клеток.

Цитоскелет отвечает за придание клетке ее формы, а также для обеспечения её подвижности. Эта внутренняя сеть состоит по меньшей мере из трех типов цитозольных волокон: актиновых, промежуточных, а также микротрубочек. Актин считается основным компонентом цитоскелета, ответственным за подвижность клеток. Было показано, что он необходим для миграции Т-лимфоцитов и нейтрофильных гранулоцитов (Hofman et al. 1999). Напротив, интактная сеть микротрубочек, по-видимому, не играет существенной роли в процессах миграции нейтрофилов, поскольку разрушающие микротрубочки препараты, такие как колхицин, индуцируют миграцию нейтрофилов (Niggli 2003), вероятно, вызывая изменения

в актиновой сети. Механизм преобразования сигнала во внутриклеточный ответ в современной литературе определён термином «тенсегрити» (Ingber 1998). В модели тенсегрити все три типа цитоскелетных волокон участвуют в клеточном ответе (Eckes et al. 1998). Эта модель предполагает, что все неспецифические клетки способны ощущать изменения гравитации по различиям в балансе распределения сил. (Tabony et al. 2007).

Было показано, что даже несколько минут в невесомости, оказывают влияние на цитоскелет лимфоцитов, астроцитов, нейронов и глиальных клеток, дезорганизуя микротрубочки, промежуточные нити и микрофиламенты (Roesner et al. 2006). Молекулярно-клеточные изменения, выявляемые сразу после кратковременного изменения (секунды или минуты) силы тяжести, могут быть в дальнейшем компенсированы после нескольких часов или дней воздействия нового стимула. Например, макрофаги человека, экспонированные в течение пяти минут в условиях микрогравитации во время суборбитального полёта ракеты, продемонстрировали изменения в актиновом цитоскелете, в то время как после 11 суток КП не было выявлено структурных изменений актинового цитоскелета (Tauber et al. 2017; Thiel et al. 2019).

В недавнем обзоре о восприятии гравитации у эукариот (Häder et al. 2017) было выдвинуто две гипотезы о вовлечении клеточного цитоскелета и механочувствительных ионных каналов, однако до сих пор ни одна из теорий о передаче гравитационной силы в биологический процесс до конца экспериментально не были подтверждены. Таким образом, гравитация может восприниматься различными клетками посредством изменений во внеклеточном матриксе, организации цитоскелетной клеточной сети, что реализуется в определённые молекулярные изменения, которые приводят к комплексному нарушению функционирования иммунной системы человека на уровне молекулярно-клеточных реакций и межклеточных взаимодействий.

Как видно из приведённого литературного обзора, факторы окружающей среды вызывают многоуровневую реакцию со стороны системы иммунитета. Часто, на одно и то же воздействие, иммунная система как *in vitro*, так и *in vivo* реагирует по-разному. Этот факт позволяет предположить, что реакция иммунной системы на экстремальное воздействие зависит от текущего состояния иммунитета, протекающих процессов взаимодействия между различными его компонентами и другими физиологическими системами.

ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Общие принципы организации экспериментов

Все проведенные эксперименты проходили с участием испытуемых-добровольцев, женщин и мужчин, подписавших форму добровольного информированного согласия на участие в исследовании в соответствии с Хельсинской декларацией. Научная программа каждого из проведенных и рассмотренных в настоящей работе экспериментов, утверждалась на заседании Ученого Совета ГНЦ РФ-ИМБП РАН или его секцией, с последующим одобрением Комиссией по биомедицинской этике ГНЦ РФ-ИМБП РАН. Данная комиссия действует в рамках Физиологической секции Российского Комитета по биоэтике при Комиссии РФ по делам ЮНЕСКО. Испытуемые-добровольцы проходили строгий медицинский и психологический отбор на базе Клинической больницы №1 Управления делами Президента РФ, клинического отдела и отдела психофизиологии, нейрофизиологии и психофизиологии деятельности оператора Института. Все иммунологические исследования были проведены в лаборатории физиологии иммунной системы ГНЦ РФ – ИМБП РАН совместно с сотрудниками лаборатории Рыковой М.П., Антроповой Е.Н., Шмаровым В.А., Кутько О.В., Садовой А.А., Калининым С.А., Шульгиной С.М, Власовой Д.Д. Всего в экспериментальных исследованиях приняло участие 114 условно здоровых мужчин и 15 условно здоровых женщин.

2.2. Объем исследований

Таблица 3. Перечень проведенных экспериментов

№	Направления исследований	Продолжительность, сутки	Количество обследованных (мужчины и женщины)		Возраст обследованных, лет
			М	Ж	
1.	Длительные космические полёты на МКС	12 – 340	51	1	32 - 58
2.	Наземные модельные эксперименты				
2.1.	Эксперимент с 21-суточной «сухой» иммерсией	21	10	0	18 - 30
2.2.	Аналоговые исследования с изоляцией в гермообъеме с искусственной средой обитания				

№	Направления исследований	Продолжительность, сутки	Количество обследованных (мужчины и женщины)		Возраст обследованных, лет
2.2.1.	Эксперимент “Луна-2015”	9	0	6	22-34
2.2.2.	Эксперимент “ЭСКИЗ”	14	4	2	25-40
2.2.3	Эксперимент “SIRIUS-17”	17	3	3	27-43
2.2.4.	Эксперимент “SIRIUS-19”	120	3	3	28-44
2.2.5.	Эксперимент с пребыванием в гипербарической кислородно-азотно-аргоновой среде (“Аргон-13”)				
2.2.5.1	Серия 1	10	6	0	22-45
2.2.5.2.	Серия 2	5.5	6	0	22-45
2.2.5.3.	Серия 3	10	6	0	22-45
2.3.	Эксперимент с пребыванием в условиях ультранизкой температуры (-70°C)	3 минуты	6	0	27-34
2.4.	Эксперимент с пребыванием в гипомангнитных условиях (0,1 мкТл) (“АРФА”)	1	7	0	26-44
2.5.	Эксперимент с пребыванием в условиях разных уровней ИСТ (2,0;2,4;2,9),	1	15	5	22-40

№	Направления исследований	Продолжительность, сутки	Количество обследованных (мужчины и женщины)		Возраст обследованных, лет
	генерируемой при помощи ЦКР				

2.2. Экспериментальные условия

2.2.1. Наземный модельный эксперимент с 21-суточной “сухой” иммерсией

СИ является общепризнанной моделью действия эффектов микрогравитации на организм человека. Модель СИ была разработана в 1970-х годах сотрудниками ГНЦ РФ-ИМБП РАН Е.Б. Шульженко и И.Ф. Виль-Вильямс (Козловская И.Б. 2008). В основе СИ лежит принцип так называемого “сухого” погружения при помощи водонепроницаемой и эластичной плёнки в жидкую среду, имеющую равную плотность со внутренней средой организма человека. СИ воспроизводит основные эффекты невесомости, включающие:

- существенное снижение локальных весовых нагрузок,
- безопорность,
- близость биомеханики локомоторной активности к таковой в условиях реальной микрогравитации во время КП,
- перераспределение жидкостных сред в организме человека.

В этой модели доброволец-испытатель, одетый только в майку и плавки, в положении лёжа укладывается на специальную гидроизолирующую плёнку с последующим плавным погружением в иммерсионную ванну до уровня шеи (рисунок 2). Площадь поверхности применяемой в эксперименте плёнки существенно превосходит площадь поверхности жидкости. В момент погружения складки гидроизолирующей плёнки вместе с иммерсионной жидкостью, заключенной в них, смыкаются со всех сторон тела испытуемого, полностью облекая его вокруг. Никаких дополнительных ложементов или иных приспособлений, которые могли бы дать опору для испытуемого, пребывающего в условиях иммерсионного погружения, не используется. Плотность иммерсионной жидкости повышается за счёт погружённой в неё эластичной плёнки, создавая для испытуемого условия практически нулевой плавучести.

В проведённом эксперименте температура жидкостной среды в иммерсионной ванне поддерживалась константной на уровне 32-34 °С в зависимости от предпочтений испытателя. Распорядок дня в СИ был близок к таковому на МКС и включал в себя восьмичасовой сон, трёхразовое питание, медицинский мониторинг и, собственно, научные исследования. Для проведения санитарно-гигиенических процедур один раз в сутки испытуемых извлекали из

иммерсионной среды на срок, не превышающий 15 минут с применением специального подъёмника. Мытьё испытуемых осуществлялось в положении лёжа (Томиловская и др., 2020).

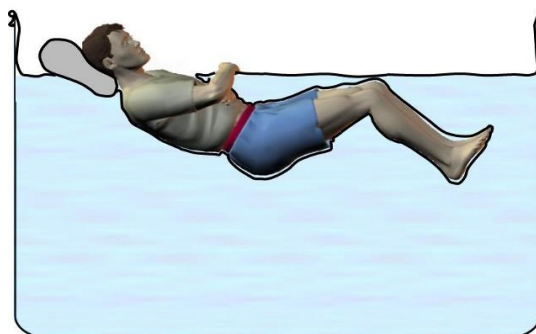


Рисунок 2. Положение добровольца- испытуемого в условиях “сухой” иммерсии

В эксперименте с 21-суточной СИ взятие проб венозной крови проводилось в утренние часы за 7 и 2 суток до начала экспериментального воздействия, на 3, 7, 14, 21 во время иммерсионного погружения и через 7 суток после окончания СИ.

2.2.2. Изоляционные эксперименты

Изоляционные эксперименты проводились на базе Наземного экспериментального комплекса (НЭК) ГНЦ РФ-ИМБП РАН (рисунок 3).

НЭК применяется с целью проведения масштабных научных проектов с участием человека в условиях искусственно создаваемой и регулируемой среды обитания. НЭК был создан по инициативе академика С.П. Королёва как макет тяжёлого космического корабля для моделирования полёта к другим астрономическим телам солнечной системы, в первую очередь, на Марс.

Технические возможности НЭК позволяют проводить эксперименты по изучению влияния факторов окружающей среды на организм человека в интересах космической биологии, физиологии и медицины в полностью контролируемых условиях. Также комплекс позволяет проводить апробацию средств и методов профилактики действия неблагоприятных факторов, ассоциированных с длительной изоляцией в гермообъекте с искусственной средой обитания.

В состав комплекса входят:

- экспериментальные установки (ЭУ) (модули) ЭУ-50, ЭУ-100, ЭУ-150 и ЭУ-250, а также имитатор поверхности планеты, на котором осуществляется моделирование внекорабельной деятельности (ВКД).

Экспериментальные модули представляют собой соединённые между собой переходами с

герметично закрывающимися люками несколько металлических цилиндров, расположенных горизонтально на специальных опорных конструкциях.

Уникальность НЭК заключается в том, что в каждом отдельном модуле возможно создание своих уникальных параметров среды обитания, включая влажность, давление, температуру, зональную освещенность, заданный газовый состав атмосферы.

В проведенных наземных экспериментах поддерживались следующие условия среды обитания:

- Температура газовой среды: 22-25 градусов Цельсия;
- Перепады температур - не более 3 градусов Цельсия;
- Относительная влажность воздуха- 50-75%;
- Общее давление газовой среды: 660-860 мм.рт. ст.;
- Парциальное давление кислорода: 140-200 мм рт. ст.;
- Парциальное давление углекислого газа: до 7 мм рт. ст.;
- Содержание азота: 78-79 % по объему;
- Скорость движения газовой среды в жилой зоне: 0,08-0,2 м/с;
- Шум в жилой зоне в пределах 60 Дб;
- Освещённость рабочих зон не менее 400 лк

-Содержание микроорганизмов в атмосфере экспериментальных модулей не превышало 500 микробных клеток (мк) в 1 м³, а содержание микроорганизмов на поверхностях – 100 мк в 1 м³ (Шмарина Г.В. и др. 2019).



Рисунок 3. Наземный экспериментальный комплекс

В НЭК было проведено несколько экспериментов, характеризующих состояние системы иммунитета человека.

9-суточная изоляция.

Забор крови осуществлялся за 7 суток до начала эксперимента, а также на 5-е и 9-е сутки пребывания в условиях изоляции в гермообъекте. В эксперименте участвовал полностью женский экипаж в возрасте от 25 до 34 лет. Эксперимент был проведён в ЭУ-150, ЭУ-100, ЭУ-250.

14-суточная изоляция

В данном эксперименте взятие биоматериала проходило за 7 и 2 суток до начала эксперимента, на 3, 7 14 сутки изоляции и на 7 сутки после завершения воздействия. Эксперимент проходил с участием 6 испытуемых-добровольцев, 4х мужчин и 2х женщин в возрасте от 25 до 40 лет. Эксперимент проходил только в ЭУ-50

17-суточная изоляция

В ходе эксперимента осуществлялся забор крови натощак в утренние часы за 7 суток до начала изоляции, на 7, 14 и 15 сутки эксперимента, а также на 1 сутки после завершения воздействия. В эксперименте участвовало 6 испытуемых-добровольцев, 3 мужчины и 3 женщины в возрасте от 27 до 43 лет.

120-суточная изоляция

В ходе эксперимента осуществлялся забор крови натощак в утренние часы за 7 суток до начала экспериментального воздействия, на 7, 15, 29, 57, 63,87, 96,120, а также на 7 сутки после завершения воздействия. В ходе эксперимента принимал участие гендерно-смешанный экипаж (3 мужчин и 3 женщин) в возрасте от 27 до 43 лет.

2.2.3. Эксперимент в глубоководном водолазном комплексе

ГВК-250 позволяет проводить различные эксперименты с оценкой влияния повышенного давления, а также различного содержания газов в атмосфере, в том числе и инертных на физиологические системы организма человека. Комплекс позволяет осуществлять имитационное погружение на глубину 250 метров водяного столба. Комплекс состоит из барокамеры, состоящей из трёх модулей: жилого объёмом 15 м³, переходного - 5,5 м³ и лечебного отсека объёмом 8,5 м³ (рисунок 4).

Проведённый эксперимент («Аргон -13») состоял из трёх серий, в каждой из которых участвовало 6 человек. Продолжительность 1-го и 3-го (контрольного) экспериментов составила 10 суток. Длительность второго (гипербарического) эксперимента – 5,5 суток (4 суток - пребывание в условиях гипербарической гипоксии с последующей 2-суточной декомпрессией в нормоксических условиях). Экспериментальные серии были разделены 4х недельным перерывом.

Основными действующими факторами в трёх сериях проведённого исследования были гипоксия и изоляция в замкнутом ограниченном пространстве. Первая и вторая серии эксперимента прошли в гипоксических условиях, в которых азот практически на 50% был заменён на инертный газ аргон. Вторая серия проведённого эксперимента отличалась от первой экспериментальной серии повышением барометрического давления до 20 м. водного столба. Это условие позволило снизить концентрацию кислорода с 15% до 5 %, создав условия гипоксии. Следует отметить, что парциальное давление кислорода сохранялось на уровне 110 мм ртутного столба. После транзита в конце четвёртых суток испытуемых-добровольцев на условия нормоксии (150-165 мм рт. ст.) была осуществлена двухсуточная декомпрессия. Третья экспериментальная серия была контрольной. В этой серии азот воздуха, в отличие от первой, не заменялся на аргон. Параметры среды, в которых проходил эксперимент, представлены в таблице 4.



Рисунок 4. Глубоководный водолазный комплекс ГНЦ РФ-ИМБП РАН.

Таблица 4.

Основные параметры серии экспериментов по программе «Аргон-13»

Избыточное давление	Серия 1 До 0,02 МПа (2 м вод.ст.)		Серия 2 До 0,2 МПа (20 м вод.ст.)	Серия 3 (К) До 0,02 МПа (2 м вод.ст.)	
Температура, °С	20-25		20-25	20-25	
Влажность %	50-70		50-70	50-70	
Длительность	10 суток		5,5 суток	10 суток	
Этапы	5 суток	5 суток	4 суток	5 суток	5 суток
Газовый состав:					
Кислород (парциальное давление*)	12,5-13,3% (110-118 мм рт.ст.)	11,7-12,5% (103-110 мм рт. ст)	4,7-5,3% (104-118 мм рт.ст.)	12,5-13,3% (110-118 мм рт.ст.)	11,7-12,5% (103-118 мм рт. ст)
Аргон	35-45%	35-45%	35-45%	-	-
Азот	42-52%	43-52%	50-60%	87-88%	87-88%
Углекислый газ	< 0,5%	< 0,5%	< 0,16%	< 0,5%	< 0,5%

* При обычном давлении 14% O₂ =103 мм рт.ст.; 15% =110 мм рт.ст.; 16% = 118 мм рт.ст.

Забор образцов венозной крови осуществлялся утром, натощак за 7 суток до начала каждой из серий, на 4 и 10 сутки экспериментального воздействия (кроме 2, укороченной серии), а также на

1 и 8 сутки после завершения воздействия. В эксперименте принимали участие 6 испытуемых-добровольцев мужского пола в возрасте от 22 до 45 лет.

2.2.4. Эксперимент с воздушной криосауной

Воздушная криосауна, расположенная в ГНЦ РФ-ИМБП РАН, представляет собой специальную установку, позволяющую создавать температурные условия до -70°C с целью изучения физиологических эффектов влияния сверхнизких температур на организм человека. В установке одновременно может находиться один человек.

В проведённом исследовании взятие проб венозной крови осуществлялось натощак, в утренние часы за 1 час до начала холодового воздействия, через две минуты после окончания эксперимента, а также через один и три часа после завершения экспериментального воздействия. Испытуемые находились в положении стоя в течение трёх минут в воздушной криосауне CryoAir (Германия) (рисунок 5) при температуре -70°C , одетые в плавки, ботинки, утеплённые наушники и медицинскую маску, препятствующие обморожению ушных раковин и воздухоносных путей. С целью исключения психологического стресса - обусловленной реакции на пребывание в условиях ультранизких температур, все испытуемые проходили ознакомительную сессию также в течение трёх минут в воздушной криосауне за трое суток до начала эксперимента. Во время проведения ознакомительного сеанса взятие образцов крови не проводилось. В исследовании принимали участие 6 испытуемых - добровольцев, мужчин в возрасте от 27 до 34 лет.



Рисунок 5. Воздушная криосауна CryoAir

2.2.5. Эксперимент в гипомангнитной установке «АРФА»

Гипомангнитные условия (ГМУ) создавались в установке моделирования действия магнитных полей «АРФА» (Рисунок 6). Характеристики данного экспериментального стенда

позволяют в течение длительного времени обеспечивать стабильные значения магнитного поля, либо компенсацию естественного геомагнитного поля (ГМУ). Испытуемый находится в установке в положении сидя. Единомоментно установка “АРФА” позволяет проводить исследование с участием одного добровольца-испытателя. Установка способна снижать нормальное геомагнитное поле, в среднем имеющее значение 25 до 65 мкТл, до 0,006 мкТл. Заданный уровень магнитного поля может поддерживаться с точностью ± 10 нТл. Внутреннее пространство установки “АРФА” экранировано от низкочастотного и статического электрического поля. Экран экспериментальной установки представляет собой натянутые параллельными рядами струны металлической изолированной проволоки на расстоянии 3-х сантиметров друг от друга.

Регистрация значений магнитного поля в установке “АРФА” осуществляется с помощью трёхкомпонентного датчика (FL3-100, Stefan Mayer Instruments, Германия), расположенного за спинкой кресла испытуемого на уровне его верхней части. Запись измерений производится с частотой один раз в секунду. Фактические условия эксперимента приведены в таблице 5.

Таблица 5. Режимы экспозиции в установке “АРФА” и кратность ослабления геомагнитного поля.

Сессия	Код испытуемого							Вср, мкТл	$\pm\sigma$, мкТл
	A001	A002	A003	A004	A005	A007	A008		
Режим «Плацебо», мкТл									
Сессия1	42,728	43,033	43,497	42,756	47,049	42,155	42,749	43,424	1,648
Сессия2	43,017	43,391	43,134	42,753	47,051	42,402	42,528	43,468	1,617
Режим ГМУ, мкТл									
Сессия1	0,172	0,110	0,065	0,073	0,075	0,080	0,059	0,090	0,039
Сессия2	0,225	0,061	0,136	0,131	0,083	0,040	0,050	0,104	0,065



А



Б

Рисунок 6. Гипомагнитная установка “АРФА”. А-общий вид, Б-расположение испыталеля-добровольца в установке.

Забор проб венозной крови осуществлялся в утренние часы, натошак в фоновом периоде (за 7 суток до начала экспериментального воздействия), а также после завершения второй гипомагнитной сессии, также в утренние часы с целью исключения влияния циркадных ритмов на результаты исследования. С каждым добровольцем-испытателем, принимавшим участие в эксперименте, в фоновом периоде проводилась 4-х часовая тренировочная сессия для адаптации к условиям работы в экспериментальной установке “АРФА”.

24-часовое исследование в гипомагнитных условиях было разделено на 2 сессии, разделённых трёхчасовым перерывом.

- 1) 8-ми часовое пребывание испыталеля в установке (в утренние и дневные часы).
- 2) 8-ми часовое пребывание в ночное время.

Общее время пребывания добровольца-испытателя в гипомагнитных условиях составляло 16 часов. Комнатная температура колебалась в пределах 23-26⁰С.

Эксперимент был разделён на две 24-часовые серии: контрольную (плацебо) и экспериментальную. В контрольной серии все исследования проводились точно так же, как и в экспериментальной за исключением воздействия самого гипомагнитного фактора. Таким образом, участник не мог отличить контрольную серию от экспериментальной. У трёх испытуемых сначала были проведены контрольные серии, а затем-экспериментальные. У пяти других испытуемых - наоборот: сначала экспериментальная серия в гипомагнитных условиях, а затем – плацебо.

В эксперименте принимали участие испыталели-добровольцы, мужчины в возрасте от 27 до 42 лет.

2.2.6. Эксперимент с искусственной силой тяжести, генерируемой при помощи центрифуги короткого радиуса

Центрифуга короткого радиуса (рисунок 7) представляет собой установку, создающую перегрузку в направлении “голова-таз” (+Gz), имитируя, тем самым, действие гравитации. ЦКР является перспективным средством профилактики действия микрогравитации во время длительного межпланетного перелёта.

Было проведено несколько исследований влияния искусственной силы тяжести (ИСТ) на иммунную систему организма человека.

В первом эксперименте изучалось влияние ИСТ на женский организм до и после краткосрочной (9-суточной) изоляции в гермообъекте с искусственной средой обитания. С целью исключения влияния психологического стресса на различные физиологические системы организма, проводился ознакомительный режим вращений до изоляции, который предусматривал разгон ЦКР до перегрузки 2,0 g. (здесь и далее-на уровне стоп с учётом действия естественной (земной) гравитации) с “площадкой” продолжительностью 60 секунд. Общее время вращения на ЦКР составляло порядка 10 минут. Через три дня после ознакомительного режима, был проведён контрольный режим вращений до (ЦКР1) и после (ЦКР2) изоляционного эксперимента. Во время этих вращений разгон ЦКР проводился до перегрузки 1,5 g с “площадкой” длительностью 3 минуты., далее осуществлялся разгон ЦКР до перегрузки 2,0 g (также на уровне стоп) с “площадкой” длительностью 3 минуты. Суммарное время вращения испытуемых составляло порядка 14 минут. Во время вращения голова добровольцев-испытателей находилась на расстоянии 30 см от оси вращения. Разгон ЦКР составлял 0,01 g./сек.

Во втором эксперименте с участием 6 испытуемых-добровольцев мужского пола в возрасте от 30 до 38 лет были протестированы три различных режима на ЦКР:

Режим 1.

Разгон ЦКР до перегрузки 0,2g. с “площадкой” длительностью 4 минуты, разгон до перегрузки 1,05 g. с “площадкой” длительностью 4 минуты, разгон до перегрузки 2,0 g. с “площадкой” длительностью 30 минут. Торможение ЦКР осуществлялось в обратном порядке, т.е. с “площадками” на уровнях 1,05 g и 0,2 g, каждая из которых длилась 4 минуты. Суммарное время вращения составило около 1 часа.

Режим 2.

Разгон ЦКР до перегрузки 0,5 g с “площадкой” продолжительностью 6 минут, разгон ЦКР до перегрузки 2,4g с “площадкой” длительностью 30 минут. Торможение ЦКР

осуществлялось в обратном порядке, т.е. с “площадкой” на уровне 0,5 g длительностью 6 минут. Суммарное время вращения составило также около одного часа.

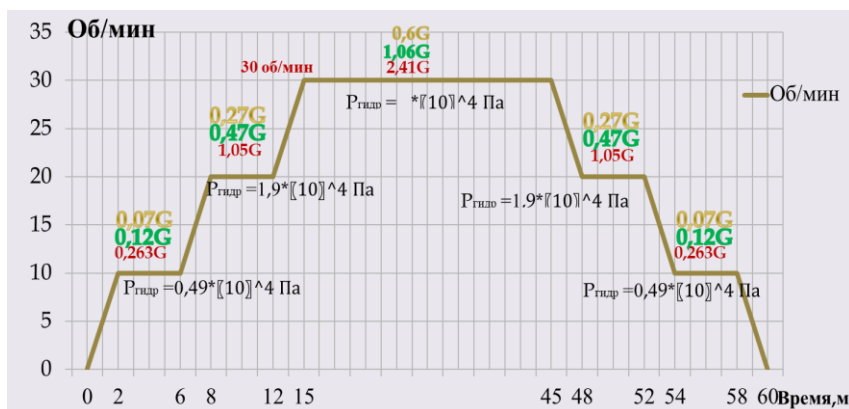
Режим 3.

Разгон ЦКР до перегрузки 2,0 g с “площадкой” продолжительностью 30 минут. Далее постепенное торможение. Суммарное время вращения на ЦКР составило порядка 45 минут.

Во всех экспериментах разгон ЦКР был равен 0,01 g./сек. Перерыв между вращениями составил 3 суток.



Режим 1



Режим 2



Режим 3

Рисунок 7. Центрифуга короткого радиуса и режимы вращения испытуемых-добровольцев (по данным М.И. Колотевой).

В третьем эксперименте приняли участие 6 испытуемых-добровольцев, мужчины в возрасте от 25 до 45 лет. Скорость разгона ЦКР с градиентом нарастания 0,01 ед./с до перегрузки 1,27 ед. (на уровне стоп с учетом земной гравитации) с площадкой длительностью 5 мин, далее разгон ЦКР с градиентом нарастания 0,01 ед./с до перегрузки 2,06 ед. с площадкой длительностью 5 мин, торможение ЦКР с градиентом уменьшения 0,01 ед. до перегрузки 1,27 ед. с площадкой длительностью 5 мин. Цикл повторяется еще 3 раза (всего 4 цикла), торможение ЦКР выполняется с градиентом уменьшения 0,01 ед., общее время вращения 60 мин (рисунок 8). Гравитационный градиент (ΔG) = 74,5% (голова испытуемого находится на расстоянии 60 см от оси вращения). Перерыв между вращениями на ЦКР — не менее 2-х суток (рисунок 8).

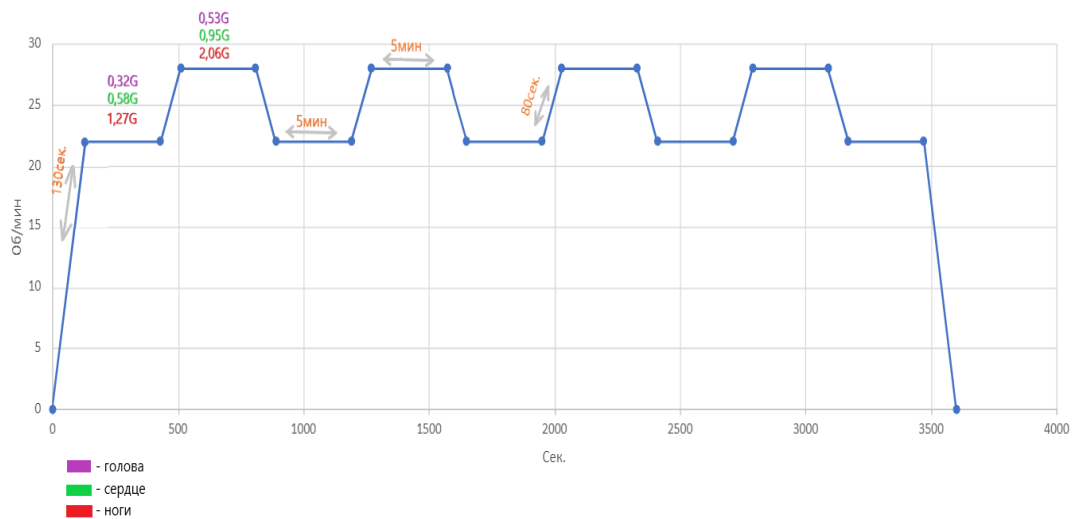


Рисунок 8. Профиль перегрузок во время вращения на ЦКР (по данным М.И. Колотевой)

Во время проведения первого эксперимента забор венозной крови в вакутейнеры, содержащие антикоагулянт (КЗ-ЭДТА) осуществлялся за сутки до и сразу после завершения вращения на ЦКР в фоновом периоде, а также непосредственно после завершения вращения по завершению изоляционного воздействия.

Во время второго эксперимента забор венозной крови в пробирки, содержащие (КЗ-ЭДТА) осуществлялся в фоновом периоде за сутки до вращения и сразу после вращения. Отдельного забора крови перед вторым и третьим вращением не производилось.

Во время третьего эксперимента забор крови осуществлялся за сутки до, сразу после, а также через 3 минуты и 1 час после завершения вращения.

2.2.7. Полёты на Международной космической станции

Изучение влияния факторов реального космического полёта на иммунную систему организма человека было выполнено в рамках клинико-физиологического обследования российских космонавтов и космического эксперимента “Иммунорецепторы”. Был обследован 51 российский космонавт в возрасте от 32 до 60 лет, совершивших длительные КП на МКС протяжённостью до полугода. В соответствии с экспериментальной программой забор крови осуществлялся в предполётном периоде за 60 суток до старта, а также в период реадaptации к земным условиям на 1-е и 7-е сутки после приземления.

2.3. Методы исследований

Взятие проб венозной крови осуществлялось в утренние часы, натощак из кубитальной вены по стандартной методике в асептических условиях в вакуумные пробирки фирмы Greiner Bio-One (Австрия) со стандартным содержанием антикоагулянтов (КЗ-ЭДТА, натрия цитрат 3,8% , гепарин натрия) а также без антикоагулянтов для сыворотки крови с гелевым наполнителем.

2.3.1 Проточная цитофлуориметрия

Определение содержания лейкоцитов, а также абсолютного и относительного количества лимфоцитов, моноцитов и гранулоцитов в периферической крови проводили на автоматическом гематологическом анализаторе Celltac- α МЕК 6318К (Япония).

Анализ рецепторных структур иммунокомпетентных клеток периферической крови (КЗ-ЭДТА) проводили мультипараметрическим методом иммунофлуоресцентного анализа с использованием панели моноклональных антител, в состав которой входили антитела к TLR1 (CD281(TLR1)-PE, eBioscience, США), TLR2 (CD282(TLR2)-FITC, eBioscience, США), TLR4 (TLR4-FITC, Nycult Biotech, Нидерланды), TLR5 (TLR5-PE, Invitrogen, США), TLR6 (TLR6-PE, Nycult Biotech, Нидерланды), CD206 (MMR PE, eBioscience, США), CD209 (DC-SIGN FITC, PE, eBioscience, США), CD64 (Fc γ RI FITC, PE, eBioscience, США), CD206 (mannose receptor, FITC, PE, eBioscience, США), CD32 (Fc γ RII FITC, eBioscience, США), CD16b (Fc γ RIII, FITC;PE, eBioscience, США), CD14 (FITC, PE- eBioscience, США), CD19 (FITC, PE, eBioscience, США), CD3 (FITC, PE, eBioscience, США), CD4 (FITC, PE, eBioscience, США), CD8 (FITC, PE, eBioscience, США), CD16/56 (FITC, PE, eBioscience, США), CD45/14 (FITC, PE, Beckman Coulter, США), CD36 (FAT, FITC, PE, eBioscience, США), CD24 (HSA, FITC, PE, eBioscience, США), CD54 (ICAM-1, FITC, PE, Beckman Coulter, США).

Пробы внутриклеточных TLRs обрабатывали для последующей инкубации с соответствующими МКАТ с помощью коммерческого набора для фиксации и пермеабилзации клеток (IntraPrep Permeabilization Reagent, Beckman Coulter, США), согласно инструкции производителя. В контрольную и опытную лунки внутриклеточных TLRs на холоде добавляли соответствующие МКАТ: TLR3 (CD283(TLR3)-PE, eBioscience, США), TLR8 (TLR8-PE, Invitrogen, США), TLR9 (CD289(TLR9)-PE, eBioscience, США).

Клетки ресуспендировали, инкубировали в течение 30 минут при 4°C, после чего отмывали избытком буфера. Пробы внутриклеточных TLR ресуспендировали в 350 мкл холодного буфера и анализировали на проточном цитофлуориметре.

Для определения мембранной экспрессии рецепторов на иммунокомпетентных клетках к 50 мкл крови, содержащей КЗ-ЭДТА, добавляли соответствующие моноклональные антитела в

объеме 10 мкл и инкубировали в течение 20 минут при комнатной температуре. Затем лизировали эритроциты, внося в каждую пробирку по 500 мкл лизирующего раствора BD FACS Lysing (Becton Dickinson, США) и инкубировали в течение 10 минут при комнатной температуре. После двукратной отмывки клеточной суспензии от несвязавшихся антител и эритроцитарного дебриса раствором CellWash (Becton Dickinson, США) путем центрифугирования при 300g в течение 5 минут при комнатной температуре проводили учет окрашенных клеток на проточном цитофлуориметре FACSCalibur (Becton Dickinson, США) по программам Simulset и CellQuest, а также на проточном цитофлуориметре NAVIOS (Navios Flow Cytometer, Beckman Coulter, США) при помощи ПО Kaluza Analysis.

2.3.2. Работы с клеточными культурами

Мононуклеарные клетки (МНК) выделяли из цитратной венозной крови путем центрифугирования в градиенте плотности фиколла ($\rho=1,077$).

Монокультуры CD14⁺ клеток получали из суспензии МНК путем колоночной магнитной сепарации (MS Columns, Miltenyi Biotec, Германия) с использованием блокатора Fc-рецепторов (FcR Blocking Reagent, human, Miltenyi Biotec, Германия) и суперпарамагнитных частиц MACS MicroBeads, конъюгированных с высокоспецифичными моноклональными антителами к поверхностному антигену CD14 (CD14 MicroBeads, human, Miltenyi Biotec, Германия), согласно инструкции производителя.

Для исследования влияния лигандов Толл-подобных рецепторов (Toll-like receptor, TLR) на функциональную активность моноцитов, выделенные CD14⁺ - клетки довели полной питательной средой (RPMI-1640 (Gibco, США), содержащей 2 мМ L-глутамина (Gibco, США), 1% пенициллина/стрептомицина (Gibco, США), 5% инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone, США)) до концентрации 5*10⁵ кл/мл и сажали в плоскодонные 96-луночные культуральные планшеты для работы с адгезивными культурами клеток (Eppendorf, Германия) по 200 мкл клеточной суспензии на лунку. Для каждого исследуемого TLR ставили контрольную (без добавления лиганда) и опытную (с добавлением лиганда соответствующего TLR) пробы. В качестве лигандов TLR использовали агонисты к мембранным и внутриклеточным TLR из коммерческого набора (Human TLR1-9 Agonist kit, Invivogen, США) в следующих концентрациях в опытных пробах: TLR1 – 0,5 мкг/мл Pam3CSK4, TLR2 - 108 кл/мл HKLM, TLR3 - 5 мкг/мл Poly(I:C) HMW и 5 мкг/мл Poly(I:C) LMW, TLR4 - 5 мкг/мл LPS-EK, TLR5 - 5 мкг/мл FLA-ST, TLR6 – 0,5 мкг/мл FSL-1, TLR8 - 5 мкг/мл ssRNA40, TLR9 - 5 мкг/мл ODN2006.

CD14⁺ моноциты культивировали в течение 24 часов при 37°C во влажной атмосфере, содержащей 5% CO₂, после чего собирали культуральные супернатанты и хранили полученные

образцы при -80°C до тестирования. Детекцию продукции цитокинов клеточными культурами проводили методом мультиплексного анализа с использованием коммерческой панели для одновременного определения цитокинов и хемокинов человека (MILLIPLEX MAP Human Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel - Premixed 41 Plex - Immunology Multiplex Assay, Merck Millipore, США), согласно рекомендациям производителя.

В клетках культур, стимулированных лигандами TLRs, определяли уровень экспрессии исследуемых Толл-подобных рецепторов методом проточной цитометрии. Для этого клеточную взвесь в 96-луночном планшете отмывали избытком буфера (фосфатно-солевой буфер (DPBS, Gibco, США), содержащий 2 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты (EDTA, Sigma-Aldrich, США) и 0,5% бычьего сывороточного альбумина (BSA, Miltenyi Biotec, Германия)). Клеточные осадки ресуспендировали в 60 мкл буфера и инкубировали в течение 10 минут при 4°C в присутствии блокатора Fc-рецепторов (FcR Blocking Reagent, human, Miltenyi Biotec, Германия) с целью снижения возможности неспецифического связывания при последующем добавлении моноклональных антител (МКАТ). Во все исследуемые пробы на холоду добавляли МКАТ к CD14 (CD14-FITC, или CD14-PE, Beckman Coulter, США), в контрольную и опытную лунки мембранных TLR добавляли соответствующие антитела: TLR1 (CD281(TLR1)-PE, eBioscience, США), TLR2 (CD282(TLR2)-FITC, eBioscience, США), TLR4 (TLR4-FITC, Hycult Biotech, Нидерланды), TLR5 (TLR5-PE, Invitrogen, США), TLR6 (TLR6-PE, Hycult Biotech, Нидерланды). Клеточные суспензии ресуспендировали и инкубировали в течение 30 минут при 4°C , после чего отмывали избытком буфера. Во все лунки добавляли 200 мкл холодного буфера, далее, для снятия клеток с пластика, пипетировали на холоду 8-10 раз, затем все образцы переносили в 12x75 мм пробирки для цитометрического анализа. Пробы мембранных TLRs доводили буфером до 350 мкл и анализировали на проточном цитофлюориметре.

Пробы внутриклеточных TLRs обрабатывали как описано выше для образцов цельной крови.

Базальную продукцию цитокинов определяли в монокультурах CD3^{+} -Т-лимфоцитов. Для этого из гепаринизированной венозной крови путем центрифугирования в градиенте плотности ($\rho=1,077$, Гистопак, Sigma-Aldrich, США) получали моноклеарные лейкоциты. После чего из клеточной суспензии выделяли популяции CD14^{+} -клеток и CD3^{+} -клеток методом иммуномагнитной сепарации с использованием технологии MACS (Miltenyi Biotec, Германия) согласно инструкции производителя. Монокультуры CD3^{+} -Т-лимфоцитов культивировали в стерильных пластиковых пробирках объемом 5 см³ (Falcone, BD) (в концентрации 10^6 кл/мл) в питательной среде RPMI-1640 (Gibco, США), содержащей 2 мМ L-глутамина (Gibco, США), 1% пенициллина/стрептомицина (Gibco, США), 5% инаktivированной эмбриональной телячьей

сыворотки (HyClone, США), в течение 24 ч при 37°C в CO₂-инкубаторе, после чего собирали супернатанты и хранили полученные образцы при -80°C до тестирования. Анализ цитокинового профиля выполняли с помощью коммерческого набора для мультиплексного анализа цитокинов, хемокинов и факторов роста Cyto/Chemo MAG Premix 41 Milliplex, Merck (Millipore, Германия), определяющего содержание TNF -alpha, IL1-beta, IL-6, IL-8, IL-10, IFN-gamma, IFN-alpha, IL-12, GM-CSF. Для стимуляции Т-лимфоцитов использовался фитогемагглютинин (ФГА) в концентрации 10 мкг/мл. Гепаринизированную (20 ЕД/мл) венозную кровь разводили в 5 раз средой RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, США), дополненной 0,3 мг/мл L-глутамина, 5мМ HEPES-буфера и 100 мкг/мл гентамицина, и культивировали в течение 24 ч или 48 ч в круглодонных, стерильных пробирках. Культивирование проводили при 37°C в CO₂-инкубаторе, после чего собирали супернатанты и хранили полученные образцы при -80 °C до тестирования.

2.3.3. Мультиплексный анализ

Иммунофлуоресцентный анализ содержания цитокинов в сыворотке крови и супернатантах клеточных культур осуществлялся при помощи коммерческого набора MILLIPLEX MAP Human Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel - Premixed 41 Plex - Immunology Multiplex Assay, Merck Millipore, США на мультиплексном анализаторе Magpix, Merck Millipore, США.

Методом xMap мультиплексного ИФА определялись следующие цитокины и хемокины: (TNF -alpha, IL1-beta, IL-3, IL-6, IL-8, IL-10, IFN-gamma, IFN-alpha, IL-12, GM-CSF)

Для определения содержания цитокинов и хемокинов полученную кровь центрифугировали на 1000g в течение 15 минут при 4⁰C, затем отбирали сыворотку в стерильную пробирку и центрифугировали снова при 10000g в течение 10 минут при той же температуре. Полученную сыворотку аликвотировали и замораживали при температуре -80⁰C.

Для определения содержания цитокинов в супернатантах клеточных культур надосадочную жидкость отбирали, центрифугировали в течение 15 минут при 10000g при 4⁰C. Затем образцы аликвотировали и хранили при температуре -80⁰C.

Подготовка и анализ биоматериала осуществлялись согласно инструкции производителя.

2.3.4. Постановка ПЦР в реальном времени

Выделение РНК

Выделение тотальной РНК из образцов венозной крови, цитратом натрия, проводилась при помощи реактива ExtractRNA (Евроген, Россия) согласно следующему протоколу: клетки осаждали центрифугированием при 1000g, промывали PBS, лизировали в 1 мл реагента, затем добавляли по 200 мкл хлороформа, центрифугировали при 15000g. Водную фракцию

переносили в чистую пробирку, добавляли равный объем изопропанола и 1 мкл соосадителя SatelliteRed (Евроген, Россия). Осадок растворяли в деионизированной воде, свободной от нуклеаз, затем для элиминации примесей геномной ДНК к образцам добавляли фермент DNase I (Thermo Fisher Scientific, Литва), соответствующий буфер, ингибитор РНКаз RiboLock RNase Inhibitor (ThermoFisher Scientific, Литва) и инкубировали 40 мин при 37 °С. Реакцию останавливали путём добавления рекомендованного количества ЭДТА и инкубацией при 65 °С в течение 5 мин. РНК использовали для получения кДНК или хранили на -80 °С.

Обратная транскрипция

Синтез кДНК проводили с использованием набора MMLV RT kit (Евроген, Россия). Аликвоты РНК (около 1 мкг) смешивали с 2 мкл 5х Буфера, 1 мкл Oligo-dT праймера, 1 мкл DTT, 1 мкл dNTP, 1 мкл обратной транскриптазы MMLV, доводили объем реакции до 10 мкл водой, свободной от нуклеаз, и проводили обратную транскрипцию при 42 °С в течение 40 мин. Полученные кДНК, а также РНК (по RT control) анализировали с помощью ПЦР-РВ с ген-специфическими праймерами для референсных генов (TBP, GAPDH) и разводили до оптимальной концентрации, затем аликвоты кДНК использовали для анализа экспрессии целевых генов.

Проведение RT PCR

Относительная экспрессия генов оценивалась с помощью прибора AB StepOnePlus Real-Time PCR system (Thermo Fisher Scientific, США) и набора реактивов SYBR Green reagent qPCRmix-HS SYBR + HighROX (Евроген, Россия), реакционные смеси готовили согласно рекомендациям производителя. Все реакции были представлены в дубликатах или трипликатах. Протокол амплификации состоял из 40 циклов: 95 °С – 15 сек, 60 °С – 15 сек, 72 °С – 30 сек, интенсивность флуоресценции считывали после стадии элонгации. Каждая реакция включала анализ кривых плавления для подтверждения специфичности и однородности ПЦР-продуктов. Экспрессия целевых генов нормализовалась на значения референсного гена (TBP) и референсного образца (-7 и/или -3 сутки) – метод $\Delta\Delta C_t$, после чего полученные данные анализировали статистическими методами (W критерий Уилкоксона).

Дизайн праймеров

Праймеры для анализа экспрессии целевых генов подбирали, используя последовательности транскриптов человека из базы данных NCBI GenBank с помощью онлайн-инструмента NCBI Primer-BLAST. Пары праймеров подбирали таким образом, чтобы размер продукта не превышал 200 пн, а также, по возможности, чтобы продукт содержал сайты сплайсинга. Все праймеры, при необходимости, выравнивали по температуре отжига 60 °С, а

также тестировали на геномной ДНК человека и тестовой кДНК перед использованием на опытных образах.

Изучаемые гены:

TLR: TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR8, TLR9.

Адаптерные молекулы и TLR взаимодействующие протеины: BTK, CD14, GPC1 (SP-A), HMGB1, HRAS, HSPA1A, HSPA4, HSPA6, HSPD1, LY86 (MD-1), LY96, MAL, MAPK8IP3, MYD88, PELI1 (Pellino 1), PELI2 (Pellino 2), PGLYRP1, PGLYRP2, PGLYRP3, PGLYRPI, RIPK2 (RIP2), SARM1, TICAM2, TIRAP, TOLLIP, TRIF (TICAM1).

Эффекторы:

CASP8, EIF2AK2, FADD, IRAK1, IRAK2, IRAK3, IRAK4, MAP3K7, MAP3K7IP1 (TAB1), MAP3K7IP2 (TAB2), NR2C2 (TAK1),

PPARA, PRKRA (PKR), SITPEC (ECSIT), TRAF6, UBE2N (Ubc13), UBE2V1 (Uev1A).

NF-κB путь: CCL2 (MCP-1), IKK-альфа, GM-CSF, G-CSF, IFNB1, IFNG, IKK-гамма, IKK-бета, IL1A, IL1B, IL2, IL6, IL8, IL10, IL12, LTA (TNF-бета), MAP3K1 (MEKK1), MAP3K14, MAP4K4 (NIK), NFKB1, NFKB2, IκBα/mad3, IκBβ, NFKBIE, NFKBIL1, NFKBIL2, NFRKB, REL, RELA, RELB, TNF-альфа, TNFRSF1A, TRADD.

JNK/p38 путь: ELK1, FOS, JUN, MKK3, MAP2K4 (MKK4), MAP2K6 (MKK6), MAP3K1 (MEKK1), MAPK8 (JNK1), MAPK9 (JNK2), MAPK10, MAPK11 (p38βMAPK), MAPK12 (p38gMAPK), MAPK13, MAPK14 (p38 MAPK).

NF/IL-6 путь: CLECSF9, PTGES, Cox-2.

IRF путь: CXCL10 (IP-10), IFNB, IFNG, IRF1, IRF3, IRF7, TBK1.

2.3.5. Статистическая обработка результатов

Результаты исследований были обработаны с использованием пакета прикладных программ «Statistica v.10.0 for Microsoft Windows». Достоверность полученных результатов оценивалась при помощи непараметрического критерия Вилкоксона.

2.3.6. Оборудование

Исследования проводились на современном сертифицированном оборудовании, в состав которого входят:

- Модульный проточный цитофлуориметр Navios (Beckman Coulter, США)
- Проточный цитофлуориметр FACS Calibur, (Becton Dickinson, США)
- Автоматический гематологический анализатор Celltacα MEK 6318K (Япония)
- Ламинарный бокс 2-го класса защиты с вертикальным потоком воздуха EHRET V-130 (Германия)

- CO₂ инкубатор термостатирующий Eppendorf (Германия)
- Настольная рефрижераторная центрифуга Hettich Universal 32 R (Германия)
- Мультиплексный флуоресцентный иммуноанализатор MAGPIX (Millipore, Германия).
- StepOnePlus Real-Time PCR system (Applied Biosystems, США)
- Бокс для ПЦР-диагностики с подставкой LS 620.100/0.06.1 (Россия)
- Ламинарный бокс II класса БМБ-II-"Ламинар-С."-1,5 (221.150) (Россия)
- Высокоскоростная центрифуга Allegra X-30R (Beckman Coulter, США)
- Высокоскоростная центрифуга Thermo Fusher Scientific Micromax RF
- Низкотемпературный холодильник Eppendorf CryoCube F570 (Германия)
- Лабораторные сэмплеры
- Шейкеры
- Угловые микроцентрифуги типа "Вортекс".

ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

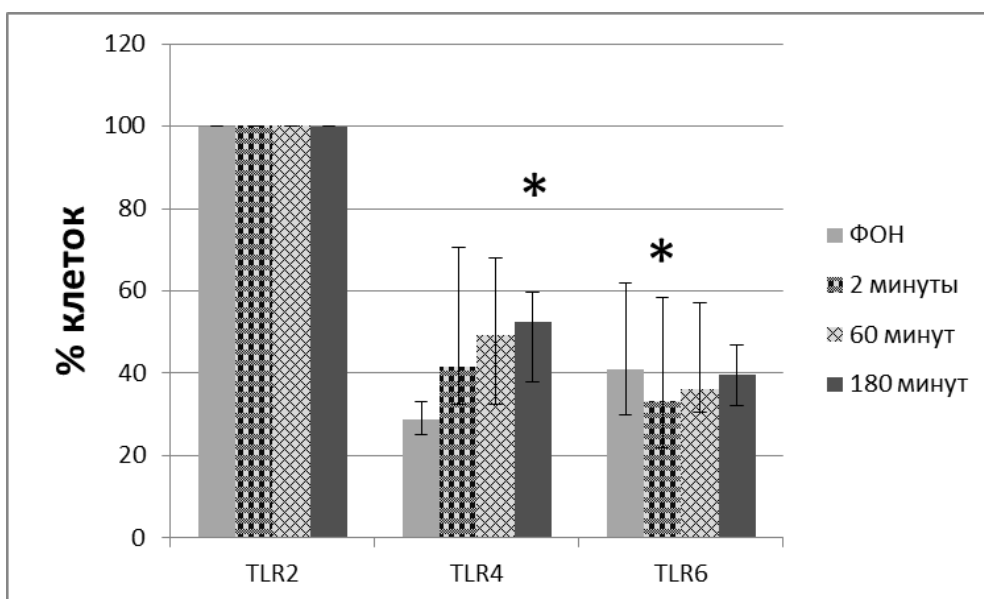
3.1. Особенности функционирования иммунной системы человека при кратковременном воздействии низких температур

Сверхнизкие температуры оказывают существенное влияние на различные физиологические системы организма человека, включая и систему иммунитета (Lubkowska A, 2019). Большинство авторов приходит к выводу о том, что пролонгированное гипотермическое воздействие приводит к изменениям в функциональной активности иммунной системы, однако существуют работы, в которых наглядно демонстрируется, что краткосрочное холодовое воздействие приводит к нарушению в работе иммунитета человека (Brazaitis M, 2014, Lubkowska A, 2019). Следует отметить, что подавляющее большинство исследований сконцентрировано на влиянии низких и ультранизких температур на гуморальную составляющую иммунной системы человека. При этом вплоть до настоящего времени остаётся неизученным вопрос об изменениях, происходящих с клеточным компонентом иммунитета человека при воздействии ультранизких температур, в связи с чем, целью данного этапа работы являлась оценка влияния кратковременного холодового воздействия на показатели, характеризующие состояние клеточного звена адаптивного и врождённого иммунитета человека.

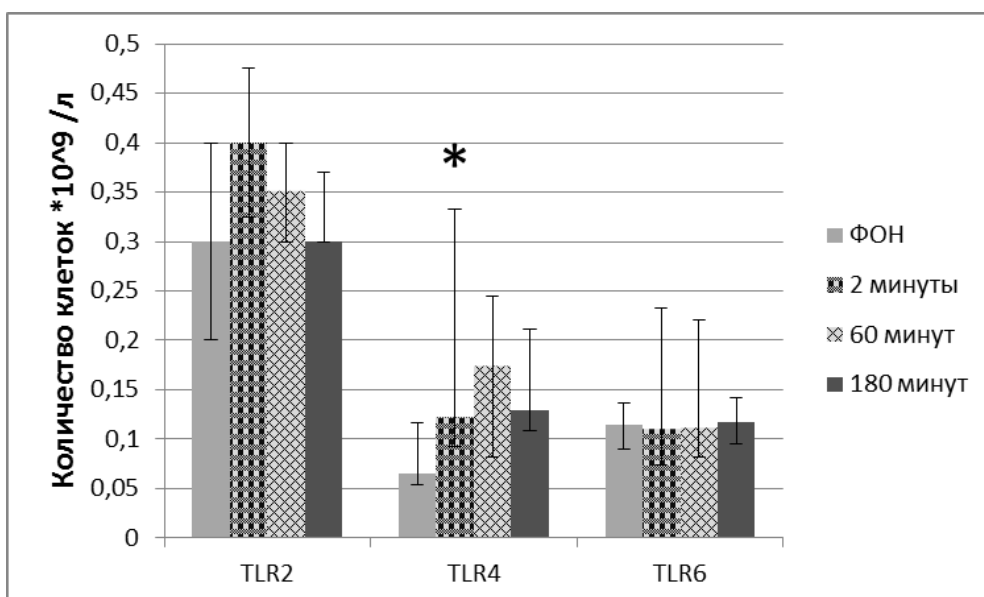
В результате проведённого исследования были выявлены изменения, происходящие во врождённом и адаптивном иммунитете организма человека. Как следует из рисунков 9 и 10, а также таблиц 6 и 7, наблюдаемые изменения охватывают относительное и абсолютное содержание различных типов иммунокомпетентных клеток, таких как лимфоциты, моноциты и гранулоциты периферической крови испытуемых-добровольцев, принимавших участие в эксперименте с трёхминутным пребыванием в воздушной криосауне при температуре -70°C .

Относительное количество клеток является процентом клеток с определённым фенотипом, содержащимся в заданном клеточном пуле. Абсолютное количество – это общее содержание клеток с конкретными фенотипическими характеристиками в единице объёма. Относительное и абсолютное содержание клеток представляются важными параметрами, характеризующими состояние клеточного звена иммунной системы человека.

Все принимавшие участие в эксперименте испытуемые не были адаптированы к холодовому воздействию, но прошли ознакомительный сеанс в криосауне за неделю до начала экспериментального воздействия. Следует также отметить, что выявленные в проведённом эксперименте изменения не выходили за рамки принятых клинических норм.



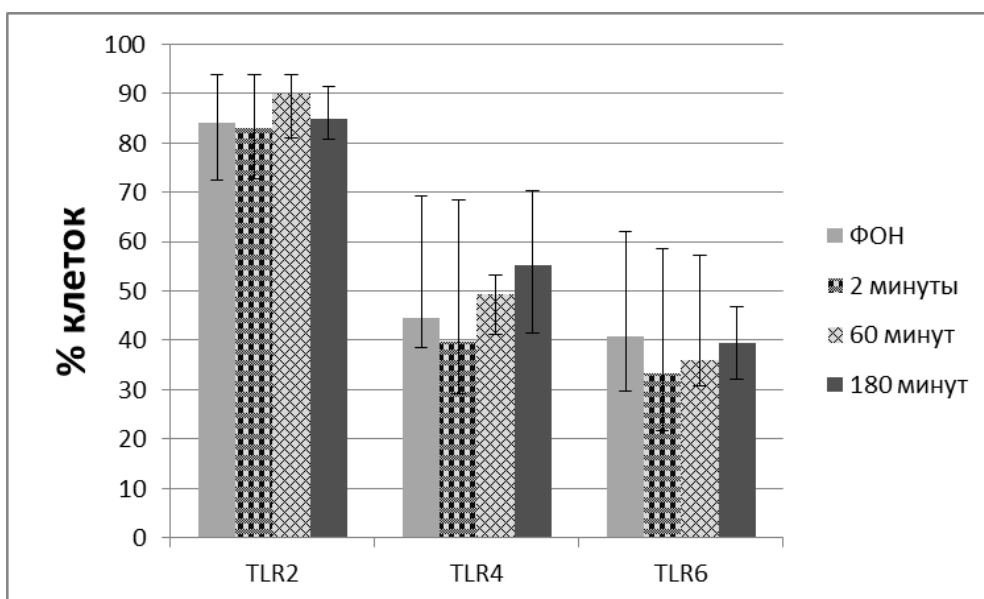
А



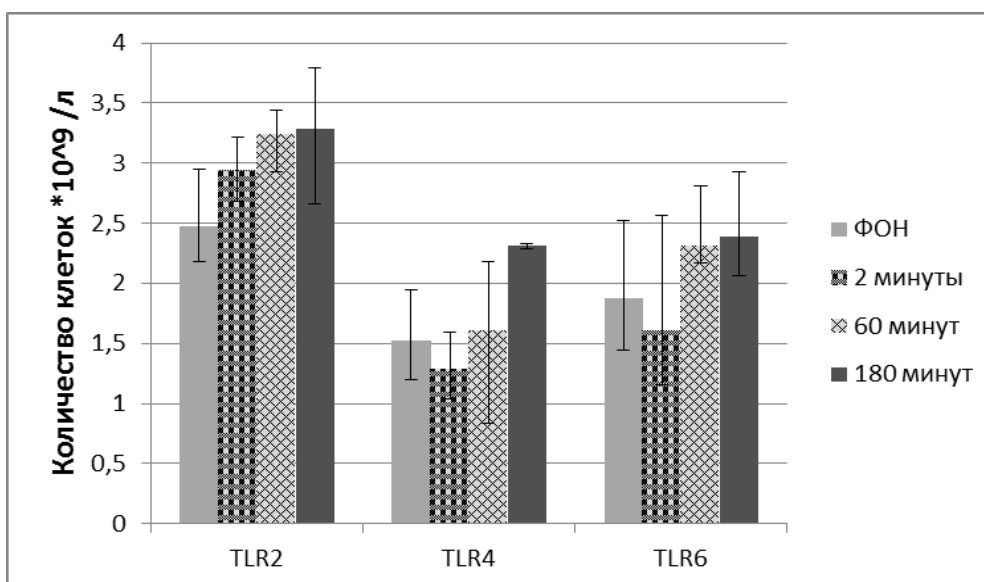
Б

Рисунок 9. Динамика изменений относительного (А) и абсолютного (Б) содержания моноцитов, экспрессирующих на своей мембране TLR2, TLR4 и TLR6, в периферической крови испытуемых-добровольцев, принимавших участие в эксперименте с трёхминутной экспозицией в воздушной криосауне (-70 °С). Данные представлены в виде Ме (q25-q75)

*-достоверное различие с фоновым периодом ($p < 0.05$)



А



Б

Рисунок 10. Динамика изменений относительного (А) и абсолютного (Б) содержания гранулоцитов, экспрессирующих на своей мембране TLR2, TLR4 и TLR6, в периферической крови испытуемых-добровольцев, принимавших участие в эксперименте с трёхминутной экспозицией в воздушной криосауне (-70 °С).
Данные представлены в виде Me (q25-q75) *-достоверное различие с фоновым периодом (p<0.05)

Таблица 6. Показатели клеток периферической крови испытуемых-добровольцев, принимавших участие в эксперименте с трёхминутной экспозицией в воздушной криосауне (-70 °С). Данные представлены в виде Me (q25-q75)

Показатель	Время обследования			
	ФОН	2 минуты	1 час	3 часа
Лейкоциты, абс., $\times 10^9/\text{л}$	5,45 (5,10-6,02)	6,40 (6,15-6,72)*	5,75 (5,62-6,25)	6,30 (6,30-6,60)*
Моноциты, отн., %	5,00 (4,80-6,40)	5,75 (4,65-7,07)	5,25 (4,47-6,02)	5,45 (4,32-6,35)
Моноциты, абс., $\times 10^9/\text{л}$	0,30 (0,20-0,40)	0,40 (0,32-0,47)	0,35 (0,3-0,4)	0,30 (0,30-0,37)
Лимфоциты, отн., %	37,45 (31,87-43,02)	39,55 (37,87-40,32)	32,20 (29,02-35,60)	31,70 (28,2-39,40)*
Лимфоциты, абс., $\times 10^9/\text{л}$	1,90 (1,82-2,05)	2,50 (2,35-2,80)	1,80 (1,70-2,27)	1,85 (1,72-2,47)*
Гранулоциты, отн., %	52,95 (45,77-59,97)	55,30 (54,75-56,82)	63,65 (59,15-66,50)	62,00 (54,55-67,20)*
Гранулоциты, абс., $\times 10^9/\text{л}$	3,00 (2,65-3,50)	3,35 (3,15-3,62)	3,80 (3,20-3,95)	3,80 (3,35-4,25)*
CD14, абс.	247,26 (183,15-380,02)	283,43 (223,28-409,56)	240,30 (234,23-375,00)	251,37 (248,74-262,21)
CD14, отн., %	4,51 (4,00-5,83)	4,66 (3,79-6,16)	4,51 (4,13-5,81)	3,99 (3,91-4,73)

*-достоверное различие с фоновым периодом ($p < 0.05$)

Таблица 7. Показатели субпопуляционного состава лимфоцитов в периферической крови испытуемых-добровольцев, принимавших участие в эксперименте с трёхминутной экспозицией в воздушной криосауне при температуре -70 °С. Данные представлены в виде Me (q25-q75). *-достоверное различие с фоновым периодом ($p < 0.05$)

Показатель	Время обследования			
	ФОН	2 минуты	1 час	3 часа
CD3 ⁺ , отн., %	68,50 (68,00-76,50)	70,50 (67,75-75,50)	71,00 (68,00-77,00)	68,50 (66,00-76,25)
CD3 ⁺ , абс. $\times 10^9/\text{л}$	1,38 (1,28-1,45)	1,81 (1,63-2,21)*	1,41 (1,20-1,56)	1,37 (1,34-1,67)
CD3 ⁺ CD8 ⁺ , отн., %	25,00 (19,75-34,75)	26,50 (22,25-34,5)*	24,00 (19,50-33,75)	24,00 (19,25-31,00)
CD3 ⁺ CD8 ⁺ , абс. $\times 10^9/\text{л}$	0,58 (0,38-0,70)	0,83 (0,52-1,01)*	0,52 (0,39-0,69)	0,52 (0,46-0,65)
CD19 ⁺ , отн., %	12,00 (10,50-15,75)	12,50 (7,75-14,50)	17,00 (12,00-19,75)*	15,50 (12,25-18,75)*
CD19 ⁺ , абс. $\times 10^9/\text{л}$	0,27 (0,18-0,35)	0,33 (0,21-0,37)	0,31 (0,20-0,36)*	0,33 (0,24-0,38)*
CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺ , отн., %	13,50 (10,75-15,50)	12,50 (12,00-17,50)	8,00 (7,25-11,00) *	8,00 (7,00-13,50) *
CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺ , абс. $\times 10^9/\text{л}$	0,24 (0,20-0,29)	0,33 (0,28-0,41)*	0,17 (0,13-0,21)*	0,18 (0,12-0,25)*

CD3 ⁺ CD4 ⁺ , отн., %	39,00 (34,75-42,50)	39,00 (33,00-42,00)	44,50 (39,25-46,00)	40,50 (38,50-43,25)
CD3 ⁺ CD4 ⁺ , абс. $\times 10^9/\text{л}$	0,74 (0,64-0,92)	0,96(0,92-1,02)*	0,82 (0,73-0,90)	0,77 (0,70-1,04)
CD3 ⁺ CD25 ⁺ , отн., %	4,00 (4,00-6,25)	3,00 (2,25-4,50)	4,50 (3,25-5,00)	5,50 (3,50-6,75)
CD3 ⁺ CD25 ⁺ , абс. $\times 10^9/\text{л}$	0,07 (0,06-0,13)	0,10 (0,06-0,12)	0,08 (0,05-0,11)	0,08 (0,06-0,17)
CD4 ⁺ CD45RA ⁺ , отн., %	20,50 (17,25-23,00)	22,00 (16,25-24,00)	24,50 (15,50-27,50)	21,50 (16,75-24,75)
CD4 ⁺ CD45RA ⁺ , абс. $\times 10^9/\text{л}$	0,42 (0,36-0,48)	0,56 (0,47-0,58)*	0,41 (0,33-0,55)	0,47 (0,42-0,48)
% CD45RA в CD4	49,75 (42,10-59,27)	49,35 (41,25-60,45)	50,10 (38,57-59,22)	45,70 (41,57-56,87)
CD45RA ⁺ , отн., %	70,50 (68,50-75,50)	72,0(69,50-80,50)*	69,00 (67,50-72,00)*	72,00 (67,25-72,25)
CD45RA ⁺ , абс. $\times 10^9/\text{л}$	1,45 (1,31-1,50)	1,89 (1,67-2,41)*	1,30 (1,20-1,47)	1,39 (1,30-1,56)
CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺ , отн., %	9,50 (7,00-13,50)	10,50 (8,50-13,50)	10,50 (6,25-11,75)	9,00 (5,00-11,50)
CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺ , абс. $\times 10^9/\text{л}$	0,18 (0,13-0,24)	0,25 (0,20-0,37)*	0,18 (0,14-0,19)	0,16 (0,11-0,20)

*-достоверное различие с фоновым периодом ($p < 0.05$)

Обсуждение результатов

В результате проведённого исследования было показано, что уже спустя две минуты после завершения холодной экспозиции, наблюдается значимое увеличение общего количества лейкоцитов, происходящее за счёт повышения содержания всех анализируемых типов иммунокомпетентных клеток, однако к третьему часу количество лимфоцитов значимо снижается по сравнению с фоновым периодом. Это происходит в основном за счёт уменьшения количества естественных киллеров (NK-клеток) с фенотипом CD3⁺CD16⁺CD56⁺. Количество моноцитов и гранулоцитов сохраняется по-прежнему на высоком уровне, достоверно превышая фоновые показатели (таблица 6). Согласно имеющимся литературным данным, общее повышение клеток белой крови наблюдается после десятидневного курса криотерапии при температуре -130 °С. Пребывание в криосауне за сеанс также как и в проведённом эксперименте составляло три минуты (Lubkowska A, 2010). Интересно, что погружение в четырнадцатиградусную воду в течение двух часов приводит к уменьшению числа лимфоцитов (Brazaitis M, 2014). На данный момент в рамках существующих теорий дать точное объяснение наблюдаемым феноменам не представляется возможным. Вероятно, резкое увеличение общего количества лейкоцитов свидетельствует о сильной генерализованной реакции иммунной системы в ответ на холодовое воздействие. В этот момент происходит мобилизация клеточного и гуморального компонентов иммунной системы человека. Подобная активационная реакция иммунитета наблюдается при разных неспецифических воздействиях, так или иначе связанных с изменением в гормональном балансе (Dragoş D, 2010). В частности, было показано, что схожая реакция иммунной системы отмечается не только при гипо, но и гипертермическом воздействии (Banfi G, 2009), (Webber T, 2022) и даже внутрисемейных конфликтах (Dorr JM,

2000). Однако, о чём уже говорилось ранее, до настоящего времени остаётся открытым вопрос о полиморфизме реакции различных клеточных и гуморальных факторов иммунной системы человека на однотипное воздействие. Такая полиморфная реакция была показана в настоящем эксперименте не только среди различных типов клеток, но и среди субпопуляционного состава лимфоцитов. Если через две минуты после пребывания испытуемого-добровольца в воздушной криосауне наблюдается увеличение содержания разных типов лимфоцитов как в относительных, так и в абсолютных единицах, то уже к третьему часу восстановительного периода динамика имеет ряд серьёзных различий. Так, происходит значимое увеличение в абсолютных и относительных величинах содержания в периферической крови В-лимфоцитов ($CD19^+$), в то время как количество NK-клеток ($CD3^+CD16^+CD56^+$) значимо снижается. На фоне этого количество Т-хелперов ($CD4^+$), цитотоксических лимфоцитов ($CD8^+$) и Т-клеток, обладающих свойствами NK-клеток с фенотипом $CD3^+CD16^+CD56^+$, устремляется к фоновым значениям (таблица 6).

Достоверных различий в содержании активированных Т-лимфоцитов ($CD3^+CD25^+$) после холодового воздействия показано не было, при этом обращает на себя внимание сильное повышение общего количества этих клеток сразу после сеанса в криосауне. Количество клеток памяти ($CD4^+CD45RA^+$) достоверно повышается сразу после окончания воздействия с последующим приближением к фоновым значениям уже через час после завершения эксперимента.

Полиморфизм реакции в ответ на краткосрочное холодовое воздействие характерен и для системы естественной резистентности. Как видно из рисунков 8 и 9, после нахождения в воздушной криосауне происходит достоверное повышение абсолютного содержания моноцитов с фенотипом $CD14^+TLR4^+$. В эту же временную точку было показано достоверное уменьшение количества моноцитов с фенотипом $CD14^+TLR6^+$ в периферической крови, а уже через три часа после сеанса в криосауне, было отмечено увеличение процентного содержания моноцитов, экспрессирующих на своей поверхности TLR4 (рисунок 9). Содержание в периферической крови гранулоцитов, экспрессирующих на своей мембране TLR2, TLR4, TLR6 как в абсолютных, так и в процентных величинах достоверным не было, при этом наблюдалась тенденция к снижению их количества через две минуты после сеанса в криосауне с последующим постепенным восстановлением и превышением к третьему часу после холодового воздействия фоновых значений (рисунок 10).

Многие авторы связывают изменения количества лейкоцитов с активацией комплекса β_2 -адренорецепторов, экспрессируемого практически всеми типами иммунокомпетентных клеток, происходящего вслед за увеличением концентрации норадреналина в ответ на

гипотермическое воздействие (Wieduwild E et al, 2020; Brazaitis M et al, 2014). Активация $\beta 2$ -адренорецепторов является триггерным механизмом для последующего многоуровневого каскада реакций, который, в конечном итоге, приводит к повышению синтеза противовоспалительных (IL-10) уменьшению продукции провоспалительных цитокинов (IL-1 β , IL-6, IL-1 α , TNF- α , IL-12) за счёт активации в клетках цАМФ (Lubkowska A et al 2010), которые, в свою очередь, регулируют содержание различных типов лейкоцитов, циркулирующих в периферической крови. По данным других авторов, увеличение концентрации IL-6 может вызывать повышение синтеза кортизола, который способствует повышению количества в крови гранулоцитарных лейкоцитов за счёт ингибирования их связи с молекулами адгезии эндотелия сосудов, препятствуя их миграции в тканевой пул (Steensberg A et al, 2003).

Обобщая написанное выше, можно сделать вывод о том, что в настоящее время считается, что влияние низких и сверхнизких температур на иммунную систему реализуется через нейроэндокринные пути. Механизмы, описывающие прямое влияние гипотермического воздействия на различные компоненты иммунной системы человека, описаны не были.

В настоящем эксперименте впервые было показано, что краткосрочное пребывание испытуемых-добровольцев в воздушной криосауне оказывает разнонаправленное, преимущественно активирующее влияние на клеточные компоненты врождённого и адаптивного иммунитета организма человека. Полиморфизм реакции изученных показателей у разных испытуемых-добровольцев, характеризующих состояние клеточного компонента иммунитета, начинает проявляться через час после завершения воздействия, достигая максимума к третьему часу (рисунки 9, 10; таблицы 6,7,8).

Таблица 8. Некоторые индивидуальные показатели испытуемых-добровольцев, демонстрирующие полиморфизм реакции системы иммунитета до и после экспозиции в воздушной криосауне (количество клеток $\times 10^9/\text{л}$)

№ испытателя	Показатель	Фон	2 минуты	1 час	3 часа
1	CD14 ⁺ abs	411,38	500,76	441,6	449,19
2	CD14 ⁺ abs	285,94	236,25	243,39	192,96
3	CD14 ⁺ abs	114,24	157,3	211,12	249,48
1	TLR4 ⁺ mon, abs	67,24	84,48	52,83	137,76
2	TLR4 ⁺ mon, abs	133,32	148,32	256,12	119,6
3	TLR4 ⁺ mon, abs	49,72	394,5	137,44	246,48
1	TLR6 ⁺ mon, abs	106,16	51,72	62,04	126,84
2	TLR6 ⁺ mon, abs	274,32	272,56	278	206,56
3	TLR6 ⁺ mon, abs	140,7	331,05	254,72	193,72
1	CD3 ⁺ CD4 ⁺ abs	629	907	809	688
2	CD3 ⁺ CD4 ⁺ abs	555	734	536	582
3	CD3 ⁺ CD4 ⁺ abs	821	973	840	761
1	CD3 ⁺ CD8 ⁺ abs	703	1082	696	568
2	CD3 ⁺ CD8 ⁺ abs	707	1027	654	723
3	CD3 ⁺ CD8 ⁺ abs	344	475	309	311
1	CD19 ⁺ abs	385	345	575	594
2	CD19 ⁺ abs	168	171	164	212
3	CD19 ⁺ abs	325	385	343	329
1	CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺ abs	240	351	132	120
2	CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺ abs	168	245	134	123
3	CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺ abs	306	430	206	260

Как видно из таблицы 8, при холодном воздействии у разных людей наблюдается разнонаправленная динамика, характеризующаяся различной степенью выраженности. Так, у испытуемого №1 и №3 сразу после завершения воздействия наблюдается повышение абсолютного содержания в периферической крови CD14⁺-моноцитов, а у испытуемого №2-наоборот, происходит снижение количества этих клеток с сохранением динамики через один и три часа после завершения эксперимента. Обращает на себя внимание и различное нарастание динамики изменений, например у испытуемых-добровольцев №1 и №2 количество TLR4⁺ моноцитов по абсолютным значениям по сравнению с фоном через две минуты после экспозиции в криосауне практически не изменяется, в то время как у испытуемого №3 количество TLR4⁺ моноцитов увеличивается сразу в восемь раз. Наблюдаемые изменения, по-видимому, связаны с различной индивидуальной возможностью организма к ответу на

экстремальное холодное воздействие, а также различным балансом нейроэндокринных факторов, вызывающих изменение в системе иммунитета.

Заключение

Кратковременная экспозиция в воздушной криосауне оказывает влияние на клеточные компоненты иммунной системы человека. Трёхминутное пребывание при температуре -70°C , в подавляющем большинстве случаев, приводит к увеличению содержания в периферической крови клеток врождённого и адаптивного компонентов иммунитета сразу после завершения воздействия с последующим постепенным возвращением к фоновым значениям в течение трёх часов после пребывания в воздушной криосауне. Тем не менее, у некоторых испытуемых-добровольцев наблюдается снижение числа В-лимфоцитов, а также моноцитов, экспрессирующих TLRs с поверхностной локализацией. Также через час после воздействия у некоторых обследованных наблюдается снижение количества разных субпопуляций Т-лимфоцитов до уровня меньше исходного. Эти факты свидетельствуют о том, что в ответ на холодное воздействие происходит сложная перестройка в работе иммунитета, вероятно связанная с изменениями в ряде других физиологических системах организма, в первую очередь, в нейроэндокринной, а также действием эндогенных лигандов, таких как белки теплового шока на иммунные процессы. По-видимому, функционирование иммунной системы человека при холодном воздействии достигается за счёт непрерывного взаимодействия со всеми возможными эндогенными и экзогенными факторами, что находит своё отражение в волнообразных изменениях иммунологических параметров.

3.2. Иммунный статус после 18-часовой экспозиции в гипомагнитных условиях (эксперимент “АРФА”)

Оценка иммунного статуса испытуемых-добровольцев проводилась на основании разработанного алгоритма иммунологического обследования космонавтов и лиц, находящихся в экстремальных условиях среды обитания, для выявления дефектов в иммунной системе. Этот алгоритм оценки иммунной системы включает в себя определение в периферической крови абсолютного и относительного содержания:

- лейкоцитов, гранулоцитов, моноцитов, лимфоцитов,
- В-лимфоцитов,
- Т-лимфоцитов,
- основных субпопуляций Т-лимфоцитов.
- моноцитов и гранулоцитов, экспрессирующие TLRs с различной локализацией,
- лимфоцитов-естественных киллеров.

Такой выбор иммунологических показателей не случаен. Клетки, экспрессирующие TLRs, играют ключевую роль в инициации иммунного ответа. Клеточные факторы системы естественной цитотоксичности защищают организм человека от разнообразных инфекций и клеток с изменённой антигенной структурой. В- и Т-лимфоциты участвуют в развитии реакций адаптивного иммунитета и формировании иммунологической памяти.

Следует отметить, что относительное содержание иммунокомпетентных клеток в периферической крови отражает процент клеток с определённым фенотипом в рассматриваемом клеточном пуле, а абсолютное содержание представляет собой общее число клеток заданного фенотипа в единице объёма или же просто общее число конкретных клеток данного типа. Относительное и абсолютное количества клеток являются важными, взаимодополняющими показателями, характеризующими состояние клеточного иммунитета.

Анализ результатов, полученных при иммунологическом обследовании испытуемых-добровольцев до начала и после 18-часовой экспозиции в условиях либо плацебо, либо в гипомангнитных условиях (ГМУ), не выявил статистически значимых изменений абсолютного и относительного содержания лимфоцитов, моноцитов и гранулоцитов (таблица 9).

Таблица 9. Лейкограмма периферической крови испытуемых-добровольцев, участников эксперимента “ Арфа 20” (Me; q25-q75) (n=8)

Показатели		серии эксперимента плацебо		серии эксперимента ГМУ	
		До воздействия	После воздействия	До воздействия	После воздействия
Лимфоциты,	отн., %	43,1; 40,2-48,0	49,7; 38,8-51,8	39,6; 34,6-43,5	39,9; 34,3-45,2
	абс., $\times 10^9/\text{л}$	2,1; 1,9-2,2	2,2; 1,8-2,3	2,0; 1,8-2,2	2,1; 1,9-2,2
Моноциты,	отн., %	8,7; 6,4-11,7	7,0; 6,3-8,4	8,9; 6,3-9,4	7,6; 6,9-8,6
	абс., $\times 10^9/\text{л}$	0,4; 0,4-0,5	0,3; 0,3-0,4	0,4; 0,4-0,4	0,4; 0,3-0,4
Гранулоциты,	отн., %	46,5; 44,3-50,7	43,0; 40,6-51,8	52,4; 47,2-56,4	52,5; 44,6-59,5
	абс., $\times 10^9/\text{л}$	2,2; 2,2-2,6	1,9; 1,7-2,6	2,5; 2,2-2,7	2,6; 1,9-2,9

Исследование влияния факторов пребывания в экспериментальных условиях на фенотип клеточных факторов системы сигнальных образ-распознающих рецепторов клеток семейства Toll-like врождённого иммунитета показало, что по усредненным данным на группу содержание моноцитов и гранулоцитов, экспрессирующих TLR1, TLR2, TLR4 и TLR6, а также интенсивность экспрессии этих TLRs на моноцитах и гранулоцитах не изменялись (таблицы 10, 11). Однако при этом присутствовали выраженные индивидуальные флуктуации, как в сторону увеличения, так и в сторону снижения. относительном содержании моноцитов и гранулоцитов, экспрессирующих TLR1, TLR4 и TLR6.

Таблица 10. Содержание CD14⁺ моноцитов, экспрессирующих TLRs, и средняя интенсивность экспрессии (СИФ) TLRs на CD14⁺ моноцитах в периферической крови испытуемых-добровольцев, участников эксперимента “ Арфа 20 ” (Ме; q25-q75) (n=8)

Показатели		серии эксперимента плацебо		серии эксперимента ГМУ	
		До воздействия	После воздействия	До воздействия	После воздействия
TLR1	отн., %	11,0; 5,5-14,5	16,8; 14,0-25,8	14,8; 11,3-24,0	21,4; 6,7-48,8
	СИФ	1,8; 1,5-2,0	2,0; 2,0-2,0	1,8; 1,8-1,9	2,0; 1,7-2,7
TLR2	отн., %	99,9; 99,8-99,9	99,9; 99,7-100,0	100,0; 99,9-100,0	100,0; 99,8-100,0
	СИФ	47,6; 38,7-55,1	48,2; 37,1-62,8	70,0; 25,0-81,1	38,5; 28,3-70,3
TLR4	отн., %	24,9; 2,3-54,4	48,9; 15,2-53,4	21,4; 2,3-63,4	10,2; 4,2-44,1
	СИФ	1,7; 1,0-2,2	2,5; 2,0-2,6	1,9; 0,8-3,3	2,3; 1,4-2,8
TLR6	отн., %	34,4; 17,8-51,8	32,0; 23,3-60,6	41,1; 37,1-46,1	51,6; 38,4-55,5
	СИФ	4,4; 1,0-14,3	4,1; 2,5-8,8	5,1; 1,9-16,6	4,4; 2,6-6,4

Таблица 11 Содержание гранулоцитов, экспрессирующих TLRs, и средняя интенсивность экспрессии (СИФ) TLRs на гранулоцитах в периферической крови испытуемых-добровольцев, участников эксперимента “ Арфа 20 ” (Ме; q25-q75) (n=8)

Показатели		серии эксперимента плацебо		серии эксперимента ГМУ	
		До воздействия	После воздействия	До воздействия	После воздействия
TLR1	отн., %	2,2; 0,4-3,6	1,9; 1,4-2,4	1,4; 1,2-1,7	2,8; 0,7-4,9
	СИФ	1,2; 1,2-1,5	1,3; 1,2-1,4	1,2; 1,2-1,3	1,2; 1,2-1,4
TLR2	отн., %	97,6; 95,3-98,5	93,8; 90,8-97,3	95,7; 90,0-97,4	97,2; 94,6-97,7
	СИФ	8,0; 6,7-9,4	7,3; 5,4-9,1	9,4; 5,9-10,3	5,8; 4,9-9,1
TLR4	отн., %	2,3; 1,6-11,2	4,7; 1,6-14,6	1,5; 1,2-6,6	4,9; 1,9-8,5
	СИФ	1,3; 1,2-1,4	1,4; 1,3-2,1	1,2; 0,8-1,5	1,6; 1,0-1,7
TLR6	отн., %	3,4; 0,3-7,5	1,7; 1,2-3,1	3,0; 1,1-6,9	2,5; 1,7-4,7
	СИФ	2,2; 1,4-3,0	1,3; 1,2-1,9	2,1; 1,3-4,3	1,9; 1,2-2,0

При изучении количественных характеристик NK-лимфоцитов с фенотипом CD3⁺CD16⁺CD56⁺, В- и Т-лимфоцитов, а также двух основных субпопуляций Т-лимфоцитов – цитотоксических с фенотипом CD8⁺ и хелперных (CD4⁺-клеток), как в серии “плацебо”, так и в серии в условиях ГМУ, не было выявлено статистически достоверных изменений (таблица 12).

Таблица 12 Лимфоцитарный профиль периферической крови испытуемых-добровольцев, участников эксперимента “Арфа 20” (Ме; q25-q75) (n=8)

Лимфоциты		серии эксперимента плацебо		серии эксперимента ГМУ	
		До воздействия	После воздействия	До воздействия	После воздействия
CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺	отн., %	9,5; 8,1-11,4	9,9; 8,5-14,8	9,6; 8,2-12,4	12,8; 10,5-13,7
	абс., x10 ⁹ /л	0,18; 0,16-0,24	0,23; 0,17-0,31	0,18; 0,16-0,23	0,22; 0,20-0,29
CD19 ⁺	отн., %	9,4; 8,2-11,3	8,9; 6,7-12,2	10,6; 7,2-12,0	10,9; 7,8-11,6
	абс., x10 ⁹ /л	0,23; 0,14-0,25	0,23; 0,14-0,25	0,20; 0,15-0,23	0,20; 0,14-0,24
CD3 ⁺	отн., %	73,4; 68,5-78,3	71,9; 69,6-78,6	73,0; 70,4-77,3	71,8; 66,6-75,1
	абс., x10 ⁹ /л	1,56; 1,29-1,63	1,57; 1,31-1,79	1,46; 1,28-1,59	1,55; 1,20-1,65
CD3 ⁺ CD4 ⁺	отн., %	39,8; 37,7-42,0	44,5; 38,2-46,4	42,4; 38,0-45,1	40,8; 38,6-41,8
	абс., x10 ⁹ /л	0,88; 0,80-0,92	0,88; 0,82-0,99	0,91; 0,73-0,99	0,80; 0,77-0,86
CD3 ⁺ CD8 ⁺	отн., %	31,4; 26,1-34,3	29,2; 24,2-37,5	32,9; 26,3-36,9	28,4; 22,6-30,9
	абс., x10 ⁹ /л	0,66; 0,55-0,69	0,59; 0,48-0,84	0,62; 0,40-0,76	0,61; 0,36-0,67

Как показал анализ фактического материала, полученного перед началом каждой серии эксперимента, в обычных условиях труда и отдыха относительное и абсолютное содержание иммунокомпетентных клеток у испытуемых-добровольцев достоверно не изменялось (таблицы 9-12).

Учитывая тот факт, что ограничение подвижности испытуемого в течение 90 минут с последующей пятиминутной разминкой на протяжении 8 часов в положении сидя в кресле может оказать влияние на функционирование иммунной системы, представлялось целесообразным сравнить эффект пребывания в установке Арфа в условиях плацебо и в ГМУ на изученные показатели иммунного статуса. По усредненным показателям на группу статистически значимых различий данных, полученных после 18-часового воздействия ГМУ по сравнению с пребыванием в условиях плацебо, обнаружено не было (таблицы 10-12). Следует, однако, отметить, что при сравнении индивидуальных показателей подавляющее большинство из них было практически на одном уровне, а в некоторых случаях их значения совпадали. Направление вектора динамики изменений также было одинаковым.

Изменение в экспрессии генов проводящих путей TLRs как в серии с плацебо, так и с ГМУ также не имело практически никаких достоверных различий с фоновыми значениями (рисунки 11, 12.) Резервные возможности моноцитов отвечать на широкий спектр различных антигенов вирусного и бактериального генеза (при стимулировании TLRs коктейлем лигандов) также не подвергались значительным изменениям в серии ГМУ и плацебо (рисунки 13, 14)

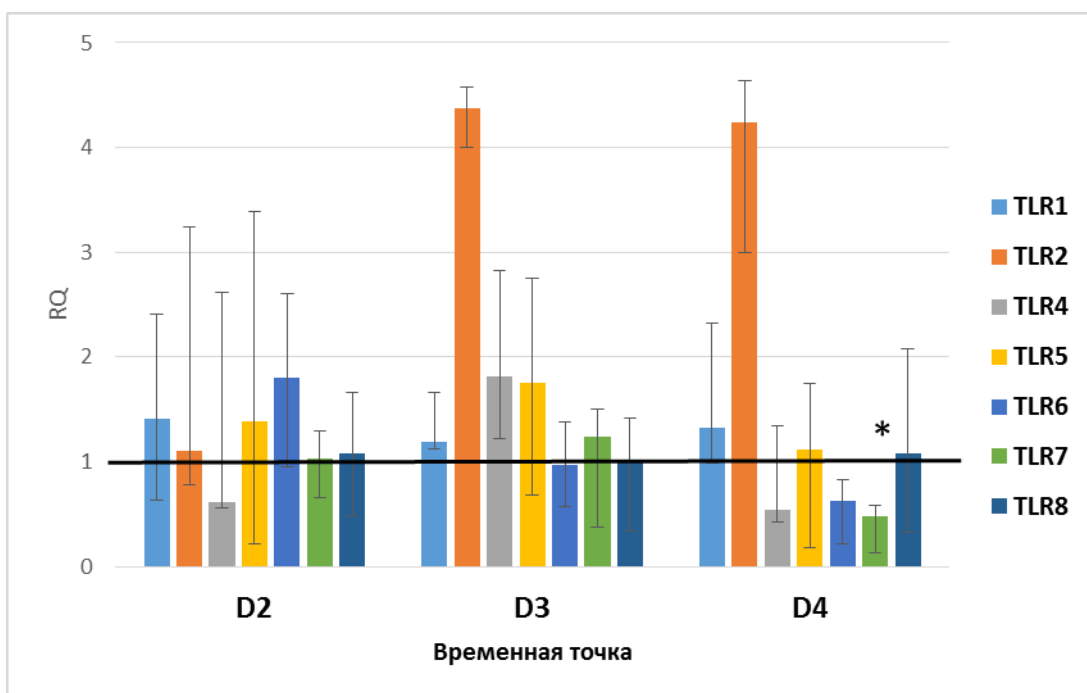


Рисунок 11. Экспрессия генов TLR моноцитов периферической крови испыталей-добровольцев, участников эксперимента “ Арфа 20 ” D2-значения после серии плацебо, D3-фоновые значения перед серией с ГМУ, D4-значение после экспозиции в ГМУ.

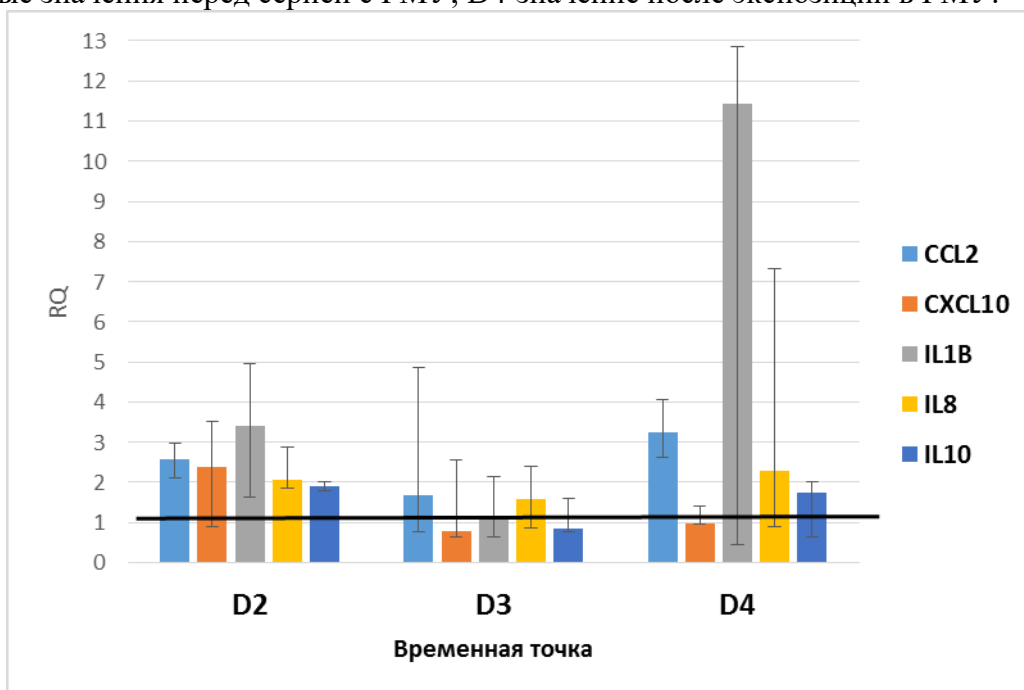


Рисунок 12. Экспрессия генов интерлейкинов и хемокинов моноцитов периферической крови испыталей-добровольцев, участников эксперимента “ Арфа 20” D2-значения после серии плацебо, D3-фоновые значения перед серией с ГМУ, D4-значения после экспозиции в ГМУ.

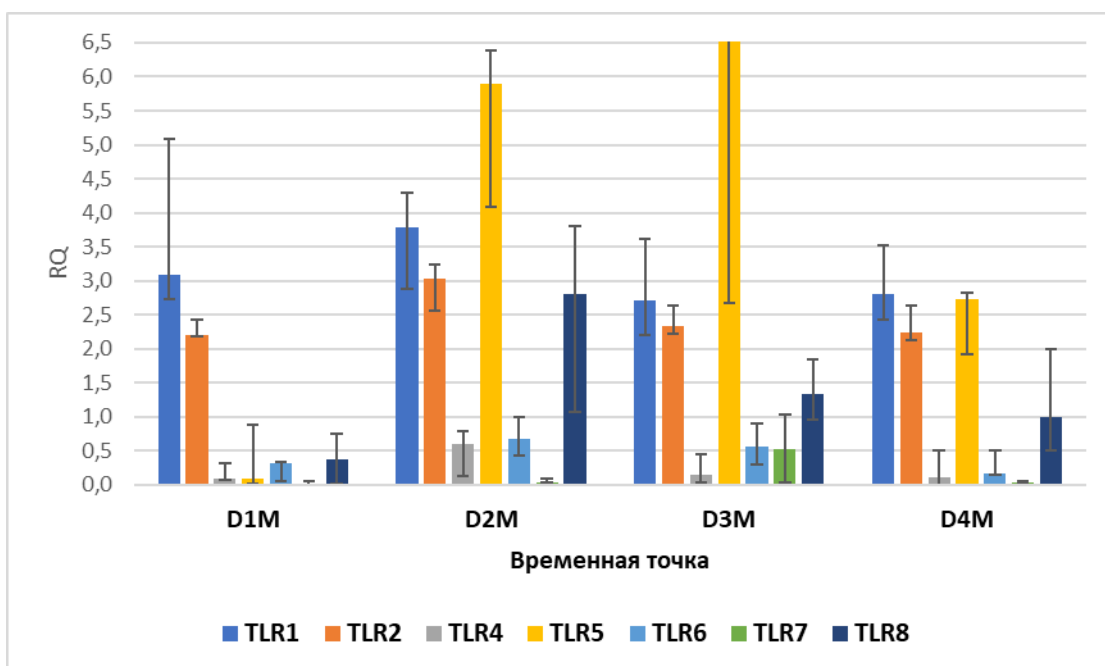


Рисунок 13. Экспрессия генов TLR моноцитов периферической крови испыателей-добровольцев, участников эксперимента “Арфа -20” ” при стимулировании моноцитов коктейлем лигандов TLR D2-значения после серии плацебо, D3-фоновые значения перед серий с ГМУ, D4-значения после экспозиции в ГМУ.

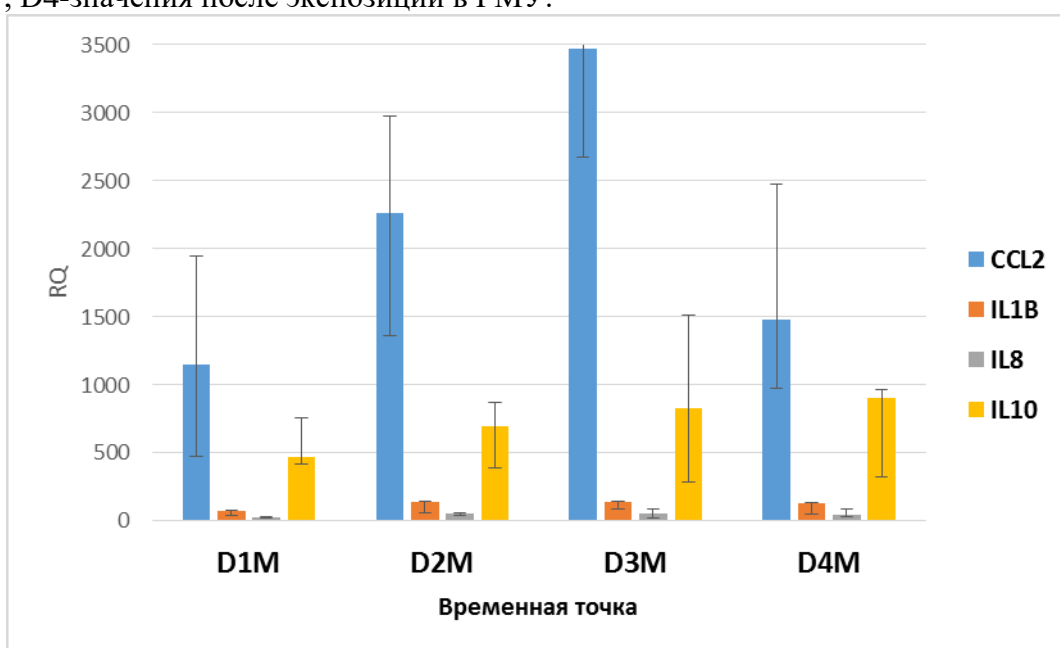


Рисунок 14. Экспрессия генов интерлейкинов и хемокинов моноцитов периферической крови испыателей-добровольцев, участников эксперимента “Арфа 20” ” при стимулировании моноцитов коктейлем лигандов TLR D2-значения после серии плацебо, D3-фоновые значения перед серий с ГМУ, D4-значения после экспозиции в ГМУ.

Обсуждение результатов

Напряженность магнитного поля Земли составляет 50 микротесла, что в тысячи раз сильнее, чем магнитное поле других планет земной группы - Марса, Меркурия. Именно мощное магнитное поле защищает земную поверхность и все живое на ней от мощного потока заряженных частиц, исходящих от Солнца. При дальнем космическом полете экипаж будет длительное время находиться в межпланетном магнитном поле, которое в 10^3 - 10^5 раз меньше, чем привычное геомагнитное поле. В настоящее время известно, что на человека пребывание даже не в очень «жестких» ГМУ действует, как правило, отрицательно (Martino C.F. et al 2010, Гурфинкель Ю.И. и др.. 2014). Но в то же время эффекты ГМУ на иммунный гомеостаз взрослого человека остаются пока не изученными. В этой связи несомненный интерес представляло в экспериментах с участием испытуемых-добровольцев оценить, может ли пребывание в ГМУ в течение нескольких часов оказать воздействие на систему иммунитета.

Проведённый анализ количественных характеристик клеточных факторов врожденного и адаптивного иммунитета испытуемых-добровольцев, находившихся в течение 18 часов в ГМУ, не выявил существенных изменений содержания в периферической крови моноцитов и гранулоцитов, экспрессирующих TLR, ЕК-, В- и Т-лимфоцитов, а также генов сигнального каскада TLR без стимуляции и при стимулировании культуры моноцитов соответствующими лигандами. Несмотря на незначительное число наблюдений, можно высказать предположение, что кратковременное воздействие моделируемого фактора гипоманитной среды (снижение магнитного поля около 1000 раз) не приводит к кардинальной перенастройке иммунного гомеостаза.

Заключение

Во время длительных КП за пределы низкой околоземной орбиты организм космонавтов будет подвергаться воздействию комплекса разнообразных неблагоприятных факторов, к которым кроме эффектов различных уровней гравитации, космической радиации, относятся и ГМУ. Исследования системы иммунитета, выполненные в рамках эксперимента «Арфа 20», установили, что 18-часовая экспозиция в условиях ослабленного магнитного поля (до 1000 раз) не выявили существенных изменений в состоянии системы сигнальных образраспознающих рецепторов, относящихся к семейству Toll-like, и системы естественной цитотоксичности врожденного иммунитета, а также В- и Т-звена адаптивного иммунитета испытуемых-добровольцев. Полученный фактический материал показывает, что для понимания вероятности и характера рисков нарушений в системе иммунного гомеостаза, а также оценки эффективности подходов к профилактике развития драматических изменений иммунной системы в условиях

межпланетных космических миссий необходимы дальнейшие исследования влияния гипомангнитной среды в экспериментах с участием человека большей продолжительности.

3.3. Состояние иммунитета человека во время нахождения в условиях искусственной среды обитания

3.3.1. Изоляционные эксперименты в гермообъекте с искусственной средой обитания различной продолжительности

Как было отмечено ранее, условия КП оказывают серьёзное комплексное влияние на организм человека. Изучение физиологических механизмов действия условий КП несомненно является сложной многоуровневой задачей, решить которую помогают различные наземные модельные эксперименты, имитирующие действия факторов КП. Одной из наземных моделей, позволяющей имитировать действие некоторых факторов, ассоциированных с реальным КП, является изоляция (как краткосрочная, так и длительная) человека в гермообъекте с искусственной средой обитания. В условиях изоляционной модели моделируются факторы КП, которые оказывают влияние на многие физиологические системы организма человека, включая и систему иммунитета. К таким факторам относятся: гипокинезия, искусственная среда обитания со своим константным составом атмосферы и микрофлоры, психоэмоциональное напряжение, нарушение циркадных ритмов. Изоляционные эксперименты позволяют выявлять закономерности процессов адаптации, происходящих в различных физиологических системах организма человека (включая и систему иммунитета), к условиям пребывания в герметично замкнутом ограниченном по площади и объёму пространстве.

В рамках данной работы было важно оценить в изоляционных экспериментах различной продолжительности влияние комплекса изоляционных факторов на молекулярно-клеточные процессы, происходящие в системе иммунитета организма человека с целью подтверждения гипотезы о том, что любые неспецифические воздействия вызывают ряд разнонаправленных изменений в показателях, характеризующих состояние адаптивного и врождённого иммунитета организма человека. Степень и направленность этих изменений зависят от текущего состояния организма.

3.3.1.1. 9-суточная изоляция (эксперимент “Луна-2015”)

Целью данного эксперимента являлось изучение характера и степени выраженности изменений, происходящих во врождённом и адаптивном компонентах иммунитета здоровых женщин в условиях краткосрочной (девятисуточной) изоляции в гермообъекте с искусственной средой обитания. В данном исследовании также была проведена оценка состояния иммунной

системы после вращения испытателей-добровольцев на ЦКР до и после краткосрочной изоляции в гермообъекте.

В ходе проведённого экспериментального исследования были выявлены изменения, происходящие в клеточном компоненте врождённого и адаптивного иммунитета. Эти изменения затрагивали как субпопуляционный лейкоцитарный состав, характеризующий процентное содержание клеток, экспрессирующих заданные маркёры, так и абсолютное или общее число клеток с заданным фенотипом в определённом клеточном пуле (таблицы 13,14; рисунки 15, 16).

Таблица 13. Показатели лейкограммы испытателей-добровольцев во время девятисуточной изоляции в гермообъекте с искусственной средой обитания и вращения на ЦКР. Данные представлены в виде Me(q25-q75).

Показатель	Время обследования				
	ФОН	ЦКР 1	5 сутки	9 сутки	ЦКР 2
Лейкоциты, абс., $\times 10^9$ /л	6,64(6,15-6,84)	4,85(3,22-5,69)	5,68(4,86-6,18)	6,24(4,91-6,20)	6,45(6,00-7,05)
Моноциты, отн., %	4,02(4,00-4,72)	5,94(5,00-6,00)*	2,81(2,7-3,84)*	6,19(6,01-6,78)*	4,95(4,00-5,00)
Моноциты, абс., $\times 10^9$ /л	0,27(0,26-0,28)	0,32(0,27-0,35)	0,18(0,16-0,22)*	0,38(0,35-0,45)*	0,30(0,29-0,32)
Лимфоциты, отн., %	30,08(21,20-40,34)	26,00(23,00-34,00)	39,98(29,86-40,74)	27,50(23,00-33,00)	24,00(23,00-32,67)
Лимфоциты, абс., $\times 10^9$ /л	2,03(1,37-2,57)	1,54(1,22-1,62)	2,04(1,67-2,47)	1,76(1,67-1,99)	1,65(1,58-1,91)
Гранулоциты, отн., %	65,42(54,89-74,56)	70,00(59,00-72,00)	57,21(54,18-67-55)	65(61-70,5)	72,00(62,38-72)
Гранулоциты, абс., $\times 10^9$ /л	3,80(3,70-4,77)	3,10(2,63-4,29)	3,40(2,91-3,52)	4,20(3,31-5,08)	4,8(3,7-5,1)

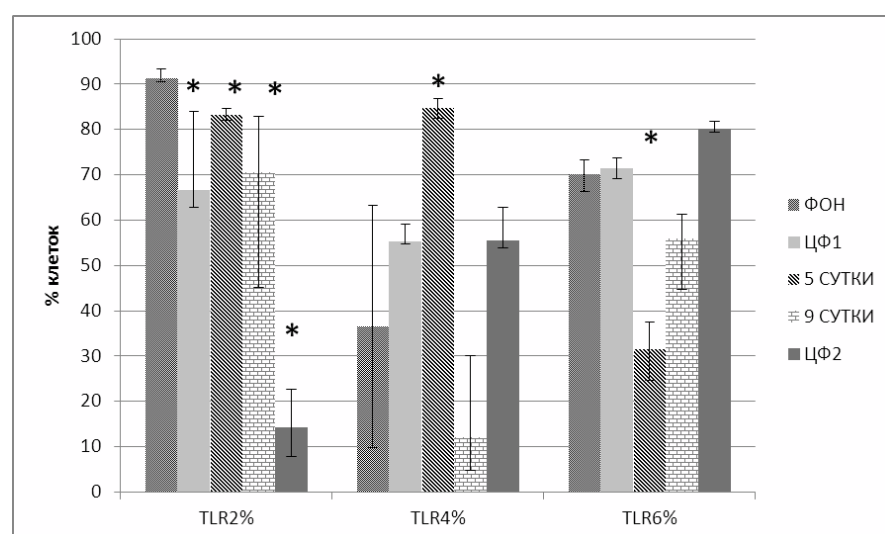
*-достоверное различие с фоном ($p < 0.05$)

Таблица 14 Показатели субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови испытуемых-добровольцев во время девятисуточной изоляции в гермообъекте с искусственной средой обитания и вращения на ЦКР.

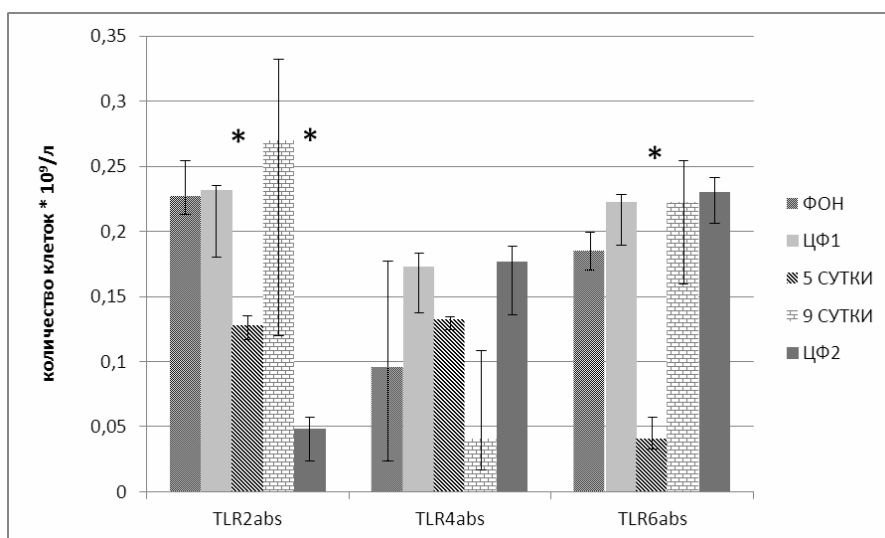
Данные представлены в виде Ме(q25-q75).

Показатель	Время обследования				
	ФОН	ЦКР 1	5 сутки	9 сутки	ЦКР 2
CD3 ⁺ , отн. %	74,6(71,1-76,6)	72,3(71,4-75,1)	76,7(75,4-78,5)	73,3(71,9-75,9)	71,9(58,5-75,5)
CD3 ⁺ , абс., $\times 10^9$ /л	1,76(1,44-2,08)	1,42(1,39-1,70)	2,168(1,94-2,39)*	1,98(1,76-2,08)	1,45(1,10-1,77)
CD3 ⁺ CD8 ⁺ , отн. %	25,7(21,0-28,1)	20,8(16,4-26,9)	27,4(24,1-30,5)	23,6(21,6-26,8)	25,7(20,9-27,1)
CD3 ⁺ CD8 ⁺ , абс., $\times 10^9$ /л	0,59(0,48-0,78)	0,32 (0,28-0,54)	0,65(0,63-0,82)	0,62(0,54-0,64)	0,561(0,43-0,65)
CD19 ⁺ , отн. %	10,9(8,9-12,8)	9,3(7,9-10,6)	9,5(7,7-11,9)	11,8(7,4-14,5)	10,2(8,8-11,0)
CD19 ⁺ , абс., $\times 10^9$ /л	0,24(0,15-0,38)	0,23(0,10-0,20)	0,31(0,21-0,41)	0,31(0,17-0,34)	0,21(0,19-0,23)
CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺ , отн. %	16,4(14,6-18,4)	13,6(12,3-20,6)	17,4(16,4-18,1)	4,5(4,2-11,6)	1,3(1,3-1,3)*
CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺ , абс., $\times 10^9$ /л	0,50(0,43-0,52)	0,23(0,17-0,26)*	0,33(0,27-0,45)	0,40(0,31-0,53)	0,20(0,17-0,23)*
CD3 ⁺ CD4 ⁺ , отн. %	45,9(45,1-49,0)	44,5(33,3-45,9)	54,2(49,3-55,3)*	48,2(43,1-53,3)	38,2(38,1-45,5)
CD3 ⁺ CD4 ⁺ , абс., $\times 10^9$ /л	1,11(0,96-1,19)	0,80(0,54-0,98)	1,40(1,34-1,47)*	1,24(1,09-1,37)	0,89(0,71-0,10)

*-достоверное различие с фоном ($p < 0.05$)



A

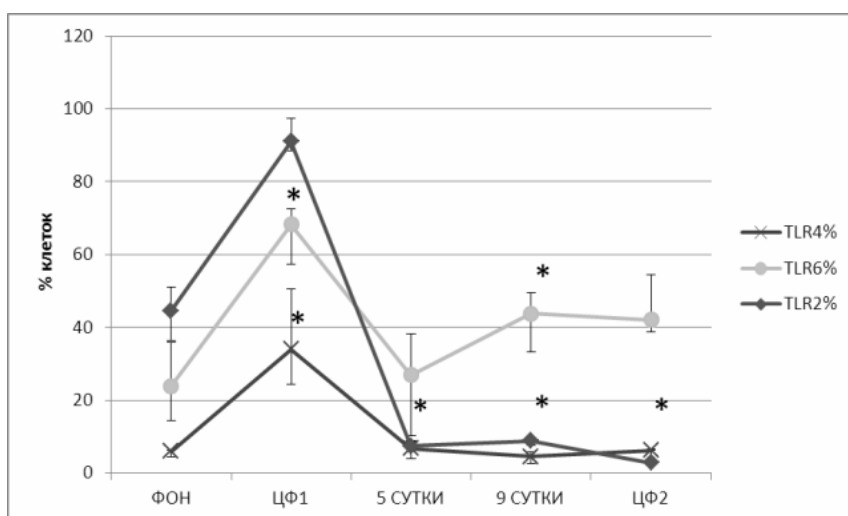


Б

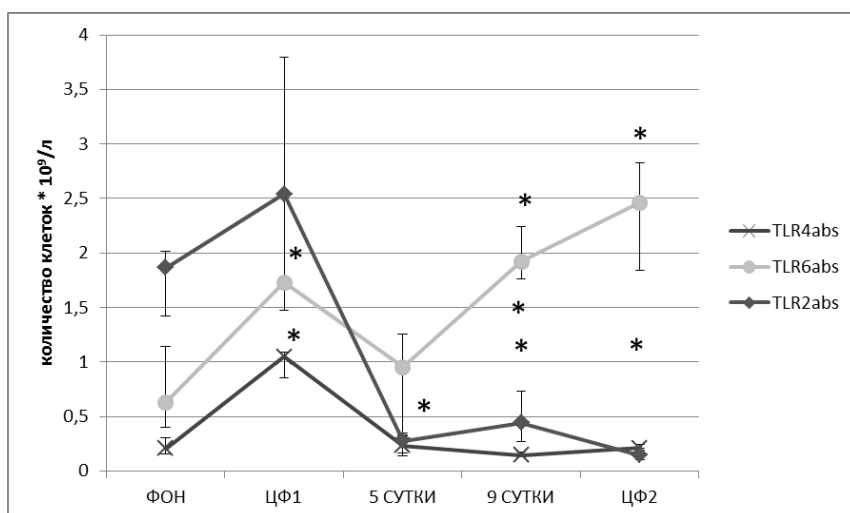
Рисунок 15. Динамика изменений процентного (А) и абсолютного (Б) содержания моноцитов, экспрессирующих на своей поверхности TLR2, TLR4 и TLR6 в периферической крови испытуемых-добровольцев во время девятисуточной изоляции в гермообъекте с искусственной средой обитания и вращения на ЦКР.

Данные представлены в виде Ме (q25-q75)

*-достоверное различие с фоном ($p < 0.05$)



А



Б

Рисунок 16. Динамика изменений относительного (А) и абсолютного (Б) содержания гранулоцитов, экспрессирующих на своей мембране TLR2, TLR4 и TLR6, в периферической крови испытуемых-добровольцев во время девятисуточной изоляции в гермообъекте с искусственной средой обитания и вращения на ЦКР.

Данные представлены в виде Ме (q25-q75)

*-достоверное различие с фоном ($p < 0.05$)

Обсуждение результатов

Как видно из приведённых выше таблиц и рисунков, количество значимо меняющихся параметров, характеризующих состояние системы естественной резистентности выше, чем приобретённого иммунитета, что свидетельствует о большей вовлеченности клеточных факторов врождённого компонента иммунитета в процессы адаптации к условиям пребывания в гермообъекте с искусственной средой обитания и вращения на ЦКР. Интересной особенностью является тот факт, что искусственная сила тяжести (ИСТ), генерируемая ЦКР до и после завершения изоляционного воздействия, приводит к различной реакции компонентов врождённого и адаптивного иммунитета. Как видно из таблицы 14, изменения в адаптивном компоненте иммунной системы испытуемых-добровольцев после окончания вращения на ЦКР до и после изоляционного эксперимента носят схожий характер. В то же время, динамика изменений клеточных факторов врождённого иммунитета после завершения вращения на ЦКР до и после девятисуточной изоляции гетерогенна.

Говоря об изменениях, наблюдаемых в адаптивном звене иммунной системы, в первую очередь, следует обратить внимание на значимое повышение абсолютного числа Т-лимфоцитов ($CD3^+$) на пятые сутки адаптации к условиям изоляции в гермообъекте с искусственной средой обитания по сравнению с фоновыми значениями. В то же время их относительное соотношение в пуле клеток достоверно не меняется (таблица 14). Повышение количества Т-клеток происходит за счёт увеличения количества Т-хелперов ($CD3^+CD4^+$).

Примечательно, что одновременно с повышением абсолютного числа Т-хелперных клеток ($CD3^+CD4^+$) происходит увеличение их процентного содержания, наблюдаемое также на пятые сутки изоляции, что может характеризовать особенность физиологических процессов, протекающих в приобретённом иммунитете в раннем периоде адаптации к условиям изоляции в гермообъекте. Следует отметить, что увеличение уровня Т-хелперов наблюдается после окончания длительных полётов на МКС (Morukov B et al 2011; Crucian B et al, 2021). Можно сделать предположение, что подобное повышение происходит из-за выраженной неспецифической реакции приобретённого компонента иммунитета на мультифакторные стрессорные воздействия (Рыкова М.П. 2013).

Абсолютное и относительное число В-клеток ($CD19^+$), равно как и содержание цитотоксических лимфоцитов ($CD3^+CD8^+$) в течение всего экспериментального воздействия значимо не изменялось (таблица 10). Интересно, что во время длительной, 520-суточной изоляции в гермообъекте наблюдалась схожая тенденция относительно данных клеточных субпопуляций (Моруков Б.В. 2013; Yi B et al 2015).

Относительное содержание NK-клеток с фенотипом $CD3^-CD16^+CD56^+$ после вращения на ЦКР, проводимое после завершения краткосрочной изоляции, значимо уменьшалось по сравнению со значениями, полученными в фоновом периоде. Абсолютное содержание NK-лимфоцитов в периферической крови также достоверно снижалось после вращения на ЦКР как до, так и после изоляционного исследования. Снижение числа естественных киллеров после завершения вращения на ЦКР может быть обусловлено острой стрессорной реакцией организма на действие перегрузок. Снижение количества естественных киллеров по сравнению с фоновыми значениями происходит и после краткосрочных КП на первые сутки реадаптации к земным условиям (Crucian B et al 2013), а также во время 90-суточной антиортостатической гипокинезии на 45, 83 сутки и на первые сутки после завершения эксперимента (Crucian B et al 2009).

Как было описано выше, наибольшее количество изменений происходит в системе естественной резистентности. В ходе эксперимента было показано, что уже после первого вращения на ЦКР наблюдается значимое повышение относительного, и тенденция к повышению абсолютного количества моноцитов периферической крови испытуемых-добровольцев (таблица 13). На пятые сутки экспериментального воздействия происходит достоверное уменьшение как абсолютного, так и процентного числа моноцитов с их последующим значимым повышением на девятые сутки исследования. Постизоляционное вращение оказывает влияние на абсолютное и относительное содержание моноцитов в

периферической крови, приводя к их снижению по сравнению с девятью сутками с последующим возвращением к фоновым значениям (таблица 13).

Изменение абсолютного и относительного содержания $CD14^+$ моноцитов, экспрессирующих на своей мембране TLR 2, TLR 4 и TLR 6, имеет разнонаправленный характер, при этом фиксируемая динамика носит одинаковую направленность для всех испытуемых-добровольцев (рисунок 15). Из данного рисунка видно достоверное уменьшение процентного содержания $CD14^+$ моноцитов с фенотипом $TLR2^+$ после первого вращения на ЦКР. Изменения общего числа $CD14^+$ - моноцитов, экспрессирующих на своей мембране TLR2 достоверными не были.

Во время изоляционного эксперимента относительное и абсолютное количество $TLR2^+$ -моноцитов снижается по сравнению с фоновым периодом. Интересно, что после завершения первого вращения практически отсутствовали изменения в содержании в периферической крови $CD14^+$ моноцитов, экспрессирующих на своей поверхности TLRs, в то время как после вращения, проведенного после завершения девятисуточной миссии, количество $TLR2^+$ - моноцитов резко уменьшается. Содержание абсолютного и процентного количества $CD14^+$ $TLR4^+$ - моноцитов достоверно не изменяется, за исключением пятых суток эксперимента, во время которых наблюдается достоверное повышение по сравнению с фоновыми значениями относительного числа $CD14^+$ $TLR4^+$ - клеток. Кроме того, на 9 сутки миссии наблюдается уменьшение абсолютного и относительного количества моноцитов с фенотипом $CD14^+$ $TLR4^+$.

Говоря о динамике изменений $CD14^+$ $TLR6^+$ -клеток, следует обратить внимание, что к пятым суткам эксперимента происходит достоверное уменьшение относительного и абсолютного количества $CD14^+$ $TLR6^+$ моноцитов с их последующим резким повышением после второго вращения на ЦКР (рисунок 15).

Иная динамика изменений наблюдается в гранулоцитарном пуле клеток. Так, было показано, что общее содержание (в абсолютных и процентных величинах) гранулоцитарных клеток значимо не менялось на протяжении всей миссии (таблица 9), при этом количество гранулоцитарных клеток периферической крови, экспрессирующих на своей мембране TLR2, TLR4 и TLR6 сильно меняется на протяжении эксперимента (рисунок 16).

Во-первых, следует отметить, что абсолютное и относительное содержание гранулоцитов в периферической крови, экспрессирующих на своей поверхности, TLR4 и TLR6 после первого вращения достоверно увеличивается по сравнению с фоновым периодом, при этом изменение количества $TLR2^+$ - гранулоцитов после вращения значимым не было (рисунок 16).

Во-вторых, к пятым суткам экспериментального воздействия происходит значимое снижение TLR2⁺-гранулоцитов по абсолютным и относительным величинам. TLR4⁺ и TLR6⁺ гранулоцитарные клетки периферической крови также демонстрировали выраженную тенденцию к снижению их абсолютного и относительного количества. На девятые сутки пребывания экипажа в изоляции происходит достоверное снижение содержания TLR4⁺ гранулоцитов по абсолютным и относительным значениям. В это же время показана тенденция к снижению процентного числа TLR4⁺ гранулоцитов по сравнению с фоном. Абсолютное и относительное количество TLR6⁺ - гранулоцитов к девятым суткам по сравнению с TLR2⁺ и TLR4⁺ - гранулоцитами, было увеличено по отношению к фоновым значениям (рисунок 16).

В-третьих, вращение на ЦКР после завершения миссии не оказывало сколь бы то ни было существенного влияния на динамику содержания абсолютного и относительного количества гранулоцитов, экспрессирующих на своей поверхности TLR2.

Абсолютное и относительное содержание гранулоцитов с фенотипом TLR4⁺ - после окончания вращения на ЦКР по завершению изоляционного эксперимента значимо не изменялось по сравнению с фоновыми значениями. Вращение на ЦКР после завершения миссии привело к дальнейшему увеличению абсолютного количества TLR6⁺ - гранулоцитов, содержание которых было достоверно выше фоновых значений на девятые сутки пребывания в гермообъекте. Процентное содержание гранулоцитов, экспрессирующих на клеточной мембране TLR6, достоверно увеличивалось после первого вращения на ЦКР, а также на 9 сутки изоляции (рисунок 16).

Примечательно, что разные клеточные факторы системы естественной резистентности демонстрируют полиморфизм реакций на условия эксперимента (рисунки 15,16). Различные типы реакций моноцитов и гранулоцитов, экспрессирующих сигнальные PRR, описаны рядом авторов (Trzpis K et al 2014; Пономарёв С.А. и др. 2021), однако на сегодняшний день причины этого феномена остаются неизвестными. Вероятно, описываемые изменения в разных экспериментальных воздействиях и при заболеваниях различной этиологии, отличия в реакции клеток врождённого иммунитета связаны с биологическими особенностями гранулоцитов и моноцитов, а также различной восприимчивостью этих типов клеток к действию экстремальных условий или факторов болезни. Известно, что основной функцией нейтрофильных гранулоцитов является элиминация патогенов, главным образом бактериального и грибкового происхождения путём фагоцитоза начиная с этапов попадания в организм микроорганизмов (Silvestre-Roig C et al 2019) Моноциты, кроме фагоцитоза, принимают участие в запуске каскада реакций адаптивного иммунитета путём трансформации в антиген-презентирующие клетки и продукции цитокинов (Münter R et al 2022). Помимо этого,

моноциты играют важную роль в защите организма от вирусных и паразитарных инфекций, а также вовлечены в процессы противоопухолевого иммунитета (Wallis ZK et al 2022).

Во время изоляционного эксперимента наблюдалось статистически значимое уменьшение содержания $TLR2^+$ - моноцитов и гранулоцитов как по абсолютным, так и по процентным величинам. Подобная динамика может свидетельствовать об отсутствии в достаточном для активации клеток врождённого иммунитета микроорганизмов, имеющих в составе мембраны гликолипиды, пептидогликан, липопротеины, достаточные для активации $TLR2$ (Пономарёв и др. 2017, Jung SY et al 2021).

Значимое увеличение на пятые сутки экспериментального воздействия процентного числа моноцитов, экспрессирующих на своей мембране $TLR4^+$ при отсутствии достоверных изменений их абсолютного количества может говорить о сдвигах субпопуляционного состава моноцитов за счёт достоверного снижения как абсолютного, так и относительного содержания моноцитов с фенотипом $CD14^+TLR6^+$. На девятые сутки изоляции наблюдалось снижение абсолютного и относительного количества $TLR4^+$ - гранулоцитов. Это также может свидетельствовать о снижении в гермообъекте микроорганизмов, имеющих в своём составе ЛПС, принимающим участие в активации $TLR4$ (Пономарёв и др. 2017, Zhang Y et al 2022).

Различная динамика изменения количества $TLR6^+$ моноцитов и гранулоцитов в периферической крови испытуемых-добровольцев в очередной раз иллюстрирует гетерогенную реакцию этих типов клеток в условиях пребывания экипажа в гермообъекте с искусственной средой обитания.

Примечательно, что вращение на ЦКР после изоляционного эксперимента не приводит к повышению абсолютного и относительного числа $TLR2^+$ и $TLR4^+$, гранулоцитов, а также $TLR2^+$ моноцитов. Полученные результаты свидетельствуют о том, что реакция системы естественной резистентности на действие перегрузок до и после девятисуточной изоляции в гермообъекте, различна.

Как видно из приведённых выше таблиц и рисунков, вращение на ЦКР, равно как и условия изоляции в гермообъекте с искусственной средой обитания, оказывают гетерогенное влияние на отдельные показатели, характеризующие иммунный статус. Кроме того, следует выделить индивидуальные различия в реакции иммунной системы (таблица 15).

Таблица 15. Индивидуальные показатели иммунной системы испытуемых-добровольцев после вращения на ЦКР и девятисуточной изоляции в гермообъекте.

№ испытателя	Показатель	Фон	ЦКР	5 сутки	9 сутки	ЦКР2
4	CD3 ⁺ CD8 ⁺ abs	561	280	635	651	694
5	CD3 ⁺ CD8 ⁺ abs	627,0	655,0	971,0	634,0	485,0
6	CD3 ⁺ CD8 ⁺ abs	357	321	502	508	286
4	CD19 ⁺ abs	163	81	181	138	224
5	CD19 ⁺ abs	313	374	474	362	251
6	CD19 ⁺ abs	178	232	301	329	172
4	CD14 ⁺ abs	217,0	117,6	105,8	220,4	339,8
5	CD14 ⁺ abs	258,0	312,2	138,7	440,0	304,1
6	CD14 ⁺ abs	234,0	374,4	164,8	418,8	281,2
4	CD3 ⁺ CD4 ⁺ abs	579,0	443,0	1202,0	1066,0	1142,0
5	CD3 ⁺ CD4 ⁺ abs	1208,0	982,0	1492,0	1042,0	719,0
6	CD3 ⁺ CD4 ⁺ abs	910,0	1017,0	1404,0	1643,0	687,0
4	CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺ abs	506	262	272	454	201
5	CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺ abs	515	234	521	363	100
6	CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺ abs	420	176	489	607	341
4	TLR4 ⁺ mon, abs	27,8	64,6	84,3	30,0	188,9
5	TLR4 ⁺ mon, abs	22,5	172,7	121,5	12,8	227,4
6	TLR4 ⁺ mon, abs	204,4	137,4	134,5	52,0	135,8
4	TLR6 ⁺ mon, abs	149,7	77,8	35,9	73,9	272,2
5	TLR6 ⁺ mon, abs	169,0	222,6	32,2	235,2	241,1
6	TLR6 ⁺ mon, abs	200,5	189,6	61,2	363,5	206,4

Так, у четвёртого испытуемого наблюдается снижение цитотоксических Т-лимфоцитов сразу после завершения вращения на ЦКР до начала изоляции, в то время как у испытуемого №5 действие ИСТ до изоляционного воздействия вызывает увеличение CD8⁺ лимфоцитов, при этом вращение после изоляции у 4-го испытуемого-добровольца приводит к их резкому возрастанию, в то время как у 5-го - наоборот, наблюдается значительное снижение по сравнению с фоновыми значениями.

Заключение

Обобщая полученные в ходе реализации научного проекта результаты, можно сказать о том, что описанные выше изменения отражают сложный адаптационный процесс, происходящий в иммунной системе человека в ранний период адаптации к условиям нахождения в герметично замкнутом пространстве с искусственной средой обитания, и вращения на ЦКР. В разные периоды времени иммунная система одного и того же испытуемого -

добровольца отвечает на одинаковые воздействия по-разному. Вероятно, это зависит напрямую от состояния резервных возможностей иммунитета в конкретный момент времени.

3.3.1.2. Эксперимент с 17-суточной изоляцией в гермообъекте с искусственной средой обитания (проект “SIRIUS”)

Целью данного эксперимента являлось изучение влияния экстремальных факторов окружающей среды, ассоциированных с изоляцией, на состояние клеточного звена адаптивного и врождённого иммунитета. Особенностью данного эксперимента являлась депривация сна, проведённая с четырнадцатых на пятнадцатые сутки экспериментального воздействия. Кроме того, в эксперименте принял участие испытатель-доброволец №4, принимавший участие в девятисуточном изоляционном исследовании.

Таблица 16. Лейкограмма испытателей-добровольцев во время 17-суточной изоляции в гермообъекте с искусственной средой обитания.

Показатель	Время обследования						
	ФОН		7 сутки	14 сутки	15 сутки (после депривации)	1 сутки ПВ	7 сутки ПВ
Лейкоциты, абс., $\times 10^9$ /л	Ме	5,10	5,15	5,90	6,35	6,00	4,75
	Q75	5,60	5,58	5,90	6,83	6,28	5,13
	Q25	4,45	4,80	5,80	5,88	5,28	4,45
Моноциты, отн., %	Ме	5,15	5,20	5,80	5,10	4,75	5,80
	Q75	6,53	7,48	12,80	5,78	5,13	6,78
	Q25	4,90	4,43	5,10	4,53	4,53	5,43
Моноциты, абс., $\times 10^9$ /л	Ме	0,30	0,25	0,30	0,30	0,30	0,30
	Q75	0,30	0,38	0,80	0,33	0,30	0,38
	Q25	0,23	0,20	0,20	0,30	0,23	0,30
Лимфоциты, отн., %	Ме	36,20	34,25	38,30	35,80	30,95	38,00
	Q75	37,83	38,25	38,40	42,10	39,63	39,90
	Q25	33,60	33,10	33,50	29,68	27,15	37,50
Лимфоциты, абс., $\times 10^9$ /л	Ме	1,75	1,70	2,20	2,45	2,00	1,90
	Q75	2,03	1,88	2,30	2,75	2,10	2,08
	Q25	1,55	1,60	2,00	1,98	1,68	1,73
Гранулоциты , отн., %	Ме	58,90	59,60	55,10	59,85	64,35	55,25
	Q75	60,00	61,70	61,40	65,43	68,63	56,95
	Q25	54,13	54,35	48,90	53,25	55,80	54,08
Гранулоциты , абс., $\times 10^9$ /л	Ме	2,85	2,95	2,90	4,05	3,90	2,65
	Q75	3,60	3,43	3,30	4,33	4,53	3,10
	Q25	2,70	2,70	2,80	3,48	3,05	2,43

Анализ показателей лейкограммы периферической крови испытателей-добровольцев, принимавших участие в семнадцатисуточной изоляции не выявил статистически значимых

изменений по сравнению с фоновыми показателями относительного и абсолютного количества клеток (таблица 16), однако наблюдалась выраженная тенденция к увеличению лимфоцитов и гранулоцитов после завершения депривации сна.

Анализ результатов, полученных при изучении состояния системы естественной цитотоксичности, показал, что статистически значимые изменения – снижение относительного содержания в периферической крови зрелых циркулирующих лимфоцитов с фенотипом $CD3^+CD16^+CD56^+$ по абсолютным и относительным значениям наблюдались после депривации сна, завершения изоляции. Уменьшение количества NKT-клеток с фенотипом ($CD3^+CD16^+CD56^+$), сочетающих в себе свойства как Т-, так и ЕК-лимфоцитов, также по процентным и абсолютным значениям, наблюдались после депривации, на седьмые сутки изоляции, а также на первые сутки после завершения семнадцатисуточной изоляции в гермообъекте с сохранением динамики до седьмых суток (таблица 17).

Исследования ряда показателей, характеризующих состояние приобретённого иммунитета, позволили установить, что во время и после завершения семнадцатисуточного периода пребывания в гермообъекте с искусственной средой обитания, у испытуемых-добровольцев наблюдались изменения абсолютного и относительного содержания В- и Т-лимфоцитов. Относительное количество Т-хелперов значимо повышалось на седьмые сутки эксперимента, а также на седьмые сутки после завершения изоляционного воздействия. Абсолютное содержание $CD4^+$ лимфоцитов достоверно повышалось на пятнадцатые сутки (сразу после завершения периода депривации). Количество цитотоксических лимфоцитов значимо снижалось на седьмые сутки, а также на первые сутки после завершения эксперимента по относительным значениям (таблица 17).

Анализ содержания активированных Т-лимфоцитов ($CD3^+CD25^+$) выявил статистически достоверное снижения их количества по относительным и абсолютным величинам на седьмые и четырнадцатые сутки эксперимента, а также на седьмые сутки после изоляционного воздействия. Следует отметить, что при анализе абсолютного и процентного количества в периферической крови регуляторных $CD4^+$ -Т-клеток ($CD4^+CD25^+Bright$) на седьмые и четырнадцатые сутки пребывания в условиях изоляции было выявлено статистически достоверное снижение этих показателей. На первые сутки восстановительного периода наблюдалось повышение этих показателей по сравнению с четырнадцатыми сутками экспериментального воздействия с приближением к фоновым значениям, а на седьмые сутки после завершения воздействия, вновь наблюдалось их значимое снижение (таблица 17).

Таблица 17. Показатели субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови испытуемых-добровольцев во время семнадцатисуточной изоляции в гермообъекте с искусственной средой обитания.

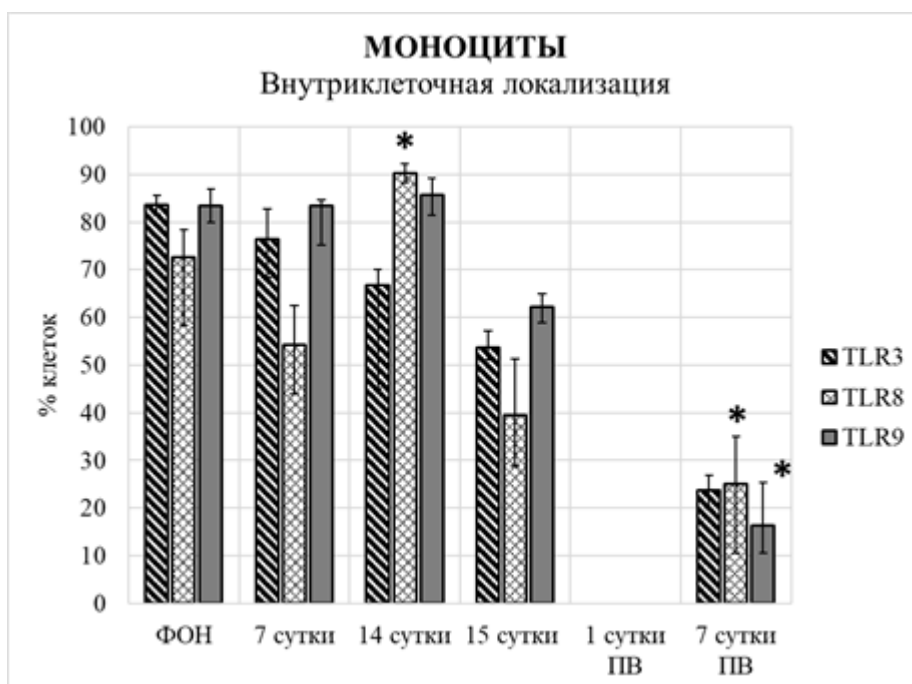
Показатель	Время обследования						
	ФОН		7 сутки	14 сутки	15 сутки (после депривации)	1 сутки ПВ	7 сутки ПВ
CD3 ⁺ CD16/56 ⁺ , %	Me	10,00	8,00	8,00	6,50	8,00*	8,00
	Q75	11,50	9,75	13,00	8,25	10,00	9,00
	Q25	9,25	6,25	5,00	5,75	5,25	7,00
CD3 ⁺ CD16/56 ⁺ ,abs	Me	194,0 0	141,50	184,00	158,50*	154,00*	160,00
	Q75	229,7 5	156,50	185,00	162,25	162,00	182,50
	Q25	157,5 0	120,50	122,00	153,00	116,75	154,00
CD3 ⁺ CD16/56 ⁺ , %	Me	8,00	4,00*	5,00	2,50*	4,00*	3,50*
	Q75	10,50	6,50	7,00	4,50	5,75	6,25
	Q25	5,50	2,25	4,00	2,00	2,25	2,25
CD3 ⁺ CD16/56 ⁺ ,abs	Me	121,5 0	71,00*	122,00	56,50*	60,00*	69,00*
	Q75	173,5 0	108,50	161,00	94,00	133,50	113,50
	Q25	102,5 0	41,75	90,00	50,75	39,00	50,75
CD19 ⁺ , %	Me	9,50	9,00	11,00	10,00	9,50	9,50
	Q75	11,00	9,75	11,00	12,75	10,00	10,75
	Q25	8,00	6,00	8,00	7,25	7,50	8,25
CD19 ⁺ , abs	Me	177,0 0	142,50	194,00	170,00	159,00	169,50
	Q75	199,2 5	178,75	253,00	242,50	203,50	217,50
	Q25	128,5 0	103,25	145,00	156,00	129,50	156,75
CD3 ⁺ ,%	Me	78,00	81,00	80,00	81,00	79,00	78,00
	Q75	79,75	81,75	81,00	83,00	83,25	80,50
	Q25	77,00	78,75	80,00	78,25	77,00	76,25
CD3 ⁺ ,abs	Me	1448, 00	1421,50	1782,00	2063,50	1597,50	1544,00
	Q75	1666, 50	1590,00	1862,00	2322,50	1751,50	1717,50
	Q25	1161, 25	1265,00	1582,00	1606,75	1292,00	1423,00
CD3 ⁺ CD4 ⁺ ,%	Me	47,50	49,00*	50,00	48,50	47,00	50,50*
	Q75	50,75	52,75	53,00	52,25	52,50	53,75
	Q25	43,50	44,50	43,00	44,25	40,75	44,25
CD3 ⁺ CD4 ⁺ ,abs	Me	804,5 0	814,00	1045,00	1180,00*	899,50	985,50
	Q75	1025, 00	959,25	1180,00	1296,75	995,50	1037,50
	Q25	764,7 5	755,00	988,00	1004,00	807,25	941,00
CD3 ⁺ CD8 ⁺ ,%	Me	30,00	29,00*	31,00	30,50	25,00*	29,00

Показатель	Время обследования						
	ФОН		7 сутки	14 сутки	15 сутки (после депривации)	1 сутки ПВ	7 сутки ПВ
	Q75	30,75	30,00	34,00	33,50	28,00	29,75
	Q25	25,50	24,25	25,00	29,00	23,50	27,50
CD3 ⁺ CD8 ⁺ ,abs	Me	582,50	463,00	613,00	785,50	548,50	563,00
	Q75	679,50	571,25	757,00	957,00	629,75	665,75
	Q25	403,00	382,50	460,00	585,75	338,25	440,00
CD3 ⁺ CD25 ⁺ , %	Me	5,50	4,00*	2,00*	7,00	6,00	1,50*
	Q75	7,50	4,75	2,00	7,00	6,75	2,00
	Q25	5,00	2,50	2,00	6,00	4,50	1,00
CD3 ⁺ CD25 ⁺ ,abs	Me	100,50	70,50*	40,00*	125,00	97,00	27,00*
	Q75	125,00	79,75	46,00	167,50	112,00	34,75
	Q25	79,00	43,25	26,00	91,50	86,50	22,25
CD4 ⁺ CD25 ⁺ brigh, %	Me	2,05	1,15*	0,70*	1,30	1,65	0,95*
	Q75	2,35	1,30	0,90	1,68	1,93	1,08
	Q25	1,60	1,00	0,30	0,90	1,45	0,75
CD4 ⁺ CD25 ⁺ brigh, abs	Me	38,00	20,00*	13,00*	24,00	30,00	17,50*
	Q75	41,00	23,75	15,00	30,25	31,75	20,25
	Q25	29,75	17,00	7,00	21,00	26,00	15,50
CD4 ⁺ CD45RA ⁺ , %	Me	23,00	23,50*	27,50	23,00	21,50	21,00
	Q75	29,00	30,00	31,00	27,00	26,00	25,00
	Q25	17,00	19,25	21,25	19,25	15,50	17,75
CD4 ⁺ CD45RA ⁺ , abs	Me	452,50	429,00	623,00	597,50	393,50	417,50
	Q75	534,75	577,75	722,50	771,00	478,75	495,75
	Q25	311,00	308,00	443,25	395,00	365,25	355,75
CD45RA ⁺ , %	Me	64,00	61,00	61,00	60,00	56,50*	58,50
	Q75	67,25	65,50	67,75	70,25	59,50	60,00
	Q25	62,25	58,00	57,75	55,00	50,50	55,50
CD45RA ⁺ ,abs	Me	1203,50	1070,50	1379,50	1558,00	1193,00	1155,50
	Q75	1426,25	1297,50	1550,50	2005,50	1239,75	1342,25
	Q25	971,75	908,00	1195,25	1098,00	933,25	967,25
CD4 ⁺ CD45RO ⁺ , %	Me	24,00	23,00	26,00	25,00	26,00	21,00
	Q75	27,00	24,75	26,00	26,00	28,75	26,00
	Q25	23,25	21,25	23,00	21,75	21,00	16,00
CD4 ⁺ CD45RO ⁺ ,	Me	410,0	421,00	514,00	490,50	419,50	394,50

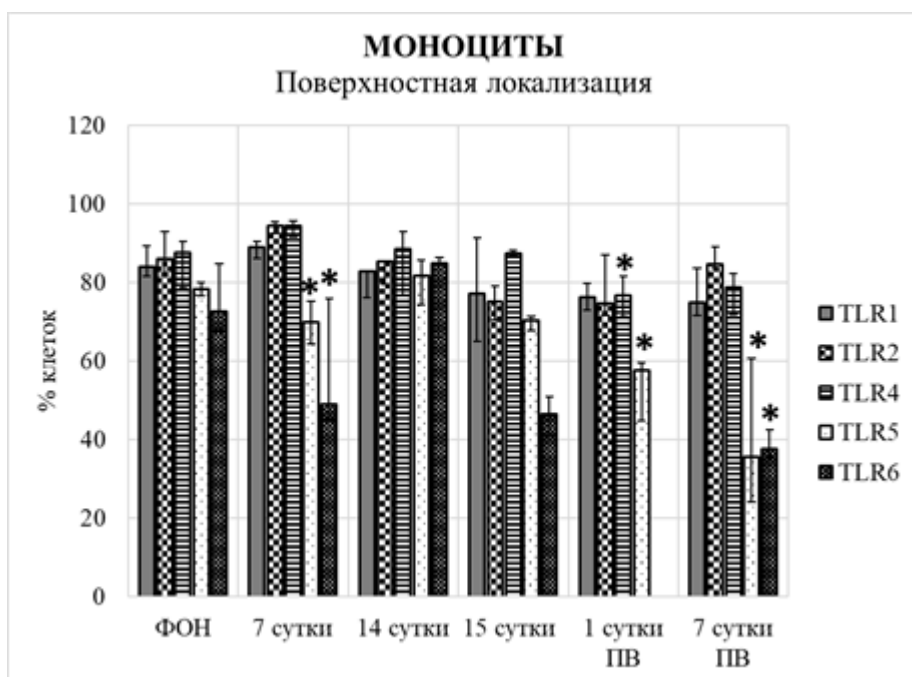
Показатель	Время обследования						
	ФОН		7 сутки	14 сутки	15 сутки (после депривации)	1 сутки ПВ	7 сутки ПВ
abs		0					
	Q75	502,7 5	453,00	529,00	663,50	494,25	472,25
	Q25	348,0 0	344,75	343,00	336,00	361,25	316,75
CD45RO ⁺ , %	Me	36,00	34,00	36,00	37,50	39,50	30,00
	Q75	39,50	36,50	36,00	41,25	45,50	37,00
	Q25	31,00	31,50	31,00	30,25	29,75	23,00
CD45RO ⁺ , abs	Me	606,0 0	607,50	712,00	738,50	636,00	565,00
	Q75	667,2 5	630,75	712,00	927,50	735,25	673,50
	Q25	511,7 5	532,50	541,00	557,00	544,25	456,50
% CD45RA в CD4	Me	45,50	45,65	49,35	43,80	42,55	39,25
	Q75	53,63	52,10	58,50	53,73	49,65	45,18
	Q25	37,30	38,98	41,73	38,63	32,38	35,28
% CD45RO в CD4	Me	51,50	47,35*	49,10	51,50	53,35	42,10
	Q75	61,70	55,15	52,00	56,73	58,05	49,75
	Q25	44,45	40,90	39,70	42,08	42,13	34,45
ИРИ2 CD45RA/CD45 RO	Me	1,78	1,74	1,83	1,63	1,43	3,29
	Q75	2,18	2,06	2,56	2,57	2,02	4,33
	Q25						
ИРИ 3 CD45RA ⁺ CD4 ⁺ / CD45RO ⁺ CD4 ⁺	Me	0,90	1,00*	1,14	0,86	0,81	1,69
	Q75	1,21	1,28	1,72	1,44	1,20	2,21
	Q25						
CD69 ⁺ , % среди CD3 ⁺ не/стимулир., цельная кровь	Me	0,78	0,67			0,64	
	Q75	0,92	0,71			0,81	
	Q25						
CD69 ⁺ , % среди CD3 ⁺ стимулир., цельная кровь		0,58	0,38			0,52	
	Me	63,36	46,60			57,79	
	Q75	71,15	63,98			65,46	
CD69 ⁺ , % среди CD4 ⁺ не/стимулир., цельная кровь	Q25						
		59,55	39,15			45,06	
	Me	0,74	0,52			0,49*	
CD69 ⁺ , % среди CD4 ⁺ стимулир., цельная кровь	Q75	0,85	0,62			0,62	
	Q25						
		0,61	0,25			0,36	
CD69 ⁺ , % среди CD4 ⁺ стимулир., цельная кровь	Me	52,39	46,47			48,69	
	Q75	68,64	57,28			61,48	
	Q25						
		44,02	35,49			40,96	

Показатель	Время обследования						
	ФОН		7 сутки	14 сутки	15 сутки (после депривации)	1 сутки ПВ	7 сутки ПВ
CD69 ⁺ , % среди CD19 ⁺ не/стимулир., цельная кровь	Me	5,31	2,67*			2,62*	
	Q75	6,66	3,70			3,56	
	Q25						
		4,31	1,47			2,31	
CD69 ⁺ , % среди CD19 ⁺ стимулир., цельная кровь	Me	58,01	61,07			61,10	
	Q75	60,27	64,73			63,27	
	Q25						
		56,29	54,29			57,10	
CD69 ⁺ , % среди CD3 ⁻ CD16/56 ⁺ , не/стимулир., цельная кровь	Me	3,05	3,77			5,21	
	Q75	3,91	6,04			5,79	
	Q25						
		2,51	3,05			4,19	
CD69 ⁺ , % среди CD3 ⁻ CD16/56 ⁺ , стимулир., цельная кровь	Me	74,19	69,75			69,66	
	Q75	81,71	88,13			92,22	
	Q25						
		57,74	62,05			57,30	

Изучение количественных характеристик таких субпопуляций Т-лимфоцитов как CD4⁺CD45RA⁺ (наивных Т клеток)- и CD4⁺CD45RO⁺-(клеток памяти) не выявило во все сроки обследования статистически значимых отличий от фонового уровня, при этом было отмечено достоверное снижение иммунорегуляторного индекса (CD45RA⁺CD4⁺/CD45RO⁺CD4⁺) на седьмые сутки исследования. Также было показано, что семнадцатисуточная изоляция не приводит к изменению активационного потенциала Т и В клеток, а также НК-лимфоцитов, проявляющегося в количественном изменении содержания лимфоцитов, экспрессирующих на своей поверхности ранний активационный маркер CD69. При этом наблюдается достоверное уменьшение относительного количества активированных лимфоцитов с фенотипом CD19⁺CD69⁺, CD4⁺CD69⁺ на первые сутки после окончания экспериментального воздействия (таблица 17).

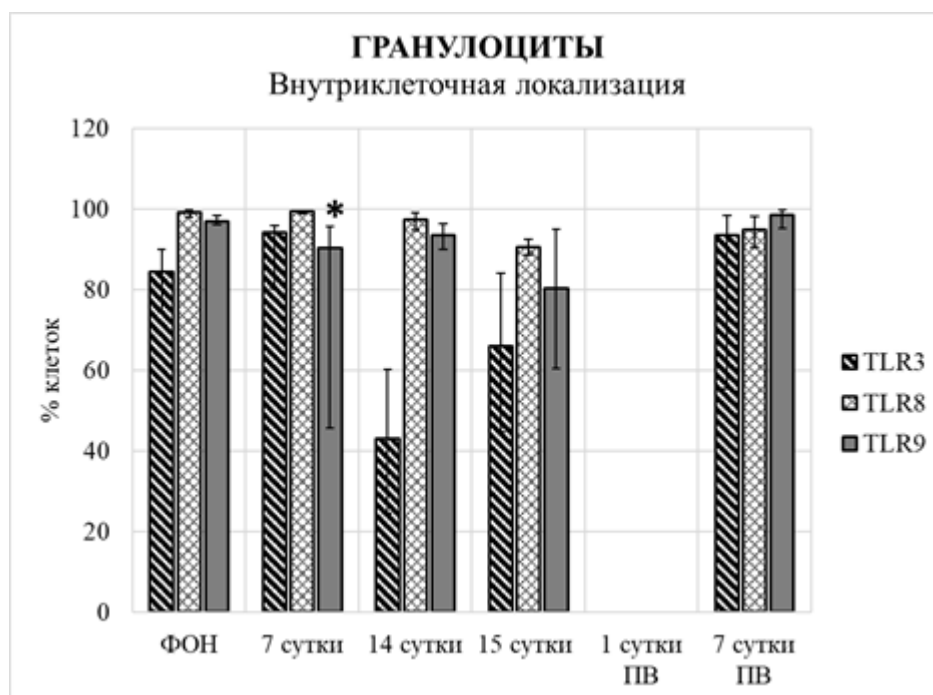


А

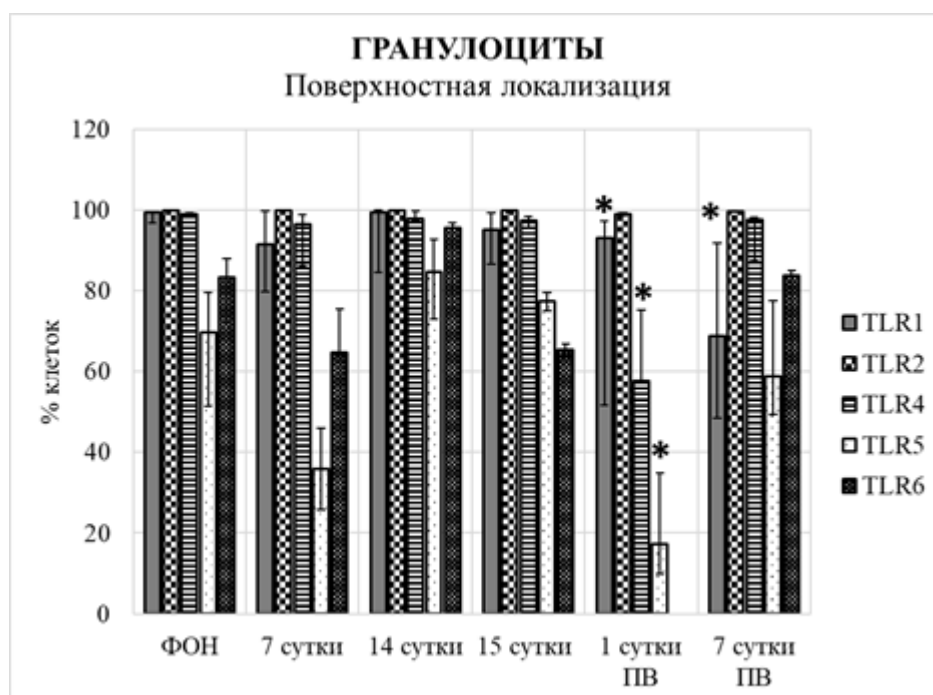


Б

Рисунок 17. Относительное содержание в периферической крови испытуемых-добровольцев моноцитов, экспрессирующих TLRs с внутриклеточной (А) и поверхностной (Б) локализацией во время семнадцатисуточной изоляции в гермообъекте с искусственной средой обитания.
*-достоверное различие с фоном ($p < 0,05$)



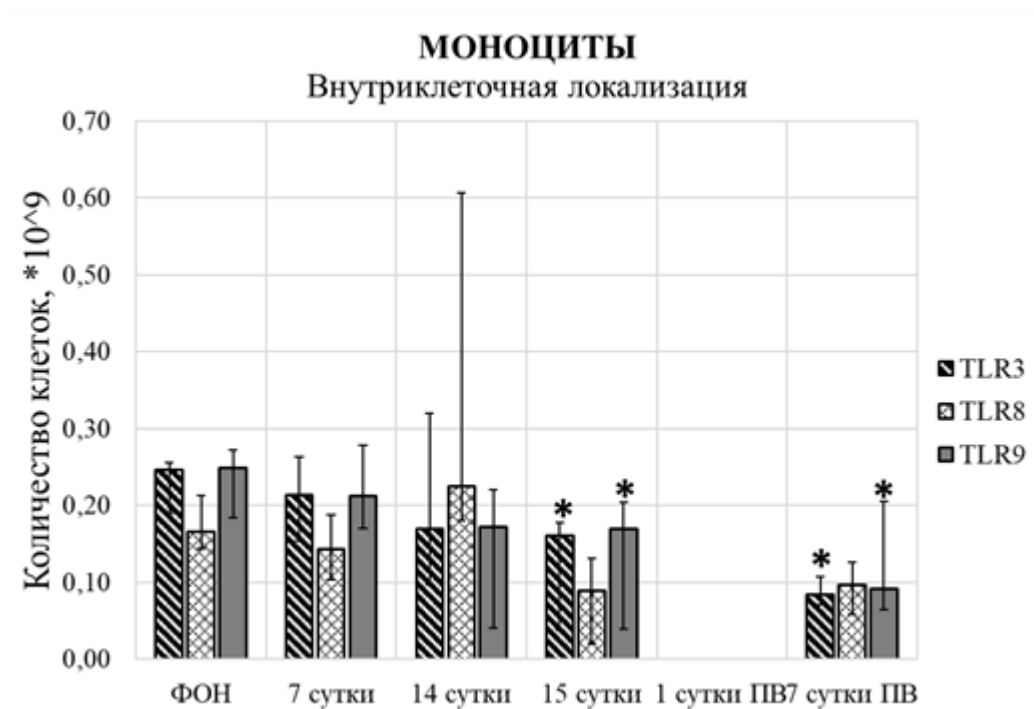
А



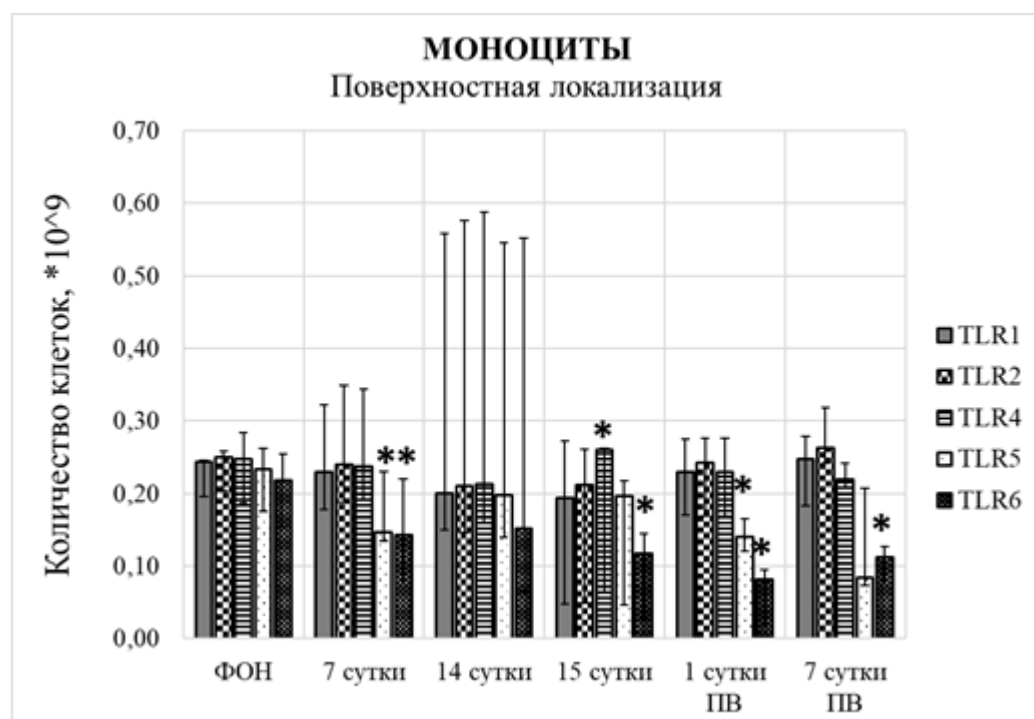
Б

Рисунок 18. Относительное содержание в периферической крови испытуемых-добровольцев гранулоцитов, экспрессирующих TLRs с внутриклеточной (А) и поверхностной (Б) локализацией во время семнадцатисуточной изоляции в гермообъекте с искусственной средой обитания.

*-достоверное различие с фоном ($p < 0,05$)



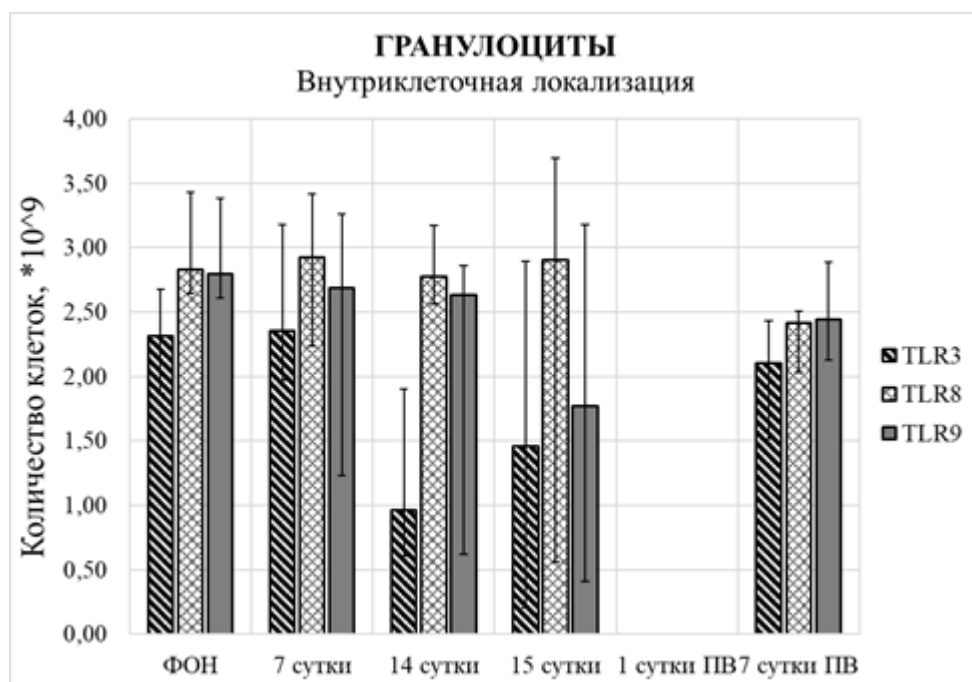
А



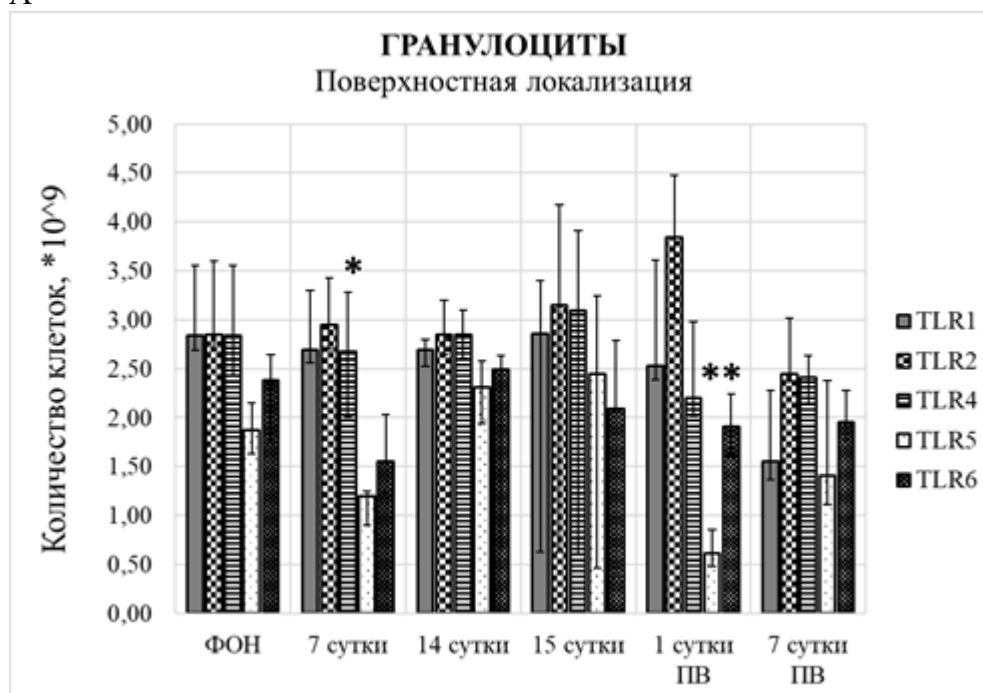
Б

Рисунок 19. Абсолютное содержание в периферической крови испытуемых-добровольцев моноцитов, экспрессирующих TLR с внутриклеточной (А) и поверхностной (Б) локализацией во время семнадцатисуточной изоляции в гермообъекте с искусственной средой обитания.

*-достоверное различие с фоном ($p < 0,05$)



А



Б

Рисунок 20. Абсолютное содержание в периферической крови испытуемых-добровольцев гранулоцитов, экспрессирующих TLR с внутриклеточной (А) и поверхностной (Б) локализацией во время семнадцатисуточной изоляции в гермообъекте с искусственной средой обитания

*-достоверное различие с фоном ($p < 0,05$)

В ходе проведённого эксперимента были проанализированы показатели, характеризующие состояние системы toll-подобных рецепторов моноцитов и гранулоцитов периферической крови по абсолютным и относительным значениям. Было показано, что на четырнадцатые сутки изоляции происходит достоверное увеличение процентного содержания

TLR8⁺ моноцитов, а на 7 сутки восстановительного периода достоверно снижается по относительным значениям содержание моноцитов с фенотипом TLR8⁺ и TLR9⁺. Абсолютное содержание TLR3⁺ и TLR9⁺ CD14⁺ клеток имело статистически достоверные различия с фоном на пятнадцатые сутки эксперимента, когда происходило их значимое снижение. Также их количество было достоверно снижено на седьмые сутки после завершения эксперимента (рисунок 17).

Говоря о моноцитах, экспрессирующих TLR с поверхностной локализацией (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6) можно заметить, что на седьмые сутки моделируемой миссии происходит достоверное снижение по относительным величинам содержания CD14⁺TLR5⁺ и CD14⁺TLR6⁺ клеток, на первые сутки восстановительного периода-снижение CD14⁺TLR4⁺ и CD14⁺TLR5⁺, а на седьмые сутки- CD14⁺TLR5⁺ CD14⁺TLR6⁺ клеток (рисунок 19).

Иная динамика содержания клеток, экспрессирующих TLRs с внутриклеточной и поверхностной локализацией характерна для гранулоцитов. Было показано значимое снижение количества моноцитов с фенотипом TLR9⁺ на седьмые сутки экспериментального воздействия. Количество гранулоцитов, экспрессирующих TLRs с поверхностной локализацией достоверно снижалось на первые сутки после выхода из изоляции для TLR1⁺, TLR4⁺ и TLR6⁺ - клеток. Относительное количество гранулоцитов с фенотипом TLR1⁺ было достоверно снижено и на седьмые сутки периода восстановления (рисунок 20).

Статистически достоверного изменения количества гранулоцитов, экспрессирующих TLRs с внутриклеточной организацией по абсолютным значениям показано не было (рисунок 20). При этом содержание в периферической крови гранулоцитов с фенотипом TLR4⁺ значимо уменьшалось на седьмые сутки изоляции, а число TLR5⁺ и TLR6⁺ клеток снижалось на первые сутки после завершения изоляционного воздействия (рисунок 20).

Обсуждение результатов

В проведённом эксперименте происходило комплексное рассмотрение клеточных показателей системы иммунитета человека при действии изоляционных факторов, моделируемых в семнадцатисуточном пребывании в гермообъекте с искусственной средой обитания. Помимо перечисленных ранее традиционных факторов, ассоциированных с изоляцией, в данном эксперименте была проведена депривация сна с четырнадцатых на пятнадцатые сутки эксперимента.

Анализируя результаты эксперимента, можно отметить, что наибольшее количество статистически достоверных различий наблюдается в системах цитотоксичности и естественной резистентности. Количество значимых изменений в показателях адаптивного иммунитета в ходе изоляции и проведённой депривации было незначительно.

Выявленные в настоящем исследовании изменения в системе TLR - снижение в периферической крови испытуемых-добровольцев моноцитов и гранулоцитов, экспрессирующих TLRs как с поверхностной, так и внутриклеточной локализацией, свидетельствуют, что кратковременная изоляция, в целом, приводит к снижению абсолютного и относительного содержания этих клеток. Депривация сна в раннем периоде адаптации к условиям моделируемой космической миссии независимо от гендерной принадлежности приводит к негативным сдвигам в системе внутриклеточных TLRs моноцитов периферической крови. Поскольку TLRs играют ключевую роль в ранней защите организма от патогенов и изменённых антигенных структур, обеспечивая быстрое опознавание «чужого» и сигнализацию о появлении в организме чужеродной антигенной структуры, представляющей опасность для данного организма (Lendeckel U et al 2022), следует рассматривать выявленные изменения, как фактор риска развития инфекционно-воспалительных заболеваний, в частности, заболеваний, обусловленных нормальной микрофлорой организма, не вызывающей в обычных условиях патологических реакций со стороны организма хозяина (Zou Y et al 2022) или даже онкологических процессов (Duan T et al 2022).

На пути чужеродного агента инфекционной и/или неинфекционной природы встает и мощный эшелон иммунитета - система естественной цитотоксичности. Клеточными факторами этой системы являются лимфоциты-естественные киллеры, играющие важнейшую роль в обеспечении естественной резистентности организма к различным возбудителям инфекций – бактериальных (грамположительных, грамотрицательных, внутриклеточных) и протозойных (Gardiner CM 2019), а также в противовирусном и в противоопухолевом иммунитете (Yawata N et al 2022). Проведенные исследования показали, что изоляционное воздействие, а также депривация сна во время пребывания испытуемых-добровольцев в гермообъекте привели к снижению как общего количества, так и относительного содержания ЕК-лимфоцитов.

Аналогичная ситуация наблюдалась с НКТ-клетками, играющими важную роль в регуляторной функции, а также противоопухолевом иммунитете (Ihara F et al 2019). В ходе эксперимента было показано, что на седьмые сутки изоляции, а также после депривации сна наблюдается снижение процентного и абсолютного количества НКТ-лимфоцитов. Интересно, что на четырнадцатые сутки изоляции их количество сравнивается с фоновыми значениями, а сразу после завершения депривации резко снижается. Такая динамика сохраняется на первые и седьмые сутки после выхода из гермообъекта. Столь драматическое падение количества НКТ-клеток может привести к серьёзной дисфункции всей иммунной системы и развитию аутоиммунных и онкологических заболеваний (Torina A et al 2018).

Адаптивный иммунитет является второй специфической линией иммунной защиты организма. По сравнению с врождённым иммунитетом, являющимся по своей природе неспецифическим, преимуществами приобретённого иммунитета являются высокая специфичность и способность формировать иммунологическую память. Специфичность адаптивного иммунитета проявляется в более высокой аффинности и авидности, и как результат, он обладает большей эффективностью вследствие лучшего соответствия конкретному антигену, а также длительный, а порой и пожизненный, эффект быстрого вторичного иммунного ответа, связанного с формированием клеток памяти и поддержанием защитного титра специфических антител в сыворотке крови и других биологических жидкостях организма (Pierce S et al 2020, Cronkite DA et al 2018).

В ходе проведённого эксперимента анализ количественных характеристик клеточных факторов адаптивного иммунитета испытуемых-добровольцев выявил статистически достоверные изменения содержания Т- и В-лимфоцитов периферической крови, проявляемые преимущественно в увеличении числа этих клеток. Примечательно, что в отличие от системы естественной цитотоксичности и toll-подобных рецепторов, в проведённом эксперименте прослеживается выраженная тенденция к увеличению содержания клеточных факторов адаптивного иммунитета. Это может быть связано с процессами компенсации дисфункции врождённого иммунитета. Кроме того, учитывая тот факт, что врождённый иммунитет, в частности система TLR, играет одну из ведущих ролей в формировании адаптивного иммунитета (Netea MG et al 2019), можно предположить, что выявленные нарушения в системе TLR не только могут приводить к нарушению распознавания инфекционных агентов с последующей их элиминацией, но и вызывать дисфункцию формирования адаптивного иммунного ответа.

Стоит отметить, что, как и в предыдущих экспериментах, в семнадцатисуточной изоляции прослеживается индивидуальная вариабельность результатов (таблица 18).

Таблица 18. Индивидуальные показатели иммунной системы испытуемых-добровольцев во время семнадцатисуточной изоляции в гермооъекте с искусственной средой обитания.

№ испыта теля	Показатель	Время обследования					
		ФОН	7 сутки	14 сутки	15 сутки (после депривации)	1 сутки ПВ	7 сутки ПВ
4	CD3 ⁺ CD8 ⁺ ,abs	692,00	749,00	1045,00	1104,00	843,00	935,00
7	CD3 ⁺ CD8 ⁺ ,abs	363,00	356,00	330,00	354,00	290,00	415,00

8	CD3 ⁺ CD8 ⁺ , abs	642,00	601,00	757,00	908,00	483,00	684,00
4	CD19 ⁺ , abs	96,00	91,00	194,00	135,00	105,00	174,00
7	CD19 ⁺ , abs	166,00	140,00	145,00	163,00	126,00	154,00
8	CD19 ⁺ , abs	235,00	220,00	267,00	439,00	439,00	365,00
4	CD3 ⁺ CD4 ⁺ abs	827,00	803,00	1045,00	1212,00	780,00	935,00
7	CD3 ⁺ CD4 ⁺ , abs	514,00	574,00	554,00	572,00	504,00	569,00
8	CD3 ⁺ CD4 ⁺ ,abs	1091,00	1063,00	1180,00	1551,00	1024,00	1208,00
4	CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺ ,abs	134,00	73,00	122,00	162,00	105,00	152,00
7	CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺ ,abs	318,00	341,00	185,00	163,00	164,00	200,00
8	CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺ ,abs	214,00	140,00	111,00	147,00	58,00	160,00
4	TLR4 ⁺ mon, abs	75,70	44,90	73,60	87,40	69,90	82,30
7	TLR4 ⁺ mon, abs	96,50	94,10	97,90	87,30	95,30	82,10
8	TLR4 ⁺ mon, abs	90,90	90,80	92,90	90,50	82,80	82,50
4	TLR6 ⁺ mon, abs	131,60	90,20	131,80	105,60	нет	106,50
7	TLR6 ⁺ mon, abs	218,10	196,00	172,60	149,10	162,00	72,80
8	TLR6 ⁺ mon, abs	469,00	315,60	760,80	216,80	96,00	200,40
7	CD14 ⁺ abs	188,00	210,00	190,00	310,00	315,00	308,00
8	CD14 ⁺ abs	322,00	407,00	216,00	331,00	320,00	224,00
9	CD14 ⁺ abs	505,00	412,00	826,00	435,00	311,00	412,00

Проведенные в рамках международного эксперимента "SIRIUS-17" исследования влияния депривации сна и повышенной психоэмоциональной нагрузки на состояние врождённого и адаптивного звена иммунной системы человека в условиях семнадцатисуточной изоляции в гермообъекте дали возможность установить, что процесс ранней адаптации системы иммунитета к комплексу моделируемых в этом исследовании факторов кратковременного космического полета реализуется через изменения системы Toll-like рецепторов врожденного иммунитета и естественной цитотоксичности. Как и в предыдущем исследовании, иммунная система одного и того же испытуемого в разные моменты времени по-разному отвечала на оказываемое воздействие. Кроме того, как видно из рисунков 12-15, даже внутри одного семейства рецепторов, в одни и те же сутки изоляции может наблюдаться разная динамика.

3.3.1.3. Эксперимент с 14-суточной изоляцией в гермообъекте (проект "ЭСКИЗ")

Эксперимент с 14-суточной изоляцией в гермообъекте был проведён с целью уточнения реакции системы иммунитета на ранний период адаптации к условиям изоляции в гермообъекте. В ходе эксперимента проводилась комплексная оценка состояния адаптивного и врождённого компонентов иммунной системы человека.

Проведённые экспериментальные исследования показали, что 14-суточная изоляция в гермообъекте с искусственной средой обитания оказывает существенное влияние на клеточный

и гуморальный компоненты иммунной системы организма человека. В периферической крови оценивалось абсолютное (общее) и относительное (процентное) содержание клеток, а также экспрессия заданных маркёров.

Анализ содержания моноцитов периферической крови выявил значимое повышение абсолютного и относительного содержания CD14⁺-клеток на 3, 7 и 14 сутки изоляции с сохранением повышенных значений по сравнению с фоновыми данными за 7 суток до начала экспериментального воздействия (таблица 22), при этом, число моноцитов, экспрессирующих TLR1, имело разнонаправленную динамику на протяжении всего эксперимента как по абсолютным, так и по относительным значениям.

Изменение экспрессии TLR1 также имело волнообразный характер. Относительное содержание TLR2⁺ моноцитов достоверно не изменялось, однако экспрессия TLR2 значимо повышалась на 3 сутки миссии по сравнению с первым и вторым фоном.

Абсолютное содержание TLR2⁺ по сравнению с 1-м и 2-м фоном достоверно повышалось, начиная с 3-х суток проекта.

Значимого изменения экспрессии TLR4⁺ моноцитами периферической крови отмечено не было, однако на 3-и 7-е и 14 сутки происходило их увеличение по абсолютным значениям, причём на 3-и сутки различие было достоверным и по сравнению со 2 фоном, а по относительным - значимо повышалось уже ко второму фону с сохранением динамики на 3-и сутки исследования.

Процентное содержание CD14⁺ TLR6⁺ - клеток достоверно увеличивалось на 3-и сутки по сравнению с двумя фонами, а абсолютное - повышалось на 7 и 14 сутки относительно обоих фонов.

Содержание моноцитов, экспрессирующих TLRs с внутриклеточной локализацией также менялось на протяжении миссии (таблица 22). Было показано, что количество TLR3⁺ моноцитов достоверно не меняется на протяжении всего периода изоляции, в то время как изменение экспрессии TLR3 носило достоверный скачкообразный характер. Изменение содержания относительного количества TLR8⁺ моноцитов имело выраженную тенденцию к снижению, за исключением 14 суток эксперимента и периода завершения воздействия, когда было отмечено достоверное повышение их содержания по сравнению с первым и вторым фоном. Такая же динамика характерна и для их абсолютных значений. Уровень экспрессии TLR8⁺ достоверно снижался и повышался на протяжении исследования. Для TLR9⁺ моноцитов было характерно достоверное повышение экспрессии TLR9 на 14 сутки экспериментального воздействия с сохранением повышенных значений и через 7 суток после окончания эксперимента. Точно также менялось абсолютное и относительное содержание TLR9⁺

моноцитов в периферической крови по сравнению с первыми и вторыми фоновыми исследованиями. Ввиду биотических ограничений по объемам взятия крови, количество взятого биоматериала не позволило выделить в достаточном объеме клетки для оценки цитокин-продуцирующей способности моноцитов за двое суток до начала эксперимента и на третьи сутки миссии.

Стимулирование клеточной культуры моноцитов соответствующими лигандами TLR приводило к изменению экспрессии TLRs с поверхностной и внутриклеточной локализацией. Сначала оценивали достоверность по сравнению с контрольными значениями, на втором этапе сравнивали с фоновыми значениями. Достоверными считались только те данные, которые отличались и от контрольных, и от фоновых. Такой же подход был применён и к индуцированному синтезу цитокинов.

В результате проведенного эксперимента показано, что процентное содержание моноцитов, экспрессирующих на своей поверхности TLR1 значительно возрастает к 7 суткам после завершения миссии, а содержание TLR2 и TLR6,- наоборот, снижается. Уровень экспрессии TLR2 значительно снижается на 7 сутки после завершения миссии по сравнению с первым фоном. Экспрессия TLR4 достоверно повышается к 14 суткам проведения эксперимента, Изменения экспрессии TLRs с внутриклеточной локализацией были показаны только для TLR8 на 7 сутки после завершения воздействия. Изменений экспрессии других TLRs в ходе исследования отмечено не было (таблица 23).

В результате изучения экспрессии генов было показано следующее. Достоверные отличия экспрессии относительно 7-х суток до начала эксперимента были получены для следующих транскриптов: TLR2, TICAM2, IL6, IL1B, IL8, CSF2, LTA, HSPD1. Уровень экспрессии гена TLR2 увеличивался в 5 раз на 7-е сутки после воздействия. Через семь дней после окончания эксперимента экспрессия возвращалась к фоновому значению. Интересно отметить возрастание показателя экспрессии гена ключевого участника MyD88-независимого сигнального пути TLR-рецепторов - TICAM2 - к концу эксперимента (повышение практически в два раза на 14-е сутки) и особенно на 7-е сутки после окончания воздействия (в 19,7 раз). Через неделю после моделирования лунной миссии также наблюдалось повышение экспрессии гена HSPD1 (в 4 раза). При изучении группы генов, кодирующих интерлейкины, было отмечено достоверное снижение генов IL6 и IL1B на протяжении всего воздействия с особенно низкими значениями на 7-е сутки после окончания эксперимента (в 200 и 166 раз, соответственно). Разнонаправленно изменялась экспрессия гена IL8: повышалась в начале эксперимента и опускалась ниже фоновых показателей в 25 раз в дальнейшем. Подобные скачки экспрессии в обоих направлениях наблюдались и для других транскриптов. Зарегистрированный уровень

экспрессии гена FOS носил обратный уровень характер: снижение вначале воздействия и повышение к концу и после эксперимента. Ген интерферона 1 аналогично экспрессировался ниже референса на 7-е сутки пребывания в условиях модели, но к концу недели после эксперимента показатели практически достигли фоновых значений. Нестабильность уровня экспрессии можно было наблюдать и при изучении гена CSF2. Уровень его экспрессии сначала снижался через неделю после начала эксперимента, после чего на вторую неделю фиксировалось превышение фоновой экспрессии вдвое. Однако после окончания эксперимента фиксируется снижение экспрессии этого транскрипта в 16 раз. Среди достоверных изменений в экспрессии исследуемых генов необходимо отметить также данные по гену LTA. Снижение экспрессии в 50 раз вначале экспериментального воздействия (7-е сутки) сменялось дальнейшим повышением данного показателя в 20 раз, которое сохранялось и после окончания изоляции. Изменения в экспрессии остальных исследуемых генов не имели достаточного уровня *p*, чтобы считаться достоверными. Экспрессия генов по сравнению со вторым фоном, взятым за 3 суток до начала эксперимента, достоверно не изменялась (Рисунок 21 А, В).

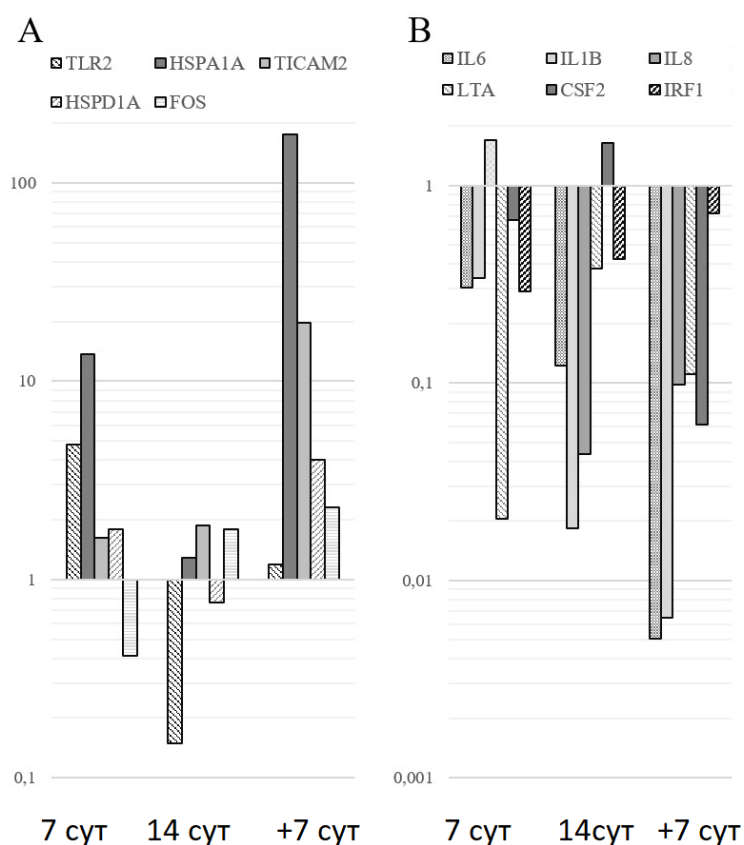


Рисунок 21. Изменение экспрессии генов проводящих путей TLRs в 14-суточной изоляции.

Концентрация цитокинов в сыворотке крови достоверно менялась для IL-1 β , IL-8, TNF α , IFN γ , MCP1 (рисунок 22). Для IL-1 β было отмечено значимое снижение концентрации на 7 сутки

экспериментального воздействия по сравнению со вторым фоном, для IL-8 разница была показана между первым и вторым фоном, а также на 14 сутки по сравнению с данными, полученными за 7 суток до начала миссии. Концентрация TNF α значительно повышалась между двумя фонами, а также достоверно снижалась на 7 сутки после завершения эксперимента по сравнению со вторым фоном. Содержание IFN γ достоверно повышалось ко второму фону, плавно снижаясь к 7 суткам после выхода из гермообъекта. На 7 сутки разница была достоверной по сравнению с 3-ми сутками до начала эксперимента. Концентрация MCP1 значительно повышалась ко второму фону экспериментального воздействия с постепенным снижением на протяжении миссии (рисунок 22).

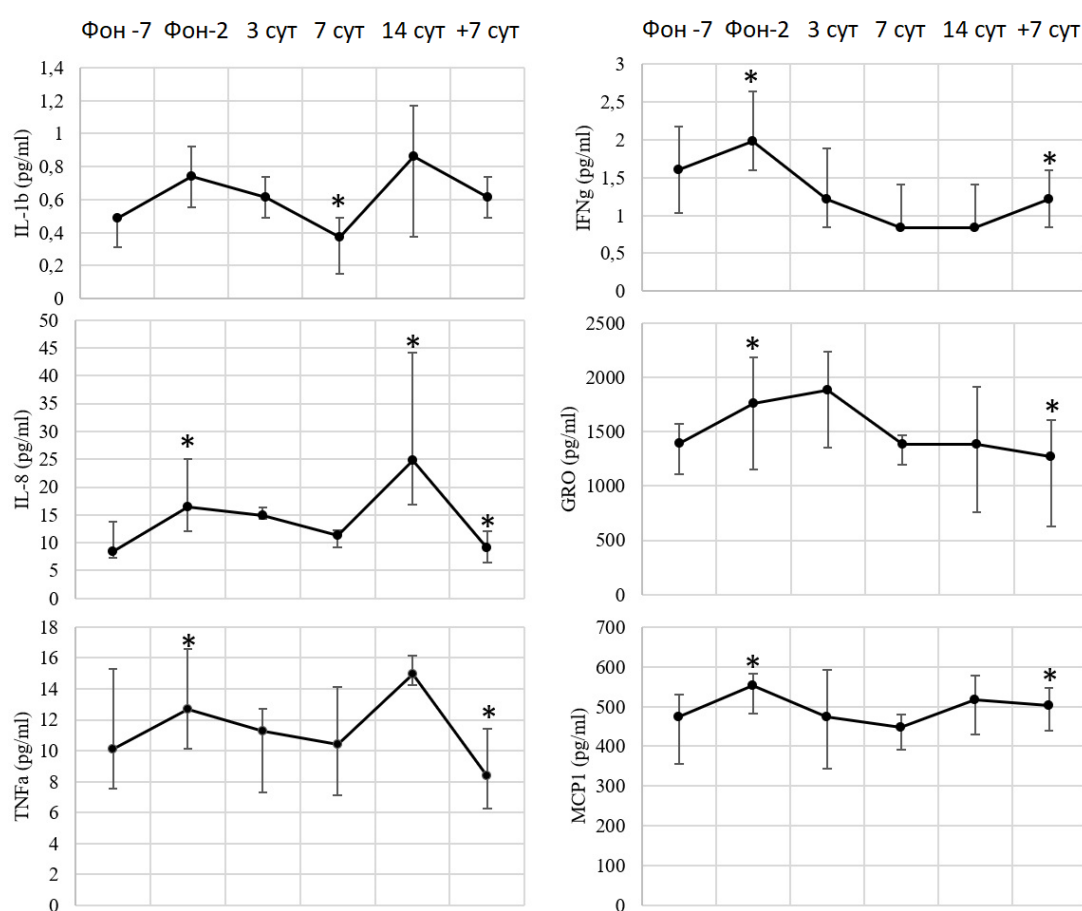


Рисунок 22. Концентрация цитокинов в сыворотке крови у 6 участников 14-суточного изоляционного эксперимента.

В ходе проведённого эксперимента базальная и индуцированная соответствующими лигандами TLR продукция цитокинов моноцитами периферической крови также претерпевала определённые изменения (таблица 21). Рассмотрим сначала спонтанный синтез цитокинов моноцитами периферической крови. В ходе эксперимента было показано, что уровень GM-CSF достоверно повышался на 7 сутки экспериментального воздействия по сравнению с 1-м

фоновым значением. Уровень IL-1b значительно снижался к 3-м суткам, достигая минимальных значений к 14 суткам изоляции. IL-6 достоверно снижался к 14 суткам экспериментального воздействия, а IL-8 резко повышался на 7 сутки миссии. TNFα достоверно снижался на 14 сутки экспериментального воздействия. Все указанные выше изменения были достоверны при сравнении экспериментального воздействия с первыми фоновыми значениями.

Говоря об индуцированном синтезе цитокинов, следует отметить общую тенденцию к увеличению синтеза всех изученных цитокинов на протяжении экспериментального воздействия с достоверным различием по сравнению с фоновыми значениями.

Концентрация адреналина была значительно повышена на 7 сутки миссии, а кортизола наоборот, понижена. Достоверных изменений содержания норадреналина в течение эксперимента показано не было, однако его концентрация значительно снижалась на 7 сутки после завершения миссии (рисунок 23).

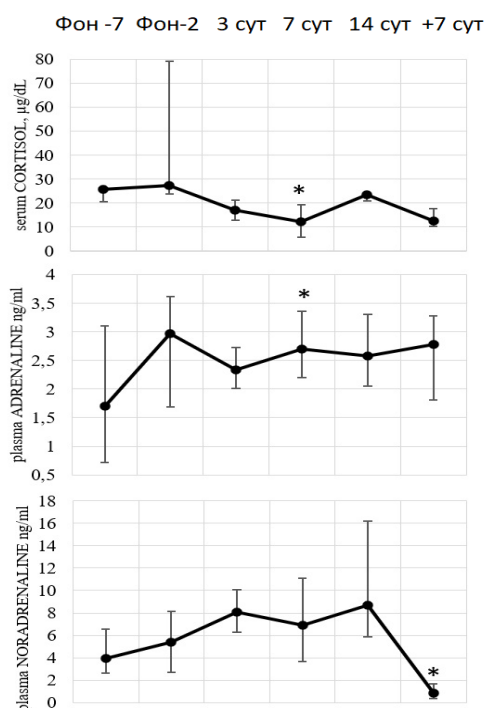


Рисунок 23. Уровень стресс-гормонов в сыворотке крови испытуемых-добровольцев, участников эксперимента с 14-суточной изоляцией в гермообъекте.

В данном эксперименте был проведён также анализ адаптивного иммунитета. Было показано, что на 14 сутки пребывания в гермообъекте и на 7-е сутки после выхода из него происходит увеличение относительного содержания Т-лимфоцитов ($CD3^+$ -клеток) в периферической крови. На 14-е сутки пребывания в гермообъекте также было обнаружено увеличение абсолютного содержания $CD3^+$ -лимфоцитов с фенотипом $CD8^+$ и $CD4^+CD25$.

Относительное и абсолютное содержание В-лимфоцитов в периферической крови (CD19⁺) не изменялось (таблица 18).

Таблица 19. Лимфоцитарный профиль периферической крови у испытуемых-добровольцев, участников проекта с 14-суточной изоляцией в замкнутом гермообъекте с искусственной средой обитания (Ме; q25-q75) (n=6)

Показатели		Сутки пребывания в гермообъекте		
		-7-е	14-е	+7-е
CD19 ⁺ -лимфоциты,	отн., %	12,7; 9,6-13,6	12,5; 9,8-14,3	11,4; 10,3-12,4
	абс., x10 ⁹ /л	0,167; 0,146-0,237	0,254; 0,193-0,284	0,175; 0,142-0,222
CD3 ⁺ -лимфоциты,	отн., %	70,1; 69,1-72,8	74,8*; 72,8-75,3	74,5*; 69,4-77,7
	абс., x10 ⁹ /л	1,228; 0,998-1,296	1,475*; 1,442-1,668	1,247; 1,087-1,444
CD3 ⁺ CD4 ⁺ -лимфоциты,	отн., %	46,7; 44,4-47,6	44,6; 40,5-51,2	48,9; 46,3-49,1
	абс., x10 ⁹ /л	0,700; 0,646-0,859	1,017; 0,925-1,042	0,768; 0,725-0,867
CD3 ⁺ CD8 ⁺ -лимфоциты,	отн., %	24,6; 23,3-29,1	23,6; 21,9-33,5	24,0; 23,3-27,7
	абс., x10 ⁹ /л	0,405; 0,328-0,482	0,510*; 0,422-0,756	0,388; 0,366-0,617
CD4 ⁺ CD25 ⁺ -лимфоциты,	отн., %	6,8; 5,9-7,2	11,4; 8,8-15,9	9,4; 6,9-12,2
	абс., x10 ⁹ /л	0,102; 0,092-0,137	0,217*; 0,157-0,318	0,203; 0,124-0,218
CD8 ⁺ CD25 ⁺ -лимфоциты,	отн., %	0,4; 0,3-1,0	0,8; 0,6-1,0	0,5; 0,3-0,5
	абс., x10 ⁹ /л	0,007; 0,006-0,013	0,014; 0,010-0,021	0,007; 0,007-0,009

*Достоверное различие с исходным уровнем (p<0,05).

Был проведен анализ экспрессии маркеров CD4, CD25, CD127, FOXP3 на поверхности регуляторных Т-лимфоцитов (Treg) в 48-часовых нестимулированных культурах, полученных из периферической крови испытуемых-добровольцев на разных сроках эксперимента. На 14 сутки пребывания в гермообъекте, а также на 7 сутки после выхода из него было показано снижение количества Treg-лимфоцитов с фенотипами CD25⁺FOXP3⁺ и CD25⁺FOXP3⁺CD127⁻ в субпопуляции CD4⁺ лимфоцитов (таблица 19). Экспрессия транскрипционного фактора FOXP3 необходима для поддержания пула Treg-лимфоцитов на периферии, она важна для реализации их супрессорной функции. Было обнаружено снижение содержания лимфоцитов с фенотипом CD25-FOXP3⁺ в субпопуляции CD4⁺-лимфоцитов на 7 сутки после выхода из гермообъекта. Кроме того, на 7 сутки после выхода из гермообъекта было показано снижение экспрессии FOXP3 в CD4⁺-лимфоцитах.

Таблица 20. Содержание CD4⁺ Т-клеток с Treg-ассоциированными фенотипами в 48-часовых нестимулированных культурах лимфоцитов испыателей-добровольцев, участников проекта с 14-суточной изоляцией в замкнутом гермообъекте с искусственной средой обитания (Ме; q25-q75) (n=6)

CD4 ⁺ Т-клетки#	Сутки пребывания в гермообъекте		
	-7-е	14-е	+7-е
CD25 ⁺	8,3; 5,6-10,1	2,7*; 2,0-3,4	1,8*; 1,7-2,3
CD25 ⁺ FOXP3 ⁺	6,6; 4,5-7,7	1,6*; 1,3-1,9	1,0*; 0,9-1,0
CD25 ⁺ FOXP3 ⁺ CD127 ⁻	3,0; 2,6-3,4	1,0*; 0,9-1,3	0,6*; 0,5-0,7
CD25 ⁻ FOXP3 ⁺	74,2; 71,4-77,9	71,2; 55,7-77,6	51,5*; 41,1-55,3
FOXP3 ⁺	81,8; 75,9-85,4	72,5; 57,5-79,3	53,2*; 42,2-56,6

*Достоверное различие с исходным уровнем (p<0,05).

Представлены значения относительного числа лимфоцитов после гейтирования по CD4

На 14 сутки изоляции способность лимфоцитов секретировать цитокины в отсутствии антигенной стимуляции существенно не отличалась от фоновых значений (таблица 20). При этом, хотелось бы отметить тенденцию ($0,05 \leq p \leq 0,1$) к снижению базальной продукции IFN γ , IL-10, IL-12P40, IL-9, IL-12P70, IL-5, IL-13, IL-6, IL-8, IL-1 β , TNF α , TNF β , MIP-1 α , IP-10, MCP-1, MIP-1 β . На 7 сутки после выхода из гермообъекта было обнаружено увеличение продукции TNF β , IL-5, IL-13, IL-1 β , IL-12P40, IL-12P70, IL-17A в культуре нестимулированных лимфоцитов.

Таблица 21 Базальная продукция лимфоцитами периферической крови испыателей-добровольцев, участников проекта с 14-суточной изоляцией в замкнутом гермообъекте с искусственной средой обитания, цитокинов в 48-часовых клеточных культурах (Ме; q25-q75) (n=6)

Содержание цитокина, (пг/мл)	Сутки пребывания в гермообъекте		
	-7-е	14-е	+7-е
IFN γ	1,7; 0,7-2,1	0,6; 0,1-3,2	4,3; 2,1-4,9
TNF α	74,9; 41,4-252,1	21,9*; 16,7-30,2	21,0; 12,5-161,1
TNF β	2,2; 0,6-2,6	1,9; 0,5-2,2	4,9*; 3,6-5,4
IL-5	0,56; 0,51-0,62	0,45; 0,41-0,60	0,89*; 0,75-0,93
IL-13	1,35; 0,29-1,82	0,10; 0,10-3,36	5,60*; 3,22-6,98
IL-10	3,44; 2,44-5,04	2,65; 2,57-3,50	4,20; 2,96-38,99
IL-6	6,27; 5,29-10,37	7,13; 5,93-8,03	29,91; 9,07-437,89
IL-8	166,7; 110,4-211,0	201,3; 145,8-266,2	619,1; 119,0-9133,1
IL-1 α	3,68; 2,52-3,68	2,90; 2,32-4,69	6,11; 4,68-8,44
IL-1 β	1,08; 0,90-1,27	1,27; 1,16-1,77	6,81*; 2,49-37,05
IL-12P40	6,17; 4,63-7,81	3,21; 2,45-4,05	11,71*; 7,49-16,16

Содержание цитокина, (пг/мл)	Сутки пребывания в гермообъекте		
	-7-е	14-е	+7-е
IL-12P70	1,15; 0,38-1,15	0,39; 0,07-1,03	2,79*; 1,86-3,36
IL-9	1,17; 1,03-1,31	1,17; 1,17-1,73	1,91; 1,31-2,51
IL-17A	1,71; 1,39-1,71	0,85; 0,68-1,17	3,24*; 2,20-3,79
MIP-1 α	16,9; 12,3-26,9	19,8; 14,1-32,1	30,0; 12,5-2486,2
IP-10	14,7; 11,0-17,0	11,9; 9,5-22,8	24,6; 13,2-36,2
MCP-1	4,0; 3,2-4,7	3,5; 2,5-6,5	81,7; 4,0-1552,3
MIP-1 β	105,5; 73,3-167,0	90,3; 88,7-93,6	173,5; 96,7-1528,2

*Достоверное различие с фоновыми значениями ($p < 0,05$).

Обсуждение результатов

В проведённом нами эксперименте был изучен ранний период адаптации некоторых компонентов системы врождённого иммунитета к условиям изоляции в гермообъекте с искусственной средой обитания. В ходе исследования была выявлена гетерогенная реакция со стороны изученных TLRs на условия краткосрочной изоляции в гермообъекте, проявляемая в различной динамике содержания абсолютного и относительного содержания TLR⁺ моноцитов, а также экспрессии ими поверхностных и внутриклеточных молекул TLRs. Это наблюдение справедливо как для моноцитов, выделенных из периферической крови, так и для моноцитов, стимулированных соответствующими лигандами. К сожалению, на данном этапе не представляется возможным дать ответ на вопрос, с чем связаны данные изменения, вероятно, рассматривая данный процесс в рамках волновой модели можно сделать вывод о том, что имел место какой-то процесс, связанный с экзогенной или эндогенной стимуляцией заданных рецепторов. В контексте проведённого исследования важно отметить, что экспрессия генов TLR не совпадала с экспрессией молекул TLR, при этом динамика спонтанного синтеза цитокинов (IL-8, IL-1b) и экспрессия их генов совпадала в точках совпадения достоверно меняющихся значений. Биосинтез белка-многоступенчатый процесс, включающий в себя процессы транскрипции, трансляции и посттрансляционных модификаций белковых цепей (Vabulas RM 2007). Как показало исследование (Schwanhäusser B. et al 2011), только примерно в 40% случаев уровень мРНК определяет вариабельность уровней белка. Тем не менее, изучение экспрессии генов, как одного из фундаментальных процессов функционирования живой клетки, важно с точки зрения выявления ранних реакций иммунной системы организма на изменяющиеся условия среды обитания.

Динамика концентрации цитокинов в сыворотке крови не совпадала с таковой в клеточных культурах, что может быть связано с продукцией цитокинов другими иммунокомпетентными

клетками или не иммунными органами и тканями, например, мышечными или эндотелиальными клетками (Kofler S et al 2005, Hoffmann C et al 2017).

Интересно, что изменения по сравнению с первым фоном для некоторых показателей, характеризующих состояние врождённого иммунитета, таких как содержание моноцитов с фенотипом TLR2⁺, TLR3⁺, TLR6⁺, TLR8⁺ возникают уже за двое суток до начала эксперимента, что может говорить о вовлечении психогенного компонента в выявляемые изменения, реализованного через гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковую ось. Для косвенного подтверждения этой гипотезы был проведён анализ концентрации кортизола, адреналина и норадреналина, являющимися маркерами стресса. В результате проведённого исследования было показано, что ко второму фону идёт увеличение концентрации всех изучаемых аналитов, однако достоверных различий с фоном отмечено не было даже для адреналина. Достоверное повышение адреналина было зафиксировано на 7 сутки изоляции. В то же время содержание кортизола на 7е сутки достоверно снижалось. Концентрация норадреналина достоверно снижалась только на 7 сутки после завершения эксперимента.

К наиболее значимым результатам проведённого эксперимента можно отнести индуцированный синтез цитокинов моноцитами в ответ на стимуляцию соответствующими лигандами TLR. Было показано, что условия 14-суточной изоляции приводят к достоверному увеличению синтеза цитокинов при стимуляции TLR, с сохранением динамики и на 7 сутки после завершения миссии. Базальная продукция цитокинов моноцитами периферической крови в 24-часовых культурах также преимущественно увеличивалась. Возможно, это связано с интенсивным обменом микрофлоры в тесном замкнутом пространстве, когда происходит активация иммунитета. В ходе проведённого эксперимента также проводилось изучение активационной способности CD14⁺ клеток при стимулировании коктейлем лигандов TLR как теста на резервные возможности моноцитов. Примечательно, что в проведённом эксперименте наблюдалось увеличение как про-(GM-CSF, IL-8 и др.) так и противовоспалительного цитокина (IL-10). В целом было показано, что 14-суточная изоляция не оказывает негативного влияния на цитокинпродуцирующую способность моноцитов периферической крови, более того, мультирецепторная стимуляция приводила к увеличению секреции цитокинов во время изоляции и после её завершения по сравнению с фоном, что отличается от результатов, полученных в эксперименте с 21-суточной “сухой” иммерсией без профилактики, где пребывания испытателей приводило к снижению активационного потенциала (Ponomarev S.A. et al 2020).

В ходе эксперимента было показано снижение содержания CD4⁺-Т-клеток с Treg-ассоциированными фенотипами в системе *in vitro* и увеличение продукции цитокинов

нестимулированными лимфоцитами. Регуляторные Т-лимфоциты (Treg) выполняют супрессорную функцию в регуляции иммунного ответа, обеспечивают толерантность иммунной системы к собственным антигенам. Нарушение баланса Treg лимфоцитов и эффекторных Т-лимфоцитов приводит к развитию ряда патологий. Снижение содержания или инактивация Treg с фенотипом CD4+CD25+FOXP3+ приводит к развитию аутоиммунных заболеваний, усиливает иммунный ответ на опухолевые клетки и аллоантигены. Делеция Treg приводит к ускорению развития атеросклеротических изменений, а введение этих клеток подавляет развитие атеросклероза (Cronkite DA et al 2018). Выявленное в проведённом исследовании уменьшение содержания Tregs на фоне увеличения базальной продукции цитокинов лимфоцитами, по-видимому, является отражением комплексной реакции системы иммунитета на адаптацию к условиям изоляции, реализуемую посредством активации гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси, изменению продукции цитокинов мышцами и влиянием эндогенной и экзогенной микрофлоры.

Заключение

В целом следует отметить, что даже двухнедельное пребывание в ограниченном пространстве с искусственным микроклиматом при выполнении профессиональной деятельности может приводить к нарушению иммунного гомеостаза. Выявленные изменения наблюдались не только на заключительном этапе изоляции, но и через неделю после выхода из гермообъекта.

Таблица 22. Содержание моноцитов периферической крови испыателей-добровольцев, участников 14-суточной изоляции в гермообъекте с искусственной средой обитания

Моноциты																				
			Фон-7 сут			Фон-2 сут			3 сут			7 сут			14 сут			+ 7сут		
			Me	q25	q75	Me	q25	q75	Me	q25	q75	Me	q25	q75	Me	q25	q75	Me	q25	q75
TLR1	%		58,28	70,62	30,68	15,26	23,29	4,97	80,12	87,22	70,86	54,13	69,28	47,96	82,36	84,20	76,27	16,00	37,51	6,03
	экспрессия		1,82	2,03	1,51	1,26	1,32	1,13	2,39	2,66	2,21	2,11	2,60	1,69	2,81	3,06	2,62	1,44	1,59	1,28
	abs., 10 ⁹ /л		0,1	0,14	0,07	0,04	0,05	0,01	0,32	0,38	0,23	0,18	0,23	0,16	0,41	0,48	0,31	0,04	0,17	0,02
TLR2	%		99,9	100,0	99,95	99,98	100,0	99,94	99,96	99,99	99,95	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	9,92	22,00	8,32
	экспрессия		57,24	67,35	41,21	39,50	60,33	38,09	88,01	105,24	59,41	48,37	58,84	41,55	49,86	66,21	47,26	1,48	1,78	1,33
	abs., 10 ⁹ /л		0,22	0,25	0,20	0,22	0,28	0,19	0,42	0,48	0,34	0,38	0,41	0,34	0,52	0,57	0,43	0,03	0,11	0,03
TLR3	%		0,46	0,83	0,09	0,38	0,98	0,06	1,28	2,02	0,55	1,67	2,80	0,74	0,47	0,63	0,29	0,84	1,47	0,44
	экспрессия		117,2	121,99	116,42	310,74	385,62	300,44	23,18	28,22	17,98	18,03	20,88	11,47	77,74	85,1	71,94	137,84	153,54	127,09
	abs., 10 ⁹ /л		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TLR4	%		45,34	58,75	32,31	76,25	80,01	58,59	71,18	78,86	60,09	61,12	69,17	46,7	48,02	68,15	28,83	16,42	18,83	13,6
	экспрессия		2,63	3,53	2,03	4,03	4,56	3,21	3,5	4,05	3,1	3,52	6,13	2,11	3,3	7,07	2,50	1,00	1,22	0,95
	abs., 10 ⁹ /л		0,11	0,13	0,07	0,13	0,17	0,11	0,29	0,33	0,27	0,18	0,30	0,13	0,21	0,27	0,17	0,08	0,1	0,04
TLR6	%		57,79	73,70	44,65	61,04	72,67	54,92	79,73	91,74	75,39	44,73	65,64	39,44	59,06	69,92	53,85	1,14	22,62	0,36
	экспрессия		3,59	4,38	2,35	5,04	5,44	4,66	6,38	6,73	6,27	3,65	5,26	3,39	4,90	5,33	4,79	1,23	1,29	1,17
	abs., 10 ⁹ /л		0,11	0,16	0,11	0,14	0,18	0,11	0,34	0,38	0,3	0,16	0,19	0,14	0,31	0,40	0,23	0,00	0,07	0,00
TLR8	%		35,42	47,53	14,21	0,63	0,69	0,44	8,59	13,38	5,26	12,48	35,31	7,48	85,07	88,65	82,90	99,47	99,71	99,21
	экспрессия		1,82	1,85	1,81	1,22	1,24	1,21	1,56	1,62	1,51	1,42	1,55	1,39	2,53	2,74	2,32	7,72	8,07	7,29
	abs., 10 ⁹ /л		0,06	0,09	0,03	0,00	0,00	0,00	0,03	0,04	0,02	0,02	0,15	0,02	0,16	0,19	0,14	0,16	0,22	0,14
TLR9	%		3,63	4,19	2,56	0,70	1,16	0,50	2,04	5,20	1,29	5,34	6,73	4,95	31,41	36,18	27,93	36,93	37,65	35,09
	экспрессия		1,35	1,44	1,25	1,23	1,24	1,21	1,44	1,53	1,30	1,42	1,45	1,23	1,80	1,89	1,73	2,21	2,33	1,99
	abs., 10 ⁹ /л		0,01	0,01	0,01	0,00	0,00	0,00	0,01	0,02	0,01	0,01	0,03	0,01	0,07	0,08	0,05	0,06	0,10	0,05
CD14+	%		4,27	4,78	3,89	4,57	5,32	3,77	8,36	8,87	7,17	7,13	7,93	6,36	8,86	9,44	7,13	6,70	8,61	6,18
	abs., 10 ⁹ /л		0,22	0,25	0,2	0,22	0,28	0,19	0,42	0,48	0,34	0,38	0,41	0,34	0,52	0,57	0,43	0,38	0,48	0,27

Достоверное различие с – 7 сутками.

Таблица 23. Экспрессия TLRs в стимулированных соответствующими лигандами культурах моноцитов периферической крови испытуемых-добровольцев, участников 14-суточной изоляции в гермообъекте с искусственной средой обитания. Красным цветом выделены достоверные различия с фоновыми значениями ($p < 0,05$).

Клеточные культуры																	
			Фон -7 сут			3 сут			7 сут			14 сут			+7 сут		
			Me	q25	q75	Me	q25	q75	Me	q25	q75	Me	q25	q75	Me	q25	q75
TLR1	%	Контр.	40,480	49,940	17,393	28,730	37,960	27,600	30,675	38,110	17,698	64,290	76,540	58,385	57,765	79,495	37,190
		Эксп.	51,815	65,083	45,238	80,080	94,830	70,060	46,515	72,593	24,375	66,840	70,420	54,560	70,660	76,930	67,100
	экспрессия	Контр.	2,076	2,791	1,212	1,657	2,668	1,458	1,920	2,154	1,756	3,054	3,517	2,619	3,874	3,925	3,769
		Эксп.	2,910	3,612	2,391	3,523	3,851	3,018	2,350	3,071	1,753	2,947	3,016	2,653	3,669	4,065	3,513
TLR2	%	Контр.	95,905	96,593	90,013	87,540	98,410	62,500	77,125	91,940	55,913	97,305	98,845	94,018	31,140	43,915	17,780
		Эксп.	98,070	99,058	93,303	85,840	97,140	81,820	77,130	97,328	54,555	97,445	98,958	96,195	36,100	39,930	18,560
	экспрессия	Контр.	6,612	7,779	5,955	8,912	17,397	3,669	6,340	8,003	5,160	9,624	10,257	8,792	2,920	3,295	2,258
		Эксп.	10,146	20,591	7,542	7,013	19,122	5,910	8,302	9,736	5,006	12,256	14,192	10,546	3,070	3,545	2,461
TLR3	%	Контр.	24,365	35,985	14,845	24,650	38,780	3,350	46,860	57,488	40,193	77,825	82,803	43,020	97,870	98,423	96,830
		Эксп.	29,060	76,578	20,783	58,770	65,210	14,150	45,945	62,230	38,690	68,000	74,823	60,645	96,550	97,823	93,695
	экспрессия	Контр.	1,407	1,498	1,394	1,920	2,181	1,226	1,755	2,020	1,690	2,157	2,202	2,067	6,185	6,400	5,876
		Эксп.	1,560	1,584	1,315	1,676	1,947	1,671	1,759	1,908	1,640	2,177	2,381	2,101	5,374	6,029	5,125
TLR4	%	Контр.	94,220	98,328	89,618	92,830	97,170	88,390	87,015	92,493	61,933	99,540	99,680	99,400	70,560	86,675	62,583
		Эксп.	99,200	99,885	95,058	84,890	99,160	50,000	86,275	92,830	60,153	99,415	99,540	98,060	60,010	63,510	31,690
	экспрессия	Контр.	5,855	20,907	4,955	19,358	49,311	13,907	7,131	7,998	6,523	22,772	25,488	20,996	5,974	7,770	4,575
		Эксп.	11,117	26,243	6,649	17,417	45,175	9,673	8,282	10,978	6,455	47,820	53,914	40,890	5,219	6,792	4,831
TLR6	%	Контр.	5,465	9,175	4,178	49,470	72,410	22,550	4,040	5,328	2,783	32,490	43,225	24,965	2,485	5,723	0,883
		Эксп.	34,570	54,573	18,190	29,290	90,130	21,790	6,900	7,643	4,230	20,220	54,170	8,890	2,320	2,560	1,640
	экспрессия	Контр.	1,116	1,151	1,043	1,711	7,680	1,357	1,096	1,259	1,082	2,057	2,610	1,774	1,466	1,550	1,460
		Эксп.	2,004	2,434	1,466	1,912	11,439	1,677	1,204	1,306	1,117	1,717	3,024	1,403	1,566	1,461	1,417
TLR8	%	Контр.	0,385	0,460	0,243	43,500	46,060	22,560	26,905	33,513	23,470	48,770	54,108	25,170	21,840	24,503	16,200
		Эксп.	1,400	27,395	1,070	71,810	76,050	18,380	24,690	53,783	17,655	36,370	55,128	29,800	20,970	25,228	19,383
	экспрессия	Контр.	0,996	1,051	0,949	2,507	2,508	2,140	1,886	2,405	1,744	2,207	2,560	2,190	12,755	16,544	10,755
		Эксп.	1,000	1,047	0,935	2,770	3,782	2,287	1,682	2,412	1,654	2,180	2,292	2,109	17,462	19,299	12,848
TLR9	%	Контр.	3,250	8,245	2,560	5,140	5,970	4,560	14,770	16,218	11,725	29,295	51,903	15,680	91,015	91,843	89,955

	экспрессия	Эксп.	8,595	46,768	2,463	30,270	32,410	12,570	15,830	49,513	15,185	29,415	40,815	17,265	78,685	82,783	76,875
		Контр.	1,203	1,348	1,167	1,500	1,824	1,376	1,274	1,464	1,268	1,594	1,634	1,547	4,838	5,849	4,104
		Эксп.	1,246	1,429	1,070	1,608	3,168	1,324	1,367	1,625	1,327	1,640	1,674	1,615	3,367	5,483	2,711

Таблица 24. Индуцированный синтез цитокинов в моноцитарных культурах испытуемых-добровольцев, участников 14-суточной изоляции в гермообъекте с искусственной средой обитания при стимулировании TLRs с поверхностной локализацией соответствующими лигандами. Красным цветом выделены достоверные различия с фоновыми значениями ($p < 0,05$). Н.д.-нет данных

		GM-CSF	IFNa2	IFNy	IL-10	IL-12P40	IL-12P70	IL-1b	IL-6	IL-8	TNFa
Контроль	Фон	7,87	31,11	2,64	10,66	13,355	2,701	36,3	323,93	6495,5	277,78
	3 сутки	9,57	11,62	2,915	2,01	8,14	1,152	24,94	76,63	1021	107,21
	7 сутки	15,12	34,84	3,78	43,22	16,04	4,0505	76,69	886,775	9886	280,27
	14 сутки	8,9	18,365	1,85	4,79	9,865	1,371	14,985	69,21	3958,8365	59,64
	+ 7сутки	24	32,255	3,505	26,615	15,25	3,0995	59,615	683,025	9088,5	170,9
TLR1	Фон	22,755	35,575	3,63	71,135	20,68	Н.д.	75,41	2169,5	Н.д.	Н.д.
	3 сутки	10,55	21	2,71	2,88	9,52	Н.д.	22,74	105,52	Н.д.	Н.д.
	7 сутки	51,625	48,115	5,79	376,99	34,865	Н.д.	217,87	4308	Н.д.	Н.д.
	14 сутки	40,71	41,305	4,5	151,13	23,845	Н.д.	85,895	3908	Н.д.	Н.д.
	+ 7сутки	82,58	50,125	5,69	380,035	27,675	Н.д.	302,58	8966	Н.д.	Н.д.
TLR2	Фон	14,44	31,08	3,545	48,075	13,73	3,07	44,86	522,65	7736,5215	512,055
	3 сутки	5,25	16,19	2,5	3,1	8,14	2,38	26,72	124,2	1806	176,17
	7 сутки	63,935	51,82	6,05	508,255	38,07	6,035	233,605	3567,5	18055	2560
	14 сутки	41,905	44,755	4,395	203,505	26,875	4,01	109	1143	18316	580,34
	+ 7сутки	125,88	59,63	5,65	742,83	46,86	6,57	505,665	8252	55917,48	1997,5
TLR4	Фон	66,545	Н.д.	4,21	131,98	27,05	Н.д.	263,59	4895	19993,758	3117
	3 сутки	7,63	Н.д.	2,04	2,27	6,81	Н.д.	32,45	191,63	2318	514,5
	7 сутки	123,925	Н.д.	7,865	1458	49,61	Н.д.	2174,5	9837	17316,5	6941
	14 сутки	180,895	Н.д.	6,21	1490	42,725	Н.д.	5245	9065	74822,185	4727
	+ 7сутки	310,445	Н.д.	7,295	2779	58,585	Н.д.	9767	14628,576	149004,43	7520,5
TLR6	Фон	20,235	34,26	3,505	33,83	Н.д.	Н.д.	110,52	1574	Н.д.	750,68
	3 сутки	5,25	11,23	2,04	1,316	Н.д.	Н.д.	18,86	114,55	Н.д.	182,07
	7 сутки	73,44	44,6	6,65	430,61	Н.д.	Н.д.	501,95	7802	Н.д.	2334
	14 сутки	34,635	42,65	4,07	97,72	Н.д.	Н.д.	94,455	1815,5	Н.д.	388,115
	+ 7сутки	81,975	47,315	6,135	280,215	Н.д.	Н.д.	222,085	7526	Н.д.	864,25

Таблица 25. Индуцированный синтез цитокинов в моноцитарных культурах испыателей-добровольцев, участников 14-суточной изоляции в гермообъекте с искусственной средой обитания при стимулировании TLRs с внутриклеточной локализацией соответствующими лигандами. Красным цветом выделены достоверные различия с фоновыми значениями ($p < 0,05$). Н.д.-нет данных

		GM-CSF	IFN α 2	IFN γ	IL-10	IL-12P40	IL-12P70	IL-1 β	IL-6	IL-8	TNF α
Контроль	Фон	7,87	31,11	2,64	10,66	13,355	2,701	36,3	323,93	6495,5	277,78
	3 сутки	9,57	11,62	2,915	2,01	8,14	1,152	24,94	76,63	1021	107,21
	7 сутки	15,12	34,84	3,78	43,22	16,04	4,0505	76,69	886,775	9886	280,27
	14 сутки	8,9	18,365	1,85	4,79	9,865	1,371	14,985	69,21	3958,8365	59,64
	+ 7сутки	24	32,255	3,505	26,615	15,25	3,0995	59,615	683,025	9088,5	170,9
TLR3	Фон	Н.д.	Н.д.	2,96	Н.д.	19,9	2,961	48,345	Н.д.	Н.д.	363,165
	3 сутки	Н.д.	Н.д.	3,06	Н.д.	12,82	1,628	30,74	Н.д.	Н.д.	148,6
	7 сутки	Н.д.	Н.д.	5,93	Н.д.	35,935	6,334	75,49	Н.д.	Н.д.	402,275
	14 сутки	Н.д.	Н.д.	2,48	Н.д.	14,15	1,902	24,325	Н.д.	Н.д.	115,45
	+ 7сутки	Н.д.	Н.д.	6	Н.д.	33,495	3,8345	66,48	Н.д.	Н.д.	172,64
TLR8	Фон	9,57	29,51	3,065	18,675	13,57	4,605	92,925	484,31	Н.д.	475,61
	3 сутки	5,25	11,62	2,04	1,316	5,7	1,152	24,41	110,23	Н.д.	147,04
	7 сутки	44,655	53,655	5,17	331,74	35,27	20,404	749,995	4361	Н.д.	1894,5
	14 сутки	25,03	38,56	3,8	46,35	20,925	6,035	136,79	554,255	Н.д.	249,405
	+ 7сутки	31,295	39,93	5,255	75,475	28,085	5,778	189,915	1374,5	Н.д.	299,84
TLR9	Фон	Н.д.	31,11	2,92	24,815	13,57	Н.д.	52,9	659,37	8706	434,46
	3 сутки	Н.д.	11,23	2,04	2,27	6,16	Н.д.	32,19	322,7	4548	409,56
	7 сутки	Н.д.	39,085	5,17	219,325	22,265	Н.д.	282,45	3056	25523,5	1022,145
	14 сутки	Н.д.	32,545	3,21	8,23	15,48	Н.д.	22,425	154,395	6797,6075	91,87
	+ 7сутки	Н.д.	39,235	4,7	33,155	23,05	Н.д.	84,11	1053,555	11366	186,26
TLR mix	Фон	93,055	Н.д.	5,17	521,715	Н.д.	Н.д.	Н.д.	Н.д.	Н.д.	Н.д.
	3 сутки	140,47	Н.д.	10,82	2624	Н.д.	Н.д.	Н.д.	Н.д.	Н.д.	Н.д.
	7 сутки	288,645	Н.д.	7,27	2156	Н.д.	Н.д.	Н.д.	Н.д.	Н.д.	Н.д.
	14 сутки	273,665	Н.д.	7,78	2928	Н.д.	Н.д.	Н.д.	Н.д.	Н.д.	Н.д.
	+ 7сутки	93,055	Н.д.	5,17	521,715	Н.д.	Н.д.	Н.д.	Н.д.	Н.д.	Н.д.

3.3.1.4. Эксперимент со 120-суточной изоляцией в гермообъекте (проект “SIRIUS”)

В эксперименте со 120-суточной изоляцией в гермообъекте с искусственной средой обитания был проведен анализ состояния лимфоцитарного, моноцитарного и гранулоцитарного ростков крови. 120-суточное пребывание испытуемых-добровольцев в гермообъекте сопровождалось повышением относительного содержания моноцитов в периферической крови на 7-е и 63-е сутки изоляции (таблица 25).

Таблица 26

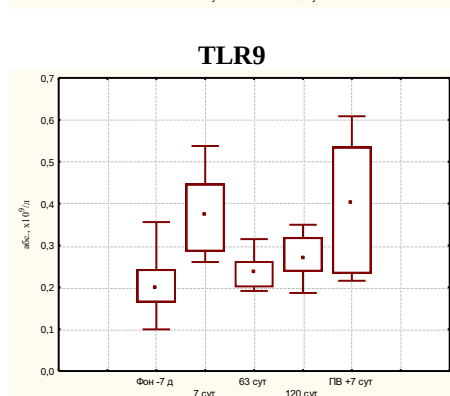
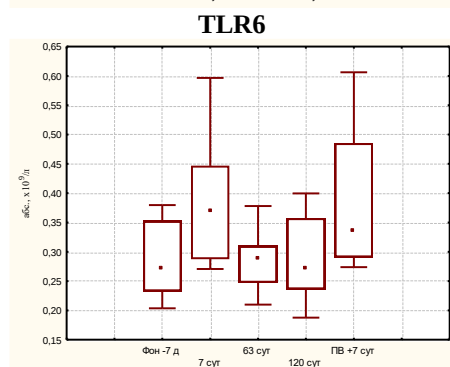
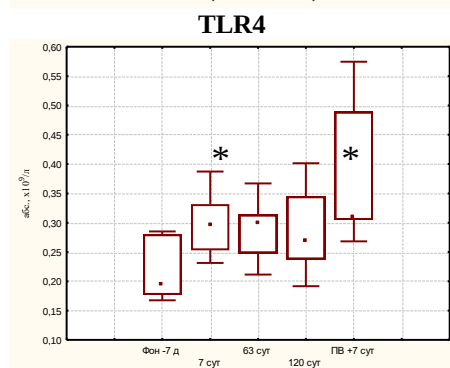
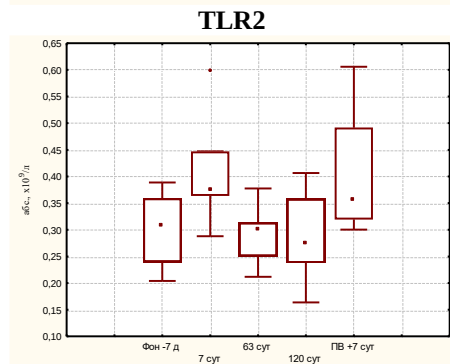
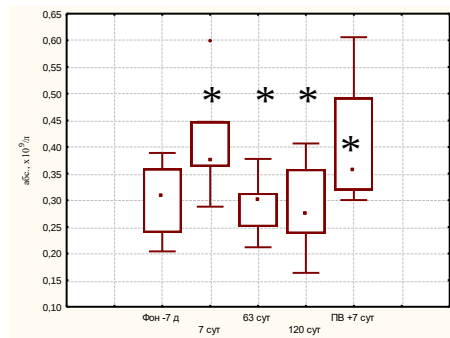
Лейкограмма периферической крови испытуемых-добровольцев в эксперименте с 120-суточной изоляцией в гермообъекте с искусственной средой обитания (Me; q75-q25) (n=6)

Показатели		Сутки пребывания в гермообъекте				
		-7-е	7-е	63-е	120-е	+7-е
Лейкоциты,	абс., $\times 10^9/\text{л}$	4,1; 4,6-3,6	4,5; 5,1-4,3	4,2; 4,4-3,8	4,5; 5,3-4,2	4,4; 4,8-4,1
Лимфоциты,	отн., %	29,5; 31,6-26,7	28,8; 31,0-26,8	25,2; 33,6-22,1	26,1; 30,0-21,8	26,2; 35,4-22,1
	абс., $\times 10^9/\text{л}$	1,1; 1,3-1,0	1,3; 1,6-1,2	1,2; 1,4-1,0	1,1; 1,4-1,0	1,3; 1,5-1,0
Моноциты,	отн., %	1,8; 1,9-1,5	2,0*; 2,1-1,9	2,3*; 2,5-2,1	2,2; 2,2-2,0	2,1; 2,2-1,7
	абс., $\times 10^9/\text{л}$	0,1; 0,1-0,1	0,1; 0,1-0,1	0,1; 0,1-0,1	0,1; 0,1-0,1	0,1; 0,1-0,1
Гранулоциты,	отн., %	68,6; 71,5-66,9	69,1; 71,0-67,0	72,5; 75,5-71,6	71,3; 75,8-68,0	72,2; 75,5-65,8
	абс., $\times 10^9/\text{л}$	2,8; 3,4-2,5	3,2; 3,6-2,7	3,2; 3,2-2,2	3,3; 3,8-2,7	3,1; 3,4-2,7

*Достоверное различие с исходным уровнем ($p < 0,05$).

Исследование влияния факторов длительной изоляции на систему сигнальных образраспознающих рецепторов семейства Toll-like клеток врождённого иммунитета здоровых добровольцев – испытуемых показало, что у всех обследованных независимо от их гендерной принадлежности наблюдались изменения содержания в периферической крови моноцитов и гранулоцитов, экспрессирующих поверхностные и внутриклеточные TLRs (рисунок 24). Примечательно, что начиная с 7-х суток пребывания в гермообъекте в периферической крови у большинства членов экипажа было выявлено существенное повышение абсолютного содержания моноцитов, экспрессирующих TLR1, TLR4 и TLR9, и гранулоцитов, экспрессирующих TLR4 и TLR6, при этом изменения абсолютного содержания TLR2+-Мн и TLR2+-Гр отсутствовали.

CD14⁺-моноциты, экспрессирующие TLRs



Гранулоциты, экспрессирующие TLRs

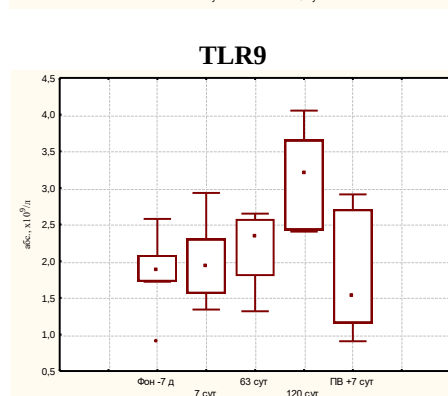
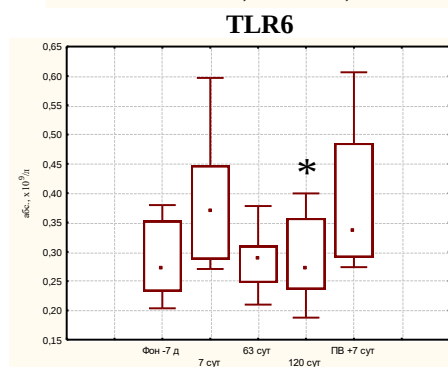
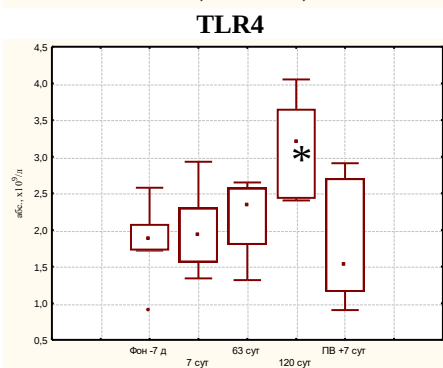
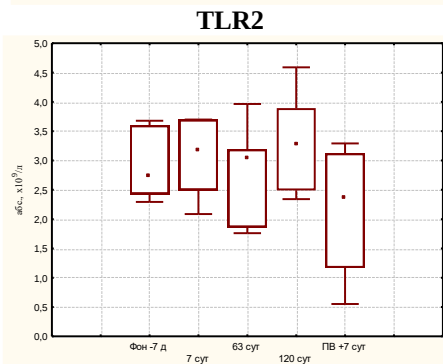
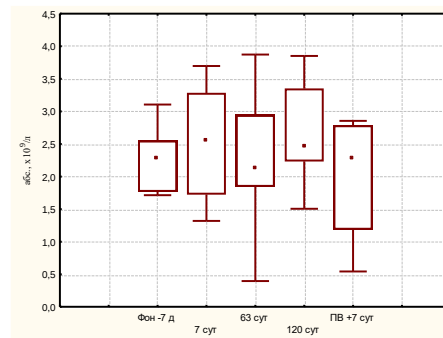


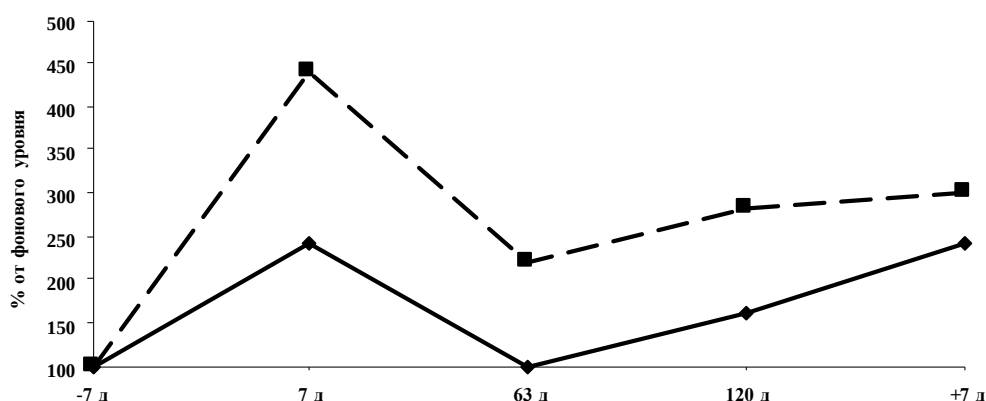
Рисунок 24. Показатели субпопуляционного состава моноцитов и гранулоцитов, экспрессирующие TLR с внутриклеточной и поверхностной локализацией в периферической крови испытуемых-добровольцев, участников эксперимента с 120-суточной изоляцией в гермообъекте с искусственной средой обитания (Me; q75-q25) (n=6)

*Достоверное различие с исходным уровнем (p<0,05).

На протяжении всего периода изоляции в периферической крови отмечалось повышение абсолютного содержания CD14⁺TLR1⁺-Мн, на 7-е сутки изоляции - CD14⁺TLR4⁺-Мн и CD14⁺TLR9⁺-Мн, а на 120-е сутки – Гр с фенотипом TLR4⁺ и TLR6⁺. Следует подчеркнуть, что динамика изменения показателей, характеризующих состояние системы сигнальных образ-распознающих рецепторов клеток врождённого иммунитета, в условиях 120-суточной изоляции в гермообъекте имела выраженный индивидуальный характер.

Было проведено исследование содержания зрелых циркулирующих ЕК-лимфоцитов в периферической крови у испытуемых-добровольцев во время 120—суточной изоляции. Было обнаружено значимое снижение абсолютного и относительного содержания клеток, имеющих фенотип CD16/56⁺ CD3⁻ на 63-е сутки изоляции (таблица 27). Анализ индивидуальной динамики изменения относительного содержания CD16/56⁺ CD3⁻-лимфоцитов позволил отметить два варианта ответов на экспериментальное воздействие. Первый – процент CD3⁻ CD56⁺CD16⁺-лимфоцитов не менялся или увеличивался во время и после завершения эксперимента (Рисунок 25А). Второй – процент CD3⁻CD56⁺CD16⁺- клеток уменьшался на 20 и более процентов после двух месяцев изоляции и сохранялся сниженным до конца эксперимента (Рисунок 25Б).

А



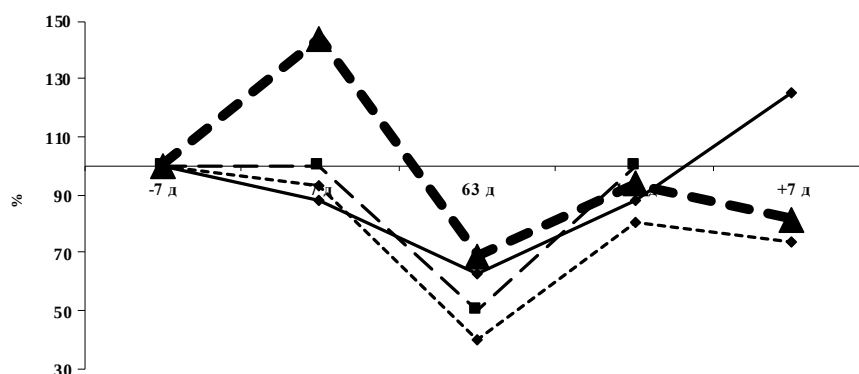


Рисунок 25. Динамика изменений процентного содержания $CD3^+CD56^+CD16^+$ -лимфоцитов в периферической крови испытуемых-добровольцев в эксперименте с 120-суточной изоляцией в замкнутом гермообъекте с искусственной средой обитания (индивидуальные данные).

Было проведено исследование функционального потенциала клеточных факторов системы естественной цитотоксичности. Установлено, что в ответ на экспериментальные воздействия в стимулированных адекватным иммуномодулирующим препаратом – ИЛ-2 культурах клеток $CD56^+$ -лимфоцитов снижалось содержание клеток, экспрессирующих активационный маркер $CD69$ (рисунок 26). Начиная с 54-х суток изоляции уровень не стимулированных ЕК-лимфоцитов, экспрессирующих молекулы $CD69$, снижался, причем это снижение достигало 17% от фонового уровня.

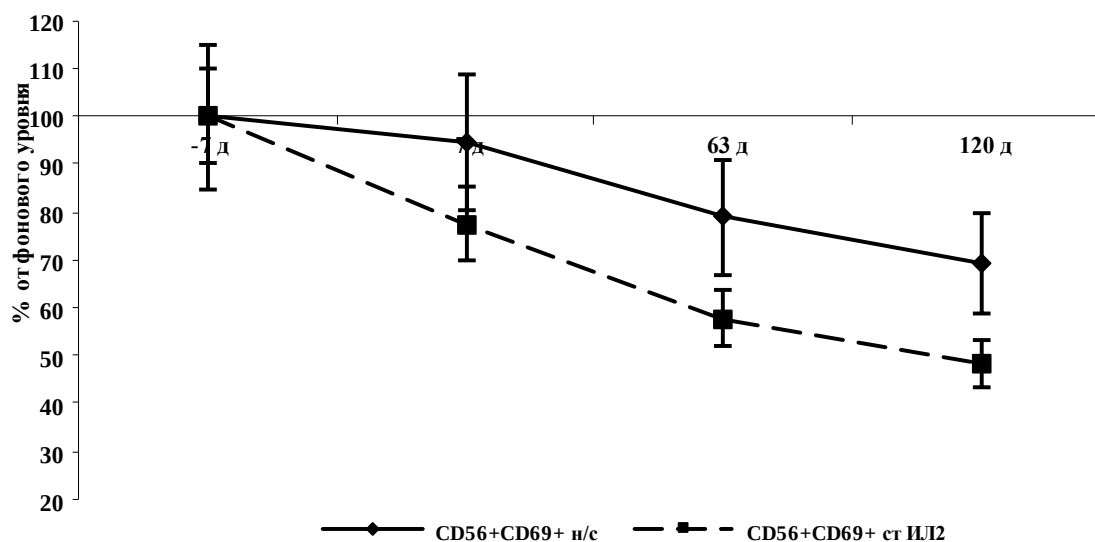


Рисунок 26. Динамика изменений процентного содержания $CD69^+$ -лимфоцитов среди $CD56^+$ -лимфоцитов в нестимулированных и стимулированных ИЛ-2 20-часовых культурах клеток периферической крови испытуемых-добровольцев в эксперименте с 120-суточной изоляцией в гермообъекте с искусственной средой обитания.

Было проведено исследование фенотипических характеристик клеточных факторов адаптивного иммунитета. На 7-е сутки изоляции в гермообъекте у членов экипажа наблюдалось снижение относительного содержания В-лимфоцитов (CD19⁺-клеток) в периферической крови ($p < 0,05$). На более поздних сроках изоляции (на 63-е и 120-е сутки) относительное и абсолютное содержание В-лимфоцитов в периферической крови членов экипажа не менялось относительно фоновых значений (таблица 27). При анализе популяции клеток адаптивного иммунитета – Т-лимфоцитов (CD3⁺-клеток), на 63-е сутки изоляции было обнаружено повышение относительного и абсолютного содержания CD3⁺CD4⁺-лимфоцитов в периферической крови испытуемых-добровольцев. При этом относительное и абсолютное содержание в периферической крови Т-лимфоцитов с фенотипом CD3⁺CD8⁺ не изменялось.

Таблица 27. Субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови испытуемых-добровольцев в эксперименте с 120-суточной изоляцией в гермообъекте с искусственной средой обитания (Me; q75-q25) (n=6)

Показатели		Сутки пребывания в гермообъекте				
		-7-е	7-е	63-е	120-е	+7-е
CD16/56 ⁺ CD3 ⁺ ,	отн., %	7,0; 13,3-5,3	13,0; 20,0-8,3	5,5*; 9,8-5,0	10,0; 13,5-7,3	12,0; 13,0-11,0
	абс., $\times 10^9/\text{л}$	0,14; 0,15-0,10	0,15; 0,23-0,12	0,08*; 0,09-0,06	0,12; 0,13-0,10	0,13; 0,16-0,13
CD19 ⁺ ,	отн., %	11,0; 11,0-8,8	9,5*; 10,0-6,0	10,0; 11,8-6,0	10,0; 10,0-9,3	11,0; 11,0-10,0
	абс., $\times 10^9/\text{л}$	0,14; 0,17-0,09	0,11; 0,15-0,08	0,10; 0,16-0,06	0,12; 0,15-0,09	0,15; 0,16-0,09
CD3 ⁺ ,	отн., %	74,5; 78,0-70,3	70,5; 75,5-66,3	77,5; 79,0-76,0	77,5; 80,8-74,3	75,5; 78,0-72,3
	абс., $\times 10^9/\text{л}$	0,78; 1,03-0,73	0,90; 1,16-0,80	0,88; 1,06-0,72	0,86; 1,13-0,73	0,95; 1,09-0,69
CD3 ⁺ CD4 ⁺ ,	отн., %	46,5; 47,0-43,0	41,5; 49,5-35,0	51,5*; 54,5-47,8	49,0; 50,0-46,5	46,0; 48,0-43,0
	абс., $\times 10^9/\text{л}$	0,45; 0,66-0,41	0,50; 0,76-0,46	0,52*; 0,70-0,49	0,51; 0,69-0,45	0,64; 0,66-0,44
CD3 ⁺ CD8 ⁺ ,	отн., %	27,0; 27,8-26,3	25,0; 27,8-22,3	26,0; 27,5-22,3	23,5; 26,3-23,0	26,0; 28,0-21,0
	абс., $\times 10^9/\text{л}$	0,32; 0,36-0,27	0,35; 0,38-0,32	0,34; 0,35-0,26	0,30; 0,36-0,22	0,34; 0,39-0,30
CD3 ⁺ CD16/56 ⁺ ,	отн., %	4,5; 6,0-3,0	4,5; 8,0-3,3	4,0; 6,3-3,3	3,5; 7,0-3,0	5,0; 10,0-2,0
	абс., $\times 10^9/\text{л}$	0,05; 0,10-0,03	0,07; 0,10-0,05	0,05; 0,08-0,04	0,05; 0,08-0,03	0,08; 0,15-0,02
CD3 ⁺ CD25 ⁺ ,	отн., %	1,90; 2,68-1,58	3,20; 3,45-2,58	4,30; 5,40-3,20	1,80; 2,45-1,23	1,90; 2,00-1,70
	абс., $\times 10^9/\text{л}$	0,025; 0,036-0,018	0,039; 0,051-0,032	0,059; 0,070-0,034	0,024; 0,030-0,016	0,028; 0,030-0,015

*Достоверное различие с исходным уровнем ($p < 0,05$).

Был проведен анализ функциональной активности Т-лимфоцитов. После 9-ти недель изоляции в гермообъекте и до окончания эксперимента отсутствовали признаки снижения экспрессии активационного маркера CD69 на CD4⁺- и CD8⁺-Т-клетках. Это было показано как в

не стимулированных, так и в стимулированных анти-CD3/CD28 антителами клеточных культурах (рисунок 25А, Б). Напротив, на 63-е сутки изоляции наблюдалось повышение спонтанной активации Т-лимфоцитов (рисунок 27А). Об активации Т-лимфоцитов на 63 сутки изоляции *in vivo* также свидетельствует повышение базальной продукции цитокинов CD3⁺ Т-лимфоцитами в 48-часовых первичных клеточных культурах (рисунок 28А). Отличительной особенностью синтеза *in vitro* цитокинов в 48-часовой культуре CD3⁺ Т-лимфоцитов являлась тенденция к повышению коэффициента баланса Th1/Th2 цитокинов и Th1/Th9 цитокинов (рисунок 28Б).

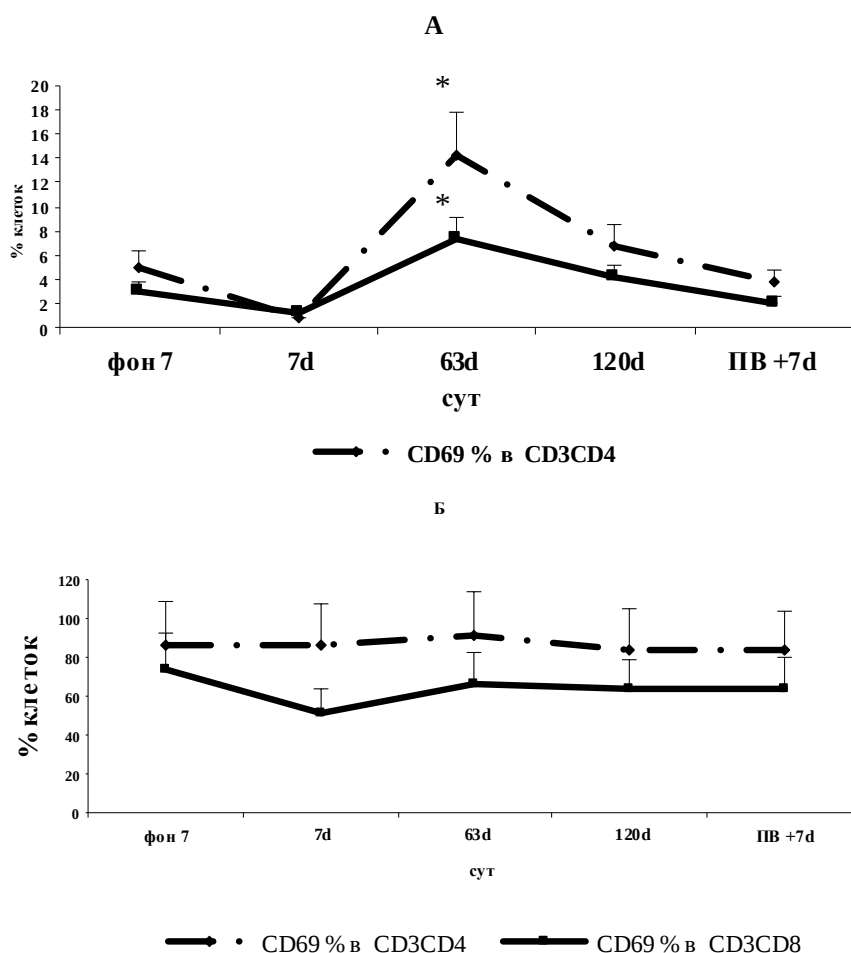


Рисунок 27. Динамика изменений процентного содержания CD69⁺-лимфоцитов среди CD4⁺CD3⁺-лимфоцитов и CD8⁺CD3⁺-лимфоцитов в нестимулированных (А) и стимулированных анти-CD3/CD28 антителами (Б) 20-часовых культурах клеток периферической крови испыателей-добровольцев в эксперименте с 120-суточной изоляцией в замкнутом гермообъекте с искусственной средой обитания

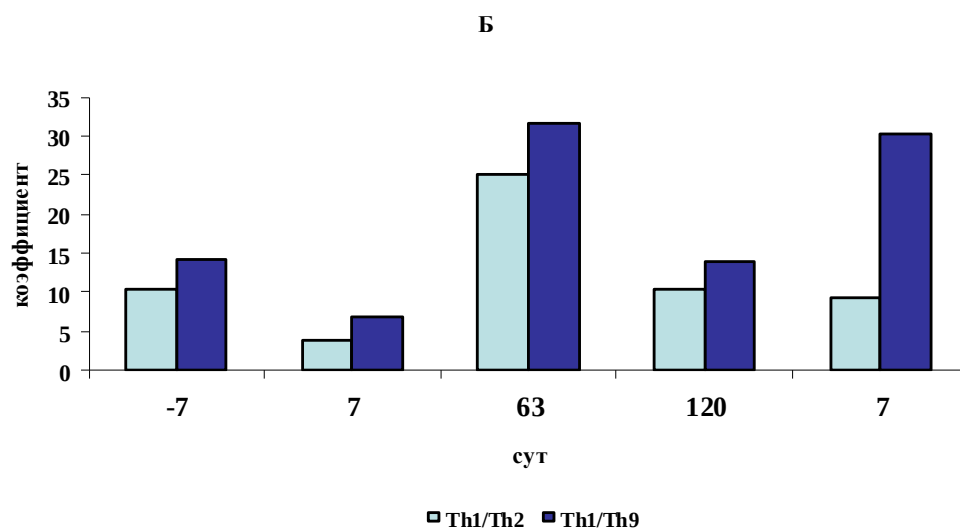
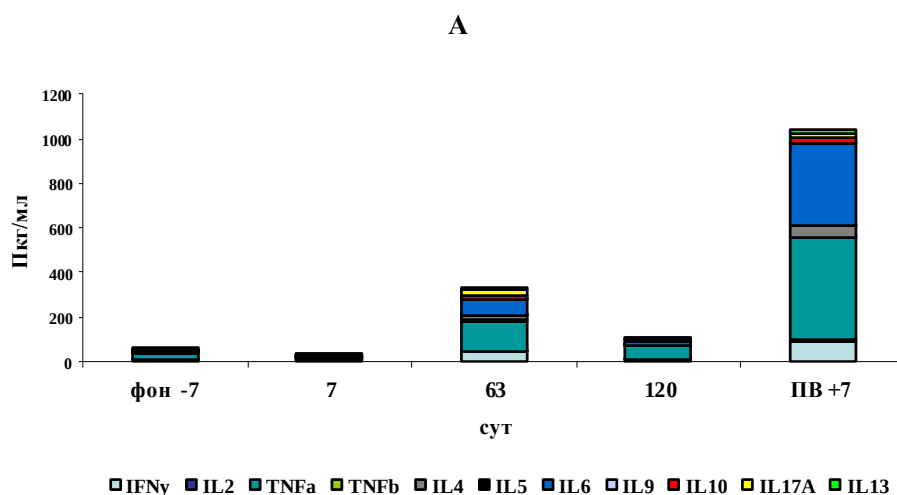


Рисунок 28. Базальная продукция цитокинов $CD3^+$ -Т-лимфоцитами периферической крови испытуемых-добровольцев в 48-часовых клеточных культурах (а) и коэффициенты баланса Th1-/Th2-/Th9-цитокинов (б) в эксперименте с 120-суточной изоляцией в замкнутом гермообъекте с искусственной средой обитания

Был проведен анализ способности $CD3^+$ Т-лимфоцитов, выделенных из периферической крови испытуемых-добровольцев 120-ти суточного изоляционного эксперимента, секретировать цитокины в 48-часовых культурах клеток. Был выявлен ряд особенностей ответа Th1- / Th2- / Th9- / Th17-клеток на стимуляцию анти-CD3/CD28 антителами (таблица 27). Было обнаружено повышение продукции ИЛ-6 (7-е, 63-е и 120-е сутки изоляции), а также продукции ИЛ-2 и ФНО β (63-е сутки изоляции) по сравнению с фоновым уровнем. В то же время, наблюдалось снижение продукции ИЛ-10 (7-е, 120-е сутки изоляции) по сравнению с фоновым уровнем.

Таблица 28. Индуцированная анти-CD3/CD28 антителами *продукция* цитокинов CD3⁺-Т-лимфоцитами периферической крови испытуемых-добровольцев в эксперименте с 120-суточной изоляцией в замкнутом гермообъекте с искусственной средой обитания (Me; q75-q25) (n=6)

Цитокины	Сутки пребывания в гермообъекте				
	-7-е	7-е	63-е	120-е	+7-е
ИФН- γ	19110,5; 20200,8-17456,3	19015,0; 22518,5-17906,3	18806,0; 20752,3-17821,3	18651,0; 22384,5-17769,8	19422,0; 20989,8-18116,0
ИЛ-2	10188,0; 12072,3-8381,8	12314,0; 22998,0-10545,3	21136,0*; 25113,0-13919,8	11636,5; 19736,3-9641,0	9343,5; 30513,5-7136,5
ФНО α	9301,5; 13329,0-9168,0	9403,0; 18740,8-8895,0	9936,5; 16965,8-9273,3	8791,0; 17299,8-8268,3	9408,5; 19001,3-9034,0
ФНО β	2065,2; 3290,3-695,3	1331,5; 2069,3-697,2	4104,0*; 5240,8-3046,0	973,6; 1612,8-634,8	1936,0; 2199,5-1823,3
ИЛ-4	1538,5; 4099,0-1330,0	449,2*; 1087,7-332,6	1648,0; 2091,0-1198,3	1962,0; 2610,5-1002,3	890,4; 3885,8-291,9
ИЛ-5	136,4; 274,9-92,8	84,1; 116,8-55,1	123,6; 241,2-71,4	90,0; 105,4-82,3	128,3; 247,4-78,9
ИЛ-6	89,2; 147,5-32,6	969,9*; 1196,5-718,1	2572,0*; 4095,5-667,7	481,7*; 778,1-338,5	1417,0*; 2118,0-742,2
ИЛ-13	1388,5; 1998,5-1248,8	1231,4; 1703,0-646,0	2308,0; 3882,8-924,3	962,7; 1216,5-755,3	1529,5; 2178,8-863,3
ИЛ-9	141,0; 163,0-138,9	142,5; 148,9-132,7	161,2; 182,0-141,8	116,1; 124,2-104,5	172,0; 209,5-152,7
ИЛ-17А	1794,0; 2297,5-706,0	2988,0; 3395,0-1376,5	3076,0; 5020,5-1391,8	2060,5; 3047,8-1830,8	3973,0; 6052,3-2646,0
ИЛ-10	12376,5; 15969,8-9513,8	6629,5*; 7837,0-5867,5	13092,0; 18157,8-2983,3	10682,0*; 13529,5-8850,0	7843,0; 15490,8-5076,3

* Достоверное различие с исходным уровнем (p<0,05).

Была проведена оценка продукции цитокинов CD3⁺ Т-лимфоцитами периферической крови испытуемых-добровольцев в первичной клеточной культуре, активированной антителами против CD3/CD28. Были рассчитаны коэффициенты баланса Th1- / Th2-/ Th9-/ Th17-цитокинов (таблица 28). Коэффициенты рассчитывались как отношение концентраций цитокинов Th1 к Th2, Th1 к Th9, Th1 к Th17, Th2 к Th9, Th2 к Th17. Было показано, что уже начиная с 7-х суток изоляции в гермообъекте, наблюдался дисбаланс соотношения цитокинов, продуцируемых четырьмя типами Т-хелперных клеток (таблица 29). Дисбаланс выражался в увеличении отношения Th2/Th9, Th2/Th17 и Th9/Th17 типов цитокинов (ИЛ4/ИЛ9, ИЛ4/ИЛ17А, ИЛ13/ИЛ17А, ИЛ10/ ИЛ17А).

Таблица 29. Коэффициенты баланса Th1-/Th2-/Th9-/Th17 -цитокинов, продуцируемых в ответ на активацию анти-CD3/CD28 антителами CD3⁺-Т-лимфоцитами периферической крови испытуемых-добровольцев, в эксперименте с 120-суточной изоляцией в замкнутом гермообъекте с искусственной средой обитания (Me; q75-q25) (n=6)

Сутки пребывания в гермообъекте	Показатели			
	ИФН-γ/ИЛ4	ИФН-γ/ИЛ9	ИФН-γ/ИЛ10	ИФН-γ/ИЛ17А
-7-е	10,26; 12,05-5,38	128,12; 137,72-120,29	1,29; 1,82-1,17	8,37; 34,51-7,95
7-е	40,17*; 52,93-24,29	137,54; 164,64-134,59	2,68*; 3,18-2,33	6,88; 18,85-5,87
63-е	12,92; 18,05-8,66	112,74; 128,59-110,85	1,57; 15,28-1,03	6,84*; 15,51-3,71
120-е	8,92; 12,20-7,66	164,82; 208,45-146,27	2,38*; 3,81-1,68	9,76; 11,60-7,42
+7-е	27,96; 45,95-6,95	117,56; 146,08-98,95	2,63; 3,56-1,62	4,93; 7,17-3,51
	ИЛ2/ИЛ4	ИЛ2/ИЛ9	ИЛ2/ИЛ10	ИЛ2/ИЛ17А
-7-е	4,02; 7,45-2,52	63,23; 80,35-53,18	0,78; 0,92-0,52	5,35; 19,85-3,88
7-е	21,77*; 28,72-11,41	84,61; 143,91-65,34	1,71*; 2,10-1,57	4,87; 7,90-3,85
63-е	15,49; 23,52-6,99	119,46*; 134,48-94,24	1,32*; 18,49-1,14	7,25; 18,73-3,13
120-е	6,45; 8,29-4,96	144,95; 197,25-90,03	1,08; 1,99-1,04	6,50; 8,88-4,79
+7-е	9,99; 20,76-7,37	51,98; 192,82-36,27	1,38; 1,95-0,91	2,85*; 3,71-2,14
	ИЛ4/ИЛ9	ИЛ4/ИЛ17А	ИЛ6/ИЛ9	ИЛ6/ИЛ17А
-7-е	16,67; 26,22-10,64	1,54; 3,64-0,75	0,64; 1,77-0,20	0,06; 0,10-0,06
7-е	5,23*; 8,31-3,35	0,32*; 0,40-0,19	7,76*; 10,98-5,99	0,47; 0,72-0,34
63-е	9,37; 12,54-7,37	0,77; 1,08-0,44	14,63*; 24,91-3,85	0,54; 0,95-0,20
120-е	16,24; 26,03-11,13	1,22; 1,43-0,58	3,64*; 6,14-2,95	0,21; 0,41-0,17
+7-е	6,49; 18,56-2,14	0,19*; 0,34-0,10	7,84*; 11,73-4,61	0,33; 0,42-0,21
	ИЛ13/ИЛ9	ИЛ13/ИЛ17А	ИЛ10/ ИЛ17А	ИЛ10/ИЛ13
-7-е	12,78; 22,71-7,44	1,40; 1,78-0,89	7,59; 26,71-6,56	10,16; 13,63-4,50
7-е	11,96; 12,52-7,32	0,62*; 0,68-0,44	3,18; 6,15-2,35	7,87; 10,13-4,71
63-е	14,22; 24,90-6,44	0,69; 0,93-0,63	2,64*; 3,60-1,59	3,20*; 5,42-1,59
120-е	9,11; 10,20-7,85	0,64*; 0,78-0,43	4,45; 5,04-4,26	8,95; 10,79-6,89
+7-е	11,42; 18,98-6,60	0,43*; 0,52-0,30	1,82*; 2,37-1,24	4,84; 5,54-4,31

*Достоверное различие с исходным уровнем (p<0,05).

Обсуждение результатов

Результаты проведенных исследований адаптационных процессов иммунной системы участников эксперимента со 120-суточной изоляцией показали, что пребывание в условиях моделирования лунной космической миссии оказывает существенное влияние на врожденный и адаптивный иммунитет.

Так как система врождённого иммунитета является первой линией защиты организма, реакции врожденного иммунитета сдерживают распространение патогена до «запуска» отсроченного высокоспецифичного адаптивного иммунитета, формируют основу для развития адаптивного иммунного ответа (Beutler B et al 2004). Распознавание чужеродных агентов клетками врождённого иммунитета осуществляется с помощью специфических, наследственно закодированных образраспознающих рецепторов – PRR. Сложность и разнообразие строения PRRs позволяют им распознавать различные экзогенные (ЛПС бактерий, маннаны грибов, нуклеиновые кислоты вирусов) и эндогенные лиганды (появляются в результате развития воспаления и (или) повреждения тканей, такие как белки теплового шока) (Симбирцев А.С., 2005).

Исследования, выполненные в рамках международного проекта "SIRIUS-19", показали, что в условиях 120-суточной изоляции изменения количества моноцитов и гранулоцитов, экспрессирующих различные TLRs, имели волнообразный характер. Также показано, что независимо от гендерной принадлежности у испытуемых-добровольцев во время изоляции в гермообъекте не было выявлено снижения абсолютного содержания моноцитов и гранулоцитов, экспрессирующих TLR с поверхностной (TLR1, TLR2, TLR4, TLR6) и внутриклеточной (TLR9) локализацией. Напротив, было показано увеличение количества в периферической крови моноцитов с фенотипом TLR1⁺, TLR4⁺, TLR9⁺, и гранулоцитов, экспрессирующих TLR4, TLR6.

Существуют несколько гипотез, объясняющих повышение и снижение экспрессии TLR в различных условиях. Согласно одной из них, важным фактором, приводящим к увеличению экспрессии TLRs клетками врождённого иммунитета, являются природа и патогенность попадающих в организм инфекционных агентов, и экспрессия TLRs напрямую коррелирует с тяжестью инфекционного заболевания. В зависимости от природы инфекционного агента наблюдается увеличение экспрессии того или иного TLR. Например, при инфицировании грамположительными бактериями, происходит усиление экспрессии TLR2, а при грамотрицательными - возрастает экспрессия TLR4. (Akira S et al 2015). Вирусная инфекция приводит к активации экспрессии TLR1, TLR2, TLR3, TLR7, TLR8, TLR9, что, в конечном итоге, приводит к выработке IFN 1-го типа (Akira S et al 2015). Также известно, что TLR,

находящиеся на клеточной мембране, активируются при взаимодействии с компонентами клеточной стенки нормальной микрофлоры. Эта базальная стимуляция поддерживает напряженность иммунного ответа, препятствуя инвазии патогенных микроорганизмов. Было установлено, что стимуляция культуры макрофагов живыми бактериями *Lactobacillus casei* способна увеличить экспрессию TLR2, а убитыми бактериями — TLR2–4 и TLR9 (Wang Y., et al., 2013). Является ли снижение экспрессии TLR причиной или следствием увеличения количества условно-патогенных микроорганизмов, до сих пор не известно. Тем не менее можно предположить, что одним из основных факторов снижения экспрессии TLR у лиц с высокой степенью инфекционного риска является исходно низкое содержание лакто- и бифидобактерий.

Во время 120-суточной изоляции в гермообъекте с искусственной средой обитания были выявлены различные типы реакций системы естественной цитотоксичности. У нескольких испытуемых наблюдалось увеличение содержания клеток с фенотипом CD56⁺CD16⁺, тогда как у остальных испытуемых снижение содержания этих клеток в периферической крови. Функциональную активность ЕК-лимфоцитов анализировали по их способности к активации в ответ на стимуляцию. Известно, что активация ЕК-клеток интерлейкином 2 стимулирует экспрессию антигена CD69 (Grudzien M et al 2018) Активация экспрессии CD69 в ЕК-клеточном клоне может стимулировать цитолитический механизм этих клеток (Grudzien M et al 2018). Полученные в настоящем исследовании результаты показали, что у всех испытуемых-добровольцев уже с 7 суток изоляции в гермообъекте отмечалось значительное снижение активационного потенциала ЕК-лимфоцитов. Подобные изменения в системе естественной цитотоксичности при длительной изоляции в гермообъекте можно расценить как признак риска развития инфекционных заболеваний различной этиологии. В частности, может увеличиться риск развития заболеваний, вызванных нормальной микрофлорой, которая в обычных условиях не приводит к развитию патологических реакций со стороны организма.

В 120-суточном изоляционном эксперименте был также проведен анализ данных о состоянии адаптивного иммунитета. Выявленной особенностью состава клеточных факторов адаптивного иммунитета в условиях изоляции является тенденция к увеличению содержания CD4⁺-Т-лимфоцитов. Можно предположить, что, повышение относительного и абсолютного содержания CD3⁺CD4⁺-лимфоцитов в периферической крови испытуемых связано с изменением баланса в иммунной системе. О том, что имела место значительная активация Т-лимфоцитов *in vivo* (через 2 месяца изоляции), свидетельствуют повышение процента CD4⁺- и CD8⁺-Т-лимфоцитов и базальной секреции цитокинов в монокультурах нестимулированных CD3⁺-Т-лимфоцитов.

В последнее десятилетие активно изучались характеристики субпопуляций Т-хелперов (Th1, Th2, Treg, Th17). Были изучены отдельные субпопуляции среди наивных Т-хелперов, а также минорные субпопуляции, специализирующиеся на синтезе отдельных цитокинов (Хайдуков С.В. и др.. 2011).

В проведенном исследовании был определен спектр секретируемых цитокинов культурами CD3⁺Т-лимфоцитов, полученными из клеток периферической крови испытуемых на разных сроках 120-суточной изоляции в гермообъекте. После двух месяцев изоляции у испытуемых наблюдалось повышение баланса базального синтеза Th1- и Th2-цитокинов, и Th1- и Th9-цитокинов. Такие изменения могут указывать на изменение цитокинпродуцирующей способности Т-лимфоцитов *in vivo*, а также на появление признаков дисбаланса в функционировании цитокиновой сети, являющегося следствием повышенной секрецией Th1-цитокинов. Показано, что разнонаправленные действия цитокинов, синтезируемых Th1-, Th2-, и Th9-клетками, обуславливает взаимное ингибирующее влияние этих субпопуляций друг на друга (Badolati I et al 2020). Благодаря этому сохраняется динамическое равновесие функций Th1- Th2- и Th9-лимфоцитов. Нарушение данного равновесия может приводить к подавлению иммунного ответа и развитию патологических состояний. Стрессовое воздействие экспериментальных условий во время 120-суточной изоляции не могло не отразиться и на потенциальной, резервной способности Т-клеток отвечать на антигенный стимул. Исследование индуцированной (анти-CD3/CD28 антитела) продукция цитокинов CD3⁺-Т-лимфоцитами также выявило разнонаправленные изменения уровня секреции Th1-, Th2- и Th2-цитокинов.

Заключение

В целом, при кратковременной и долгосрочной изоляции в гермообъекте с искусственной средой обитания наблюдается ряд гетерогенных изменений как во врожденном, так и адаптивном иммунитете. Данное наблюдение также подтверждает выдвинутую в начале работы гипотезу о том, что изменения показателей иммунной системы представляют собой функцию зависимости от множества как внутренних, так и внешних факторов и отражают текущее непрерывное взаимодействие с эндогенными и экзогенными факторами.

3.3.1.5. Эксперимент с 11-суточным пребыванием в гипербарической кислородно-азотно-аргоновой среде (“Аргон-13”)

С целью выявления влияния повышенного по сравнению с атмосферным давления и гипоксических условий в присутствии инертного газа на систему иммунитета здорового человека был проведен эксперимент с 11-суточным пребыванием в барокамере в кислородно-аргоновой среде. В ходе данного исследования было показано, что пребывание в гипоксических условиях с частичной заменой азота на аргон в атмосфере ГВК-250 и избыточным давлением

0,02 МПа во время первой экспериментальной серии наблюдалось увеличение гематокрита с 43,9 (43,35–44,43) до 46,3 (44,58–47,03) % ($p = 0,03$) через сутки после выхода из гермообъекта, к 8-м суткам показатель не отличался от фоновых значений. Во время второй экспериментальной серии с частичной заменой азота на аргон – 35–45 %, избыточным давлением 0,2 МПа и содержанием кислорода 4,7–5,3 % гематокрит также увеличился через сутки после выхода из гермообъекта с 45,05 (44,20–45,95) до 74,65 (63,53–76,65) % ($p=0,03$) и не отличался от фоновых значений через 8 сут. Во время третьей экспериментальной серии не выявлено существенных изменений гематокрита. Содержание эритроцитов в крови также увеличивалось во время первой и второй экспериментальных серий через сутки после выхода из гермообъекта: с 5,42 (5,24–5,66) до 5,72 (5,39–6,02) млн/мкл в первой серии и с 4,99 (4,80–5,29) до 8,41 (7,10–8,75) млн/мкл во второй серии ($p = 0,03$). При анализе экспериментальных данных была обнаружена сильная корреляционная связь ($r = 0,70$; $p < 0,0001$) между изменениями гематокрита и количества эритроцитов в крови. Ни в одной экспериментальной серии не было выявлено достоверных изменений содержания лейкоцитов в периферической крови. Также мы не обнаружили изменений абсолютного и относительного содержания лимфоцитов, моноцитов и гранулоцитов (таблица 29).

Таблица 30. Показатели лейкограммы периферической крови испытуемых, участников эксперимента “Аргон-13”

Параметр	Ед. изм.		Первая серия экспериментов					Вторая серия экспериментов				Третья серия экспериментов				
			7 д. до	4 д.	10 д.	1 д. после	8 д. после	7 д. до	4 д.	1 д. после	8 д. после	7 д. до	4 д.	10 д.	1 д. после	8 д. после
Гематокрит	%	M	44	44	48	4	43	45	49	75	44	39	42	41	43	40
		Q1	43	43	45	4	42	44	48	64	42	36	41	41	42	38
		Q3	44	48	50	4	44	46	50	77	46	40	43	43	47	43
Эритроцит	$\times 10$	M	5,4	5,5	6,0	5,7	5,6	5,0	5,6	8,4	4,8	4,7	5,3	5,2	5,2	4,8

Параметр	Ед. изм.		Первая серия экспериментов					Вторая серия экспериментов				Третья серия экспериментов				
			7 д. до	4 д.	10 д.	1 д. после	8 д. после	7 д. до	4 д.	1 д. после	8 д. после	7 д. до	4 д.	10 д.	1 д. после	8 д. после
Q ₁	5,2	5,4	5,7	5,4	5,3	4,8	5,3	7,1	4,7	4,4	5,0	5,0	4,7	4,8		
Q ₃	5,7	6,1	6,6	6,0	5,7	5,3	5,8	8,7	5,2	5,0	5,5	5,5	5,8	5,0		
Лейкоциты	× 10 ³ ед/мкл	M	6,4	8,2	7,7	7,1	6,1	6,0	8,9	4,4	6,9	6,5	7,8	8,2	7,1	7,5
		Q ₁	5,4	6,1	7,3	6,8	5,3	5,2	6,6	3,9	5,6	5,7	6,7	7,1	5,6	6,5
		Q ₃	8,3	8,7	8,1	7,7	7,5	6,7	9,3	5,7	8,6	7,6	9,5	8,5	7,7	8,3
Лимфоциты	× 10 ³ ед/мкл	M	2,0	2,1	2,7	2,1	1,7	1,9	2,8	1,5	2,5	2,3	3,3	3,3	2,1	2,3
		Q ₁	1,4	1,9	2,4	1,8	1,7	1,8	2,4	1,4	2,0	1,6	2,9	2,7	1,3	1,8
		Q ₃	3,2	3,2	3,2	2,6	2,5	2,4	3,7	1,8	3,2	2,4	3,7	3,8	3,2	2,8
Лимфоциты	%	M	34	33	33	29	32	35	40	35	36	31	42	43	34	33
		Q ₁	25	27	33	25	28	29	32	31	33	28	34	35	20	26
		Q ₃	39	38	41	34	35	39	41	38	42	35	49	44	42	33
Моноциты	× 10 ³ ед/мкл	M	0,2	0,3	0,4	0,4	0,4	0,3	0,5	0,3	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,5
		Q ₁	0,2	0,2	0,3	0,3	0,3	0,3	0,5	0,2	0,4	0,3	0,3	0,3	0,4	0,3
		Q ₃	0,4	0,4	0,7	0,4	0,5	0,3	0,9	0,4	0,6	0,4	0,6	0,5	0,5	0,5

Параметр	Ед. изм.		Первая серия экспериментов					Вторая серия экспериментов				Третья серия экспериментов				
			7 д. до	4 д.	10 д.	1 д. после	8 д. после	7 д. до	4 д.	1 д. после	8 д. после	7 д. до	4 д.	10 д.	1 д. после	8 д. после
Моноциты	%	M	3,4	3,3	5,0	5,4	5,6	5,8	7,3	6,8	6,0	5,5	5,5	4,9	6,4	5,8
		Q ₁	2,9	3,1	4,6	4,9	5,2	5,1	6,0	5,8	4,8	4,5	4,3	4,0	5,1	3,9
		Q ₃	5,2	5,0	8,6	5,8	7,1	6,1	9,4	7,7	8,4	5,7	6,9	6,0	8,5	7,3
Гранулоциты	× 10 ³ ед/мкл	M	4,1	5,0	4,6	4,7	4,2	3,6	4,6	2,7	3,6	4,0	4,0	4,3	4,1	4,7
		Q ₁	3,6	3,9	3,8	4,2	3,2	3,2	3,7	2,2	3,0	3,4	3,0	3,8	3,4	4,0
		Q ₃	4,6	5,6	5,0	5,0	4,6	4,0	5,2	3,3	5,3	4,8	5,8	4,8	5,1	5,4
Гранулоциты	%	M	62	62	62	65	63	59	52	58	59	63	51	53	59	63
		Q ₁	56	59	51	60	58	56	50	56	50	59	46	51	53	60
		Q ₃	71	69	63	70	66	65	61	62	62	67	62	59	72	68

Примечание. Данные представлены в виде медианы (M), 0,25 (Q₁) и 0,75 (Q₃) квартилей. * – достоверные изменения относительно исходного уровня ($p < 0,05$).

Не были обнаружены и изменения общего и процентного содержания CD3⁺CD16⁺CD56⁺-NK-клеток, В-клеток (CD19⁺) и Т-клеток (CD3⁺). В то же время через сутки после выхода из гермообъекта во второй экспериментальной серии достоверно снижалось относительное содержание Т-лимфоцитов с фенотипами CD3⁺CD4⁺ и CD3⁺CD8⁺ ($p = 0,03$) (таблица 31).

Таблица 31. Показатели субпопуляционного состава лимфоцитов в периферической крови испытуемых, участников эксперимента “Аргон-13”

Параметр	Ед.изм.		Первая экспериментальная серия					Вторая экспериментальная серия				Третья экспериментальная серия				
			7д. до	4д.	10д.	1д. после	8д. после	7д. до	4д.	1д. после	8д. после	7д. до	4д.	10д.	1д. после	8д. после
CD19 ⁺ лимфоциты	Х10 ³ ед./мкл	М	0,2	0,3	0,4	0,3	0,2	0,2	0,3	0,2	0,3	0,3	0,4	0,4	0,2	0,2
		Q1	0,1	0,2	0,3	0,2	0,2	0,2	0,2	0,1	0,2	0,1	0,4	0,3	0,1	0,2
		Q3	0,7	0,6	0,4	0,4	0,5	0,4	0,6	0,3	0,6	0,4	0,5	0,8	0,4	0,4
CD19 ⁺ лимфоциты	%	М	13	14	15	13	11	10	11	12	13	12	12	13	11	12
		Q1	8	10	13	9	11	9	9	9	12	9	12	11	9	9
		Q3	19	19	21	19	20	15	17	18	18	16	17	21	13	16
CD3 ⁺ лимфоциты	Х10 ³ ед./мкл	М	1,6	1,6	2,0	1,5	1,2	1,4	2,0	1,0	1,9	1,6	2,2	2,3	1,6	1,5
		Q1	1	1,3	1,8	1,1	1,2	1,3	1,7	1	1,5	1,1	2,0	2,0	1	1,3
		Q3	2,1	2,0	2,5	1,8	1,6	1,6	2,4	1,3	2,2	1,8	2,7	2,4	2,2	1,8
CD3 ⁺ лимфоциты	%	М	69	72	75	69	73	75	73	73	77	72	73	69	76	68
		Q1	66	63	67	66	61	67	67	62	70	65	59	62	67	65
		Q3	78	75	78	72	76	78	79	75	78	80	81	80	80	77
CD3 ⁺ CD4 ⁺ лимфоциты	Х10 ³ ед./мкл	М	1	0,9	1	0,9	0,8	0,9	1	0,6*	1	0,9	1	1	0,9	1
		Q1	0,6	0,7	0,7	0,7	0,6	0,7	0,8	0,6	0,8	0,7	1	1	0,5	0,7
		Q3	1	1	1	1	1	1	1	0,7	1	1	2	1	1	1
CD3 ⁺ CD4 ⁺ лимфоцит	%	М	44	42	41	41	41	45	41	41	40	43	40	40	42	43
		Q1	39	34	33	38	33	37	34	37	37	37	37	38	38	35
		Q3	48	45	51	44	49	51	49	47	50	49	52	43	47	44
CD3 ⁺ CD8 ⁺ лимфоциты	Х10 ³ ед./мкл	М	0,6	0,7	0,9	0,6	0,5	0,5	0,9	0,4*	0,8	0,5	0,8	1	0,6	0,6
		Q1	0,3	0,5	0,4	0,4	0,4	0,4	0,5	0,3	0,5	0,4	0,6	0,8	0,4	0,6
		Q3	0,8	0,7	1	0,7	0,6	0,7	1	0,4	0,8	0,7	1	1	0,8	0,7
CD3 ⁺ CD8 ⁺ лимфоциты	%	М	24	26	31	26	24	25	31	23	27	24	26	32	29	25
		Q1	20	20	19	21	19	21	21	18	21	19	19	22	23	22
		Q3	36	36	37	32	35	34	35	30	36	36	32	37	35	37
CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺ лимфоциты	Х10 ³ ед./мкл	М	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,3	0,3	0,1	0,3
		Q1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	0,1	0,1
		Q3	0,3	0,5	0,3	0,2	0,4	0,3	0,5	0,3	0,2	0,4	0,8	0,7	0,6	0,4
CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺ лимфоциты	%	М	8	8	7	7	9	10	9	10	5	7	11	9	11	10

		Q1	5	8	5	6	6	8	7	9	5	5	5	7	6	8
		Q3	13	17	10	11	21	13	13	17	9	18	22	19	19	16

Примечание. Данные представлены в виде медианы (M), 0,25 ($Q1$) и 0,75 ($Q2$) квартилей. * – достоверные изменения относительно исходного уровня ($p < 0,05$).

Во второй экспериментальной серии через сутки после выхода из гермообъекта наблюдалось увеличение относительного содержания моноцитов, экспрессирующих TLR2 и TLR4 ($p = 0,03$). Также наблюдалось увеличение абсолютного и относительного содержания гранулоцитов, экспрессирующих TLR2 и TLR4, и увеличение относительного содержания гранулоцитов, экспрессирующих TLR6 ($p = 0,03$) (таблица 31).

Таблица 32. Субпопуляционный состав моноцитов и гранулоцитов в периферической крови испытуемых

Параметр	Ед. изм.		Первая серия экспериментов					Вторая серия экспериментов				Третья серия экспериментов				
			7 д. до	4 д.	10 д.	1 д. после	8 д. после	7 д. до	4 д.	1 д. после	8 д. после	7 д. до	4 д.	10 д.	1 д. после	8 д. после
TLR2-моноциты	$\times 10^3$ ед./мкл	M	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,5	0,3	0,4	0,3	0,4	0,4	0,4	0,4
		Q_1	0,09	0,09	0,02	0,2	0,05	0,1	0,4	0,2	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
		Q_3	0,2	0,3	0,6	0,3	0,2	0,2	0,9	0,4	0,5	0,4	0,5	0,5	0,5	0,4
TLR2-моноциты	%	M	47	55	51	53	21	47	95	94	93	92	95	98	95	88
		Q_1	38	34	13	46	15	34	95	93	91	89	94	96	89	83
		Q_3	61	71	78	66	48	65	97	94*	95	94	97	98	98	90
TLR4-моноциты	$\times 10^3$ ед./мкл	M	0,01	0,009	0,02	0,04	0,02	0,04	0,05	0,1	0,07	0,06	0,07	0,06	0,04	0,06
		Q_1	0,01	0,006	0,02	0,03	0,01	0,02	0,04	0,06	0,03	0,03	0,04	0,06	0,02	0,04
		Q_3	0,08	0,03	0,04	0,08	0,06	0,09	0,1	0,2	0,2	0,1	0,1	0,08	0,06	0,1
TLR4-моноциты	%	M	7	4	5	11	5	13	11	32*	18	20	16	19	9	15
		Q_1	5	2	4	8	3	6	6	21	10	10	9	12	4	13
		Q_3	20	7	6	20	17	26	17	53	39	28	26	24	16	24

Параметр	Ед. изм.		Первая серия экспериментов					Вторая серия экспериментов				Третья серия экспериментов				
			7 д. до	4 д.	10 д.	1 д. после	8 д. после	7 д. до	4 д.	1 д. после	8 д. после	7 д. до	4 д.	10 д.	1 д. после	8 д. после
TLR6-моноциты	× 10 ³ ед/мкл	M	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0,05	0,1	0,06	0,1	0,07	0,08	0,09	0,02	0,07
		Q ₁	0,01	0,006	0,009	0,01	0,008	0,03	0,07	0,03	0,07	0,05	0,03	0,04	0,02	0,06
		Q ₃	0,05	0,02	0,02	0,03	0,03	0,07	0,4	0,2	0,2	0,2	0,2	0,1	0,03	0,1
TLR6-моноциты	%	M	6	6	3	5	6	16	21	27	22	18	16	23	5	17
		Q ₁	5	3	3	3	2	9	11	10	20	15	7	9	4	15
		Q ₃	13	7	5	6	8	23	54	73	58	57	47	35	8	31
TLR2-	× 10 ³ ед/мкл	M	0,2	1	0,2	0,09	0,1	0,3	2	2*	2	4	3	2	2	3
		Q ₁	0,04	0,6	0,09	0,08	0,09	0,09	1	1	2	3	2	2	1	2
		Q ₃	0,4	1	0,2	0,2	0,2	0,9	2	3	5	4	5	3	3	3
TLR2-гранулоциты	%	M	4	20	5	2	4	8	41	82*	80	88	72	62	52	62
		Q ₁	1	12	2	2	2	3	29	50	69	82	59	51	32	40
		Q ₃	9	30	14	3	7	26	46	99	88	91	88	69	83	73
TLR4-гранулоциты	× 10 ³ ед/мкл	M	0,1	0,5	0,2	0,08	0,07	0,3	0,2	2*	2	2	0,6	0,4	0,7	1
		Q ₁	0,07	0,2	0,1	0,05	0,05	0,08	0,1	1	2	1	0,3	0,2	0,2	0,3
		Q ₃	0,4	1	0,2	0,1	0,1	0,6	0,4	2	3	3	2	0,5	0,8	2
TLR4-гранулоциты	%	M	4	8	4	2	2	9	5	65*	52	45	13	10	15	20
		Q ₁	2	4	3	1	2	2	3	45	51	26	8	5	5	7
		Q ₃	10	26	8	3	3	15	9	90	69	62	53	12	23	45
TLR6-	× 10 ³	M	0,2	0,3	0,1	0,09	0,06	0,3	0,4	2	2	3	1	0,6	0,4	2
		Q ₁	0,1	0,2	0,08	0,05	0,04	0,1	0,2	0,3	2	2	0,5	0,4	0,3	0,3

Параметр	Ед. изм.		Первая серия экспериментов					Вторая серия экспериментов				Третья серия экспериментов				
			7 д. до	4 д.	10 д.	1 д. после	8 д. после	7 д. до	4 д.	1 д. после	8 д. после	7 д. до	4 д.	10 д.	1 д. после	8 д. после
		Q ₃	0,3	1	0,1	0,1	0,09	0,4	0,9	3	3	3	2	0,9	0,5	2
TLR6-гранулоциты	%	M	5	7	3	2	2	6	14	71*	64	64	22	14	11	32
		Q ₁	3	4	2	1	1	3	5	13	47	46	13	10	6	8
		Q ₃	7	22	5	3	2	14	18	99	80	93	42	23	16	45

Примечание. Данные представлены в виде медианы (M), 0,25 (Q1) и 0,75 (Q2) квартилей.

* – достоверные изменения относительно исходного уровня ($p < 0,05$).

Обсуждение результатов

В проведённом эксперименте было изучено влияние различных вариантов пожаробезопасных газовых сред на состояние иммунитета человека. С этой целью было проведено три экспериментальные серии. В первой и третьей сериях испытуемые 10 дней находились в гипоксических условиях. Первая серия отличалась от третьей частичной заменой азота на аргон. Таким образом, сравнение результатов этих экспериментальных серий позволило оценить эффект добавления аргона в дыхательную смесь. Вторая экспериментальная серия отличалась от первой содержанием кислорода в атмосфере барокамеры и повышением давления (для поддержания парциального давления кислорода). Сравнение первой и второй экспериментальных серий выявило влияние повышения давления и снижения процента кислорода в атмосфере на состояние иммунитета испытуемых.

Известно, что при добавления аргона в дыхательную смесь наблюдается вазодилатация сосудов легких (De Giorgio D. et al 2021.). Аргон обладает антиишемическим, органопротекторным и антиапоптотическим эффектами (Nespoli F. et al, 2019). Добавление аргона в дыхательную смесь осуществлялось для того, чтобы снизить негативный эффект длительного нахождения в гипоксических условиях. Уменьшение содержания кислорода до 11,7–13,3 %, а тем более до 4,7–5,3 %, на наш взгляд, нельзя рассматривать в качестве нормоксии. Парциальное давление кислорода во всех трех экспериментальных сериях составляло 103–118 мм рт.ст. При этом не контролировалось парциальное давление кислорода в крови, из-за этого сложно судить, наблюдалось ли кислородное голодание в экспериментальных сериях. Субъективная оценка условий испытателями была затруднена, так

как нельзя исключать наркотический эффект, возникающий при дыхании аргон-содержащими смесями при повышенном давлении (Clark J. 2015). Этот эффект мог смягчить восприятие тяжести переносимых условий во время пребывания в барокамере.

Добавление аргона во время первой экспериментальной серии привело к увеличению гематокрита и содержания эритроцитов в крови. Снижение содержания кислорода до 4,7–5,3 % и повышение давления во время второй экспериментальной серии также привело к увеличению гематокрита и содержания эритроцитов. Сильная корреляция между этими показателями свидетельствует о роли стимуляции эритропоэза в увеличении гематокрита. Гипоксия является наиболее вероятной причиной этих изменений (Rasmussen P et al 2013). Другой потенциальной причиной могло быть снижение объема плазмы крови (Sawka M.N. et al 2000). Однако в таком случае содержание других клеток периферического кровотока изменялось бы схожим образом, тогда как в нашем исследовании содержание лейкоцитов не менялось во всех трех сериях экспериментов.

Ранним маркером активации врожденного иммунитета является увеличение экспрессии TLRs (Fitzgerald K.A. et al 2020). В ходе исследования оценивалось абсолютное и относительное содержание гранулоцитов и моноцитов, экспрессирующих TLR2, TLR4 и TLR6. Увеличение этих показателей были обнаружены через сутки после выхода из барокамеры во второй экспериментальной серии.

Вторая экспериментальная серия отличалась снижением содержания кислорода до 4,7–5,3 % при повышении избыточного давления. В связи с этим, потенциальными триггерами активации этого звена врожденного иммунитета были гипоксия и избыточное давление. Известно, что пребывание в барокамере с кислородно-азотно-аргоновой средой в нормоксических и гипоксических условиях приводит к увеличению содержания моноцитов и снижению содержания гранулоцитов (Рыкова М.П. и др., 2009). Дизайн процитированного исследования отличался от данного и не позволил провести оценку влияния аргона, гипоксии или гипербарии. При этом в исследовании Taylor C.T. et al было показано, что гипоксия посредством активации фактора HIF1 может увеличивать экспрессию TLR2 и TLR6 (Taylor C.T. et al 2017). В связи с этим, можно предположить, что во второй экспериментальной серии гипоксия привела к активации экспрессии по крайней мере TLR2 и TLR 6 моноцитами и гранулоцитами. Т-лимфоциты выполняют важную роль в организации гуморального и клеточного иммунитета. Было показано снижение содержания $CD3^+CD4^+$ - и $CD3^+CD8^+$ -Т-лимфоцитов через сутки после выхода из барокамеры во второй экспериментальной серии. Влияние аргона на состояние адаптивного иммунитета остается вплоть до настоящего момента малоизученным. Тогда как известно, что гипоксия может оказывать разнонаправленное

действие на соотношение популяций Т-лимфоцитов в зависимости от длительности экспозиции (Reina-Campos M. et al 2021). В исследованиях, сопоставимых по продолжительности воздействия гипоксии с нашим (от 8 ч до 30 дней), было обнаружено снижение содержания $CD4^{+}$ -, $CD3^{+}$ - и $CD8^{+}$ -Т-лимфоцитов (Zhang X., et al 2017). В связи с этим можно предположить, что ключевую роль в снижении содержания $CD3^{+}CD4^{+}$ - и $CD3^{+}CD8^{+}$ -Т-лимфоцитов в настоящем эксперименте сыграло снижение содержания кислорода в барокамере до 4,7–5,3 %. Хотя нельзя исключить существование неизвестных до настоящего времени механизмов действия аргона, возникающих при повышении давления. Например эпигенетические изменения регуляции экспрессии генов, которые также могли бы привести к подобного рода изменениям.

Заключение

Таким образом, пребывание в барокамере в течение 6 дней с дыхательной смесью, содержащей 35–45 % аргона и 4,7–5,3 % кислорода при избыточном давлении 0,2 МПа (через сутки после выхода из барокамеры) привело к увеличению гематокрита и количества эритроцитов в крови, к увеличению содержания макрофагов и гранулоцитов, экспрессирующих TLR2, TLR4, TLR6, к снижению содержания $CD4^{+}$ - и $CD8^{+}$ -Т-лимфоцитов. Существенные изменения гематокрита и количества эритроцитов крови, а также известная роль гипоксии и HIF-1 в регуляции состояния клеток иммунной системы (Taylor C.T. et al 2017) свидетельствуют о том, что гипоксия является наиболее вероятным действующим фактором. Наблюдаемые изменения были непродолжительными (не отличались от фоновых значений уже через 8 дней после выхода из гермообъекта). Тем не менее можно предположить, что более длительное пребывание в гермообъекте с содержанием кислорода в среднем 5 % и избыточным давлением 0,2 МПа может вызвать выраженный дисбаланс иммунной системы и снизить защитные резервы организма.

3.4. Молекулярно-клеточные процессы в иммунной системе человека во время моделирования эффектов микрогравитации и искусственной силы тяжести

3.4.1. Эксперимент с созданием ИСТ в течение часа при помощи центрифуги короткого радиуса

Искусственная сила тяжести, генерируемая при помощи ЦКР, является одним из перспективных средств профилактики действия микрогравитации на организм человека. В проведённых экспериментах ставилась задача оценить, каким образом ИСТ, генерируемая при помощи ЦКР, может оказать влияние на систему иммунитета человека.

В ходе проведенного исследования оценивались показатели клеточного иммунитета человека до и после вращения на ЦКР в различных режимах. До вращений (фоновое обследование), а также после завершения каждого из трёх режимов вращений на центрифуге, в

периферической крови испытуемых-добровольцев оценивалось относительное содержание основных субпопуляций эффекторных клеток системы естественной резистентности (NK-лимфоциты, а также гранулоциты и моноциты, экспрессирующие на своей поверхности рецепторы комплемента III типа и TLR 2, 4 и 6). В ходе исследования была проведена оценка содержания клеток адаптивного иммунитета (хелперные Т-лимфоциты (CD4), цитотоксические Т-лимфоциты (CD8) и В-лимфоциты (CD19) иммунитета в определённом пуле клеток (моноциты, гранулоциты, лимфоциты).

В результате проведённых исследований было установлено, что вращение в режимах 1 и 3 не оказывало существенного воздействия на содержание субпопуляций моноцитов. Однако после завершения вращения испытуемых-добровольцев в режиме 2 наблюдалось значимое снижение числа моноцитов, экспрессирующих на своей мембране TLR6 (показатель медианы составил 24,2% по сравнению с фоновым значением 58,7%, $p < 0,05$). Остальные исследуемые показатели моноцитов достоверно не изменялись (таблица 32).

Таблица 33. Показатели субпопуляционного состава моноцитов периферической крови испытуемых-добровольцев после вращения на ЦКР в различных режимах, Ме (Q25-Q75)

Режимы вращения ЦКР	Исследуемые показатели				
	CD14 ⁺ TLR2 ⁺ моноциты, %	CD14 ⁺ TLR4 ⁺ моноциты, %	CD14 ⁺ TLR6 ⁺ моноциты, %	CD14 ⁺ CD16 ⁺⁺ моноциты, %	CD11b ⁺ CD18 ⁺ моноциты, %
Фон	92,1 (89,5-94,7)	70,6 (58,7-89,0)	58,7 (25,3-63,3)	14,4 (9,7-19,1)	70,8 (31,2-94,4)
Режим 1	89,4 (86,8-95,8)	51,5 (36,1-93,8)	38,9 (6,4-46,5)	18,2 (8,8-26,5)	63,7 (21,3-93,8)
Режим 2	88,9 (83,3-92,1)	69,5 (39,4-85,3)	24,2* (12,4-32,0)	16,5 (8,6-25,1)	65,0 (20,6-92,1)
Режим 3	88,1 (78,7-89,1)	76,3 (49,8-86,5)	57,6 (44,6-63,0)	33,4 (12,5-38,4)	26,5 (11,0-94,8)

Как и в случае моноцитов, вращение на ЦКР в режимах 1 и 3 не вызывали достоверных изменений исследуемых показателей на гранулоцитах периферической крови. Вращение ЦКР в режиме 2 приводило к значимому снижению относительного числа TLR2⁺ гранулоцитов с 98,8% (медиана на фоне) до 94,5% (медиана после вращения на ЦКР во втором режиме, $p < 0,05$). Достоверных различий в остальных трёх исследуемых гранулоцитарных субпопуляциях обнаружено не было (таблица 33).

Таблица 34. Показатели субпопуляционного состава гранулоцитов периферической крови испытуемых-добровольцев после вращения на ЦКР в различных режимах, Ме (Q25-Q75)

Режимы вращения ЦКР	Исследуемые показатели			
	TLR2 ⁺ гранулоциты, %	TLR4 ⁺ гранулоциты, %	TLR6 ⁺ гранулоциты, %	CD11b ⁺ CD18 ⁺ гранулоциты, %
Фон	98,8 (95,9-99,4)	25,8 (18,4-39,9)	9,4 (5,2-29,2)	76,4 (20,5-99,8)
Режим 1	96,7 (87,1-99,1)	5,8 (5,0-71,1)	2,1 (0,8-42,0)	72,6 (39,1-99,7)
Режим 2	94,5* (81,9-98,1)	10,9 (3,6-37,0)	3,5 (1,6-10,7)	60,3 (10,6-99,8)
Режим 3	97,9 (87,6-98,3)	23,1 (8,8-49,7)	20,9 (2,9-32,5)	30,1 (8,5-98,7)

* - достоверное различие с фоном ($p < 0,05$).

Проведённый анализ содержания в периферической крови испытуемых-добровольцев клеточных элементов системы естественной цитотоксичности, а также приобретённого иммунитета показали, что после завершения вращения на ЦКР в первом режиме наблюдалось значимое снижение относительного количества естественных киллеров (CD3⁻CD16⁺CD56⁺), величина медианы которых составила 8,1% по сравнению с фоном (9,9%), $p < 0,05$. При этом не наблюдалось существенных изменений содержания в периферической крови цитотоксических лимфоцитов, В- и Т-клеток. Вращение на ЦКР в режимах 2 и 3 не вызывало достоверных изменений ни одной из анализируемых популяций клеток адаптивного звена иммунитета (таблица 34).

Таблица 35. Показатели субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови испытуемых-добровольцев после вращения на ЦКР в различных режимах, Ме (Q25-Q75)

Режимы вращения ЦКР	Исследуемые показатели			
	Th, % (CD3 ⁺ CD4 ⁺)	CTL, % (CD3 ⁺ CD8 ⁺)	B, % (CD3 ⁻ CD19 ⁺)	NK, % (CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺)
Фон	46,6 (37,8-50,9)	24,0 (21,4-43,9)	9,7 (8,1-13,6)	9,9 (7,2-14,5)
Режим 1	45,8 (40,5-52,2)	22,2 (19,5-37,1)	13,0 (9,5-16,7)	8,1* (5,9-10,5)
Режим 2	42,6 (40,3-48,1)	23,2 (16,0-30,0)	11,6 (8,9-14,8)	8,9 (5,5-18,1)
Режим 3	39,0 (35,9-49,9)	26,4 (19,2-41,6)	10,0 (6,6-17,7)	11,9 (9,9-14,7)

* - достоверное различие с фоном ($p < 0,05$).

Обсуждение результатов

Как было отмечено ранее, искусственная гравитация, создаваемая при помощи ЦКР, является перспективным средством профилактики негативных изменений состояния ряда систем организма, вызванных условиями невесомости во время космического полёта. В

настоящее время остаётся открытым вопрос подбора оптимального режима вращения на ЦКР с точки зрения минимизации негативных эффектов для организма (Орлов О.И. с соавт. 2017), в частности, для системы иммунитета. С целью оценки направленности и степени выраженности изменений показателей, характеризующих состояние иммунной системы человека, был подобран ряд показателей клеточного иммунитета до и после завершения различных вариантов вращения на ЦКР.

В субпопуляциях моноцитов и гранулоцитов периферической крови оценивалось относительное содержание клеток, экспрессирующих на своей мембране рецепторов комплемента III типа и TLR 2, 4 и 6. Помимо этого, в пуле моноцитов определялось содержание так называемых неклассических моноцитов, с фенотипом $CD14^+CD16^{++}$, составляющих от 2 до 11% общего числа циркулирующих в крови моноцитов. Данные моноциты секретируют провоспалительные цитокины в ответ на попадание инфекционных агентов, а также участвуют в процессах презентации антигенов и стимуляции Т-клеток (Kumar V et al 2019). Клетки, экспрессирующие на своей поверхности рецепторы системы комплемента III типа, имеют фенотип $CD11b^+CD18^+$. Трансмембранный интегрин $CD11b$ нековалентно связывается с интегрином $\beta 2$ ($CD18$), образовавшийся комплекс играет чрезвычайно важную роль в трансэндотелиальной миграции нейтрофилов и моноцитов с целью осуществления ими эффекторных функций, в первую очередь, фагоцитоза (Silvestre-Roig C et al 2019).

TLR, как было отмечено ранее, являются важнейшими рецепторами в реализации иммунного ответа. После вращения на ЦКР в режиме 2 наблюдалось снижение относительного содержания моноцитов с фенотипом $CD14TLR6$ и гранулоцитов, экспрессирующих TLR2. Подобные изменения в системе естественной резистентности могут свидетельствовать об ослаблении иммунной защиты по отношению к грамположительным бактериям и грибковым инфекциям (Takeda et al 2015). На остальные показатели врождённого иммунитета в популяции моноцитов и гранулоцитов данный режим не оказывал существенного влияния. Следует подчеркнуть, что режимы вращения на ЦКР 1 и 3 не оказывали значимого действия ни на один из рассматриваемых показателей, характеризующих состояние моноцитов и гранулоцитов. В связи с этим можно сделать вывод о том, что ИСТ не оказывала существенного влияния на исследованные показатели системы врождённого иммунитета.

В гейте лимфоцитов оценивалось процентное содержание естественных киллеров, а также В-лимфоцитов, цитотоксических Т-лимфоцитов и Т-хелперов.

В ходе проведённого исследования было показано, что вращение на ЦКР в первом режиме приводило к снижению относительного количества НК-лимфоцитов, что может говорить о негативном влиянии данного режима вращения на функцию НК в поддержании

противоопухолевого и противовирусного иммунитета. Полученные в ходе выполнения эксперимента данные согласуются с полученными ранее результатами о снижении процентного содержания НК-клеток в периферической крови участников девятисуточной изоляции в гермообъекте с искусственной средой обитания и вращения на ЦКР (Пономарёв С.А и др. 2017). Стоит отметить, что 2 и 3 режимы не привели к снижению относительного содержания числа НК-клеток. Кроме того, все три режима вращения не приводили к значимым изменениям в остальных субпопуляциях лимфоцитов, что, в целом, свидетельствует в пользу незначительного влияния искусственной гравитации в заданных режимах вращения на лимфоцитарный пул.

Обращает на себя внимание тот факт, что третий режим вращения не приводил к значимым изменениям ни одного из изученных в настоящей работе показателей врождённого и адаптивного иммунитета.

Для более детального понимания того, каким образом искусственная гравитация, генерируемая при помощи ЦКР, влияет на иммунную систему человека был проведён дополнительный эксперимент с участием шести здоровых испытуемых-добровольцев, лиц мужского пола, прошедших медицинский отбор с расширением изучаемых параметров. В эксперименте был изучен ряд показателей, характеризующих состояние клеточного звена адаптивного иммунитета (общее и процентное содержание в периферической крови всей популяции Т-лимфоцитов (CD3), цитотоксических лимфоцитов (CD3CD8), НК-клеток (CD3⁻CD16⁺CD56⁺), NKT-клеток (CD3⁺CD16⁺CD56⁺) Т-хелперов (CD3CD4), а также врождённого иммунитета (содержание моноцитов, экспрессирующих TLRs с поверхностной (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6) и внутриклеточной (TLR3, TLR8, TLR9) локализацией. В ходе проведённого исследования в 24-часовых культурах *in vitro* была изучена экспрессия указанных выше TLR при стимуляции TLR коктейлем соответствующих каждому рецептору лигандов, отражающих способность системы естественной резистентности отвечать на действие различного рода патогенов. Кроме того, был изучен каскад генов (всего более 80, подробный перечень изученных генов приведён в разделе “материалы и методы”) проводящих путей TLR моноцитов периферической крови и стимулированных соответствующими лигандами в 24-часовых культурах.

В ходе проведённого эксперимента было показано, что вращение на ЦКР в течение часа в заданном режиме практически не оказывает никакого влияния на состояние как врождённого, так и адаптивного иммунитета человека по изученным параметрам (таблицы 35 А, Б 36А, Б, В).

Таблица 36 А. Субпопуляции лимфоцитов периферической крови испытуемых-добровольцев до и после вращения на ЦКР (абсолютные значения, кл/л). Данные представлены в виде Ме (Q25, Q75).

	CD3 ⁺	CD3 ⁺ CD4 ⁺	CD3 ⁺ CD8 ⁺	CD3 ⁺ CD19 ⁺	CD3 ⁻ CD16 ⁺ 56 ⁺	CD3 ⁺ CD16 ⁻ 56 ⁺
Фон - до вращения	1,11 (0,92-1,56)	0,64 (0,59-0,70)	0,43 (0,29-0,82)	0,17 (0,15-0,21)	0,19 (0,17-0,23)	0,08 (0,07-0,11)
Сразу после вращения	1,16 (0,81-1,41)	0,61 (0,52-0,70)	0,44 (0,25-0,8)	0,17 (0,16-0,20)	0,15 (0,1-0,19)	0,07 (0,04-0,15)
Через 1 час после вращения	1,09 (0,84-1,28)	0,61 (0,53-0,68)	0,47 (0,29-0,58)	0,19 (0,14-0,25)	0,14 (0,11-0,18)	0,07 (0,04-0,12)

Таблица 36 Б. Субпопуляции лимфоцитов (%) периферической крови испытуемых-добровольцев до и после вращения на ЦКР. Данные представлены в виде Ме (Q25, Q75).

	CD3 ⁺	CD3 ⁺ CD4 ⁺	CD3 ⁺ CD8 ⁺	CD3 ⁺ CD19 ⁺	CD3 ⁻ CD16 ⁺ 56 ⁺	CD3 ⁺ CD16 ⁻ 56 ⁺
Фон - до вращения	73 (68-80)	39,5 (34,3-41,8)	27,5 (21,3-42)	13 (8,5-13)	12 (11,3-16,5)	6 (5,3-6,8)
Сразу после вращения	74 (69-81)	39,5 (32-44,8)	27,5 (21-46)	14,5 (9,3-16)	10 (8,3-12,5)	5,5 (3-6,8)
Через 1 час после вращения	74 (72-79)	38,5 (34-47,5)	27 (20,3-36)	15,5 (12-16)	10 (9,3-10,8)	5,8 (2,5-7,5)

Таблица 37А – Количество моноцитов, экспрессирующих определенный TLR (% от количества CD14⁺ клеток периферической **крови**) испытуемых-добровольцев до и после вращения на ЦКР. Данные представлены в виде Ме (Q25, Q75).

	TLR1, %	TLR2, %	TLR3, %	TLR4, %	TLR5, %	TLR6, %	TLR8, %	TLR9, %
Фон - до вращения	0,7 (0,4-1,1)	88,9 (79,4-98,5)	9,4 (4,5-38,5)	0,9 (0,4-1,1)	3,3 (1,4-67,7)	53,2 (38,3-74,0)	5,3 (0,6-14,3)	1,4 (0,5-16,6)
Сразу после вращения	0,5 (0,3-0,8)	91,8 (85,9-97,6)	5,2 (2,5-13,4)	0,8 (0,4-1,1)	8,5 (1,2-14,5)	54,9 (45,7-64,9)	0,4 (0,1-1,6)	0,4 (0,3-0,8)
Через 1 час после вращения	0,5 (0,3-0,7)	93,3 (82,0-98,2)	19,1 (7,8-31,1)	0,9 (0,6-1,3)	4,2 (0,9-19,0)	48,0 (31,7-61,0)	2,6 (0,8-3,9)	1,5 (0,6-13,6)

Таблица 37Б. – Абсолютное количество моноцитов, экспрессирующих определенный TLR (число клеток в микролитре периферической **крови**) испытуемых-добровольцев до и после вращения на ЦКР. Данные представлены в виде Ме (Q25, Q75).

	TLR1, кл/мкл	TLR2, кл/мкл	TLR3, кл/мкл	TLR4, кл/мкл	TLR5, кл/мкл	TLR6, кл/мкл	TLR8, кл/мкл	TLR9, кл/мкл
Фон - до вращения	2,9 (1,7-3,8)	325,0 (272,5-344,2)	31,2 (17,8-102,2)	2,7 (1,7-4,6)	14,3 (5,9-199,5)	193,2 (173,2-237,6)	14,7 (2,1-46,7)	4,6 (1,7-61,0)

Сразу после вращения	2,2 (0,8-3,3)	321,7 (306,0-366,7)	15,6 (10,1-50,5)	2,4 (1,3-5,0)	33,4 (3,8-66,9)	204,2 (151,9-244,8)	1,4 (0,5-5,5)	1,4 (1,2-2,5)
Через 1 час после вращения	1,8 (1,0-2,4)	336,3 (243,8-394,8)	58,7 (42,5-101,5)	3,2 (2,5-5,0)	16,8 (2,3-69,7)	140,4 (104,8-182,7)	8,1 (1,7-24,2)	8,9 (2,2-46,3)

Таблица 37В. – Плотность экспрессии молекулярных комплексов определенных TLR на/в моноцитах периферической **крови** (отношение средней интенсивности флюоресценции в пробе с добавлением антитела против определенного TLR к средней интенсивности флюоресценции в пробе без добавления антитела против определенного TLR, безразмерная величина) испытуемых-добровольцев до и после вращения на ЦКР. Данные представлены в виде Ме (Q25, Q75).

	TLR1	TLR2	TLR3	TLR4	TLR5	TLR6	TLR8	TLR9
Фон - до вращения	1,0 (1,0-1,3)	3,4 (2,3-16,7)	1,6 (1,4-2,1)	1,1 (1,0-1,3)	1,2 (1,1-2,7)	2,1 (2,0-5,8)	1,2 (0,9-1,3)	1,1 (1,1-1,3)
Сразу после вращения	1,0 (1,0-1,1)	3,8 (2,9-4,4)	1,4 (1,3-1,6)	1,1 (1,0-1,1)	1,2 (1,2-1,3)	2,2 (2,0-2,5)	1,0 (0,8-1,2)	1,0 (0,8-1,1)
Через 1 час после вращения	1,0 (0,8-1,0)	3,4 (2,3-4,4)	1,8 (1,5-2,0)	1,0 (1,0-1,1)	1,2 (1,0-1,4)	2,1 (1,6-2,4)	1,2 (1,1-1,2)	1,2 (1,1-1,4)

Таблица 38 А. Доля моноцитов, экспрессирующих определенный TLR (% от всех клеток 24-часовой **CD14⁺-культуры**) испытуемых-добровольцев до и после вращения на ЦКР. Данные представлены в виде Ме (Q25, Q75).

	TLR1	TLR2	TLR3	TLR4	TLR5	TLR6	TLR8	TLR9
Фон - до вращения (контроль)	1,9 (1,4-2,4)	97,4 (93,5-99,0)	52,3 (44,9-66,2)	1,6 (1,2-3,3)	34,7 (15,9-76,4)	44,7 (15,3-50,7)	9,3 (0,3-44,1)	1,0 (0,8-3,3)
Фон - до вращения (опыт)	3,0 (1,7-4,3)	96,8 (94,4-98,8)	43,5 (34,4-52,8)	2,6 (1,3-75,9)	8,6 (2,2-55,2)	12,5 (4,5-77,8)	7,9 (0,9-52,8)	0,6 (0,4-1,4)
Сразу после вращения (контроль)	2,3 (1,2-27,4)	99,2 (98,5-99,8)	56,8 (48,3-72,3)	2,4 (1,9-75,6)	26,7 (20,1-77,5)	47,4 (23,1-87,7)	31,1 (0,7-82,6)	1,8 (0,3-3,5)
Сразу после вращения (опыт)	2,8 (1,6-4,4)	99,7 (90,9-100)	66,4 (57,8-75,4)	3,4 (2,0-66,8)	10,5 (1,7-28,3)	27,1* (9,4-85,0)	25,5* (1,3-64,2)	1,6 (0,5-3,1)
Через 1 час после вращения (контроль)	1,7 (1,1-3,7)	99,1 (98,4-99,6)	65,6 (49,9-71,1)	2,6 (2,0-75,7)	35,5 (17,2-61,1)	39,8 (36,7-82,3)	20,5 (0,7-80,3)	2,7 (0,2-6,5)

оль)								
Через 1 час после вращения (опыт)	3,8 (1,4-9,7)	99,5 (99,0-99,8)	46,9 (42,2-65,2)	3,6 (2,7-76,0)	43,3 (12,2-83,5)	15,5 (10,8-28,8)	13,0 (0,6-64,3)	1,0 (0,4-1,2)

* - $p < 0,05$ в сравнении с фоном.

Таблица 38Б. – Плотность экспрессии молекулярных комплексов определенных TLR на/в моноцит/макрофагах 24-часовых **CD14⁺-культур** (отношение средней интенсивности флюоресценции в пробе с добавлением антитела против определенного TLR к средней интенсивности флюоресценции в пробе без добавления антитела против определенного TLR, безразмерная величина) испытуемых до и после вращения на ЦКР. Данные представлены в виде Me (Q25, Q75).

	TLR1	TLR2	TLR3	TLR4	TLR5	TLR6	TLR8	TLR9
Фон - до вращения (контроль)	1,3 (1,3-1,5)	14,4 (10,7-19,0)	2,5 (2,3-2,9)	1,5 (1,3-1,6)	3,1 (2,6-3,4)	3,8 (2,4-5,5)	1,2 (1,1-2,2)	1,0 (0,9-1,2)
Фон - до вращения (опыт)	1,4 (1,3-1,6)	10,4 (7,9-16,6)	2,7 (2,1-3,2)	1,4 (1,4-32,0)	2,3 (1,5-3,0)	2,0 (1,6-7,3)	1,5 (1,3-1,9)	1,0 (1,0-1,1)
Сразу после вращения (контроль)	1,5 (1,4-3,0)	17,2 (13,2-26,4)	2,5 (2,1-3,1)	1,6 (1,5-15,0)	2,7 (2,5-3,4)	4,3 (2,8-12,4)	1,4 (1,0-2,5)	1,0 (0,9-1,2)
Сразу после вращения (опыт)	1,3 (1,3-1,5)	12,3 (8,3-24,3)	2,8 (2,5-3,3)	1,5 (1,4-8,2)	1,9 (1,6-2,4)	2,5* (1,9-12,5)	1,6 (1,3-2,0)	1,1 (1,0-1,2)
Через 1 час после вращения (контроль)	1,5 (1,4-1,6)	13,9 (12,9-20,3)	2,6 (2,3-2,7)	1,6 (1,5-15,5)	3,0 (2,9-3,1)	4,1 (3,2-10,0)	1,4 (1,1-2,3)	1,1 (1,0-1,3)
Через 1 час после вращения (опыт)	1,4 (1,4-2,0)	13,9* (10,7-19,9)	2,9 (2,4-3,0)	1,4 (1,4-39,1)	2,2 (1,7-7,5)	2,2 (2,0-2,3)	1,5 (1,2-1,8)	0,9 (0,9-1,0)

Как видно из таблицы 37 (А, Б), вращение на ЦКР приводит к достоверному увеличению относительного содержания моноцитов периферической крови, экспрессирующих TLR6 и TLR8, стимулированных соответствующими лигандами TLR. Кроме того показано значимое повышение содержания TLR6 сразу после завершения вращения в опытном (стимулированном) образце и TLR2 через час после завершения сеанса вращения на ЦКР. В остальных случаях достоверных отличий отмечено не было.

Достоверное увеличение экспрессии генов сигнальных путей TLR было показано для генов *TLR2* и *TLR8* сразу после завершения вращения с сохранением динамики в течение часа после окончания воздействия (рисунок 29). Одновременно с этим было отмечено снижение экспрессии генов *TNF-α* и увеличение экспрессии *TICAM1* сразу после окончания воздействия. Экспрессия *TNF-α* восстановилась до фоновых значений через час после вращения, в то время

как *TICAM1* оставалась повышенной на всём периоде наблюдения (рисунок 30).

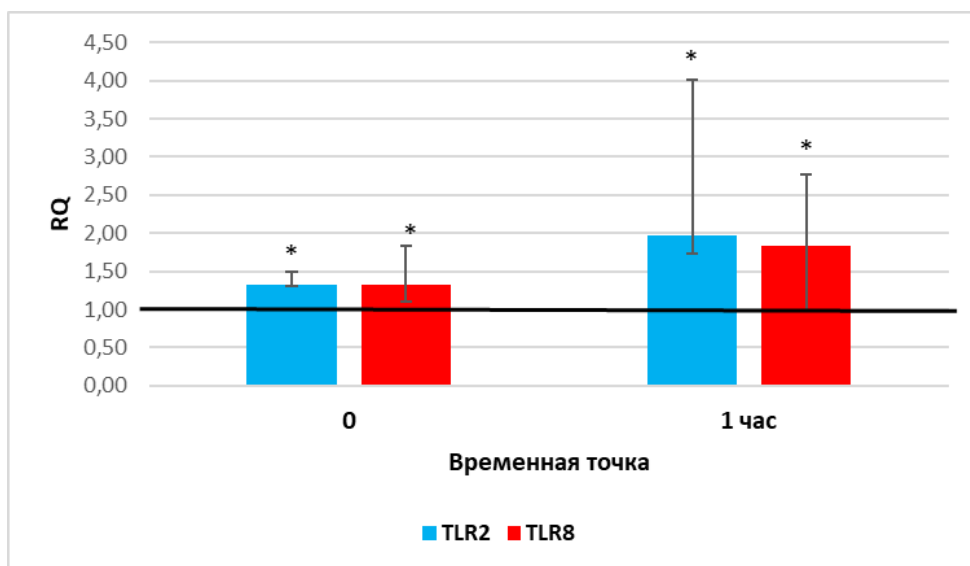


Рисунок 29. Динамика экспрессии генов *TLR2* и *TLR8* моноцитов периферической крови испытуемых-добровольцев до и после вращения на ЦКР. Данные представлены в виде Ме (Q25, Q75).

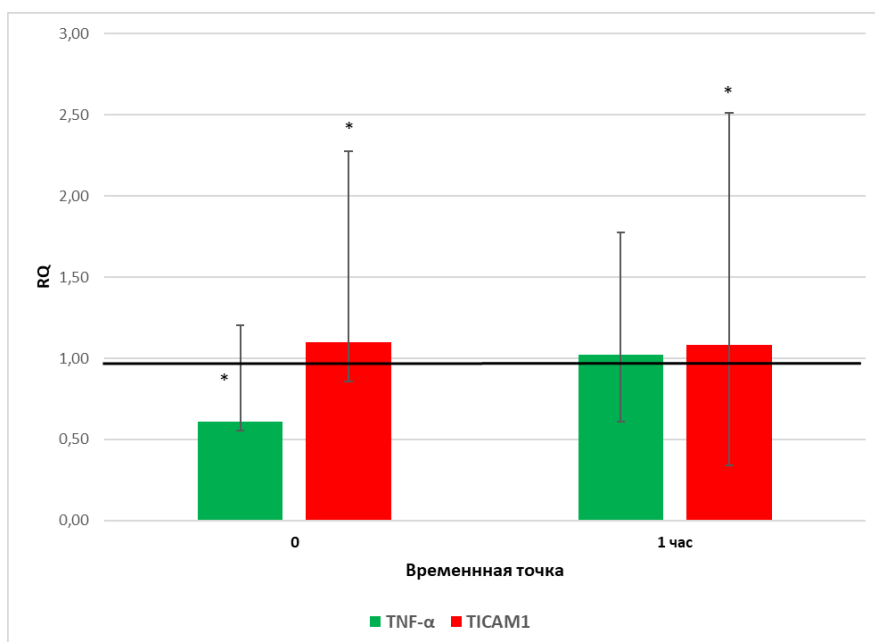


Рисунок 30. Динамика экспрессии генов *TNFα* и *TICAM1* моноцитов периферической крови испытуемых-добровольцев до и после вращения на ЦКР. Данные представлены в виде Ме (Q25, Q75).

Такая же динамика была характерна и для экспрессии генов *IL8* и *IL1β* (рисунок 31).

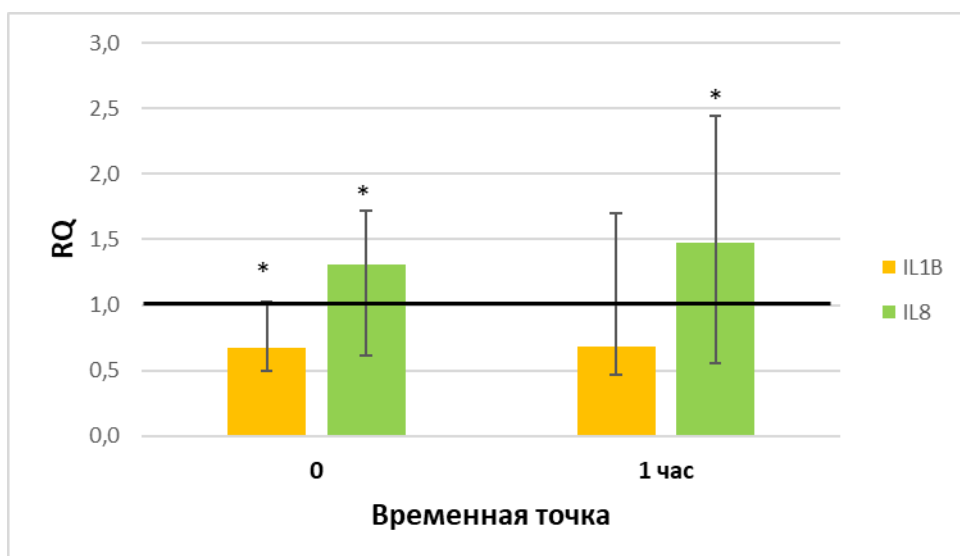


Рисунок 31. Динамика экспрессии генов *IL1b* и *IL8* моноцитов периферической крови испытуемых до и после вращения на ЦКР. Данные представлены в виде Ме (Q25, Q75).

Говоря о стимулированных коктейлем лигандов культивированных моноцитов, можно отметить достоверное повышение экспрессии генов *TLR1* и *TLR2* сразу после окончания вращения на ЦКР (рисунок 32)

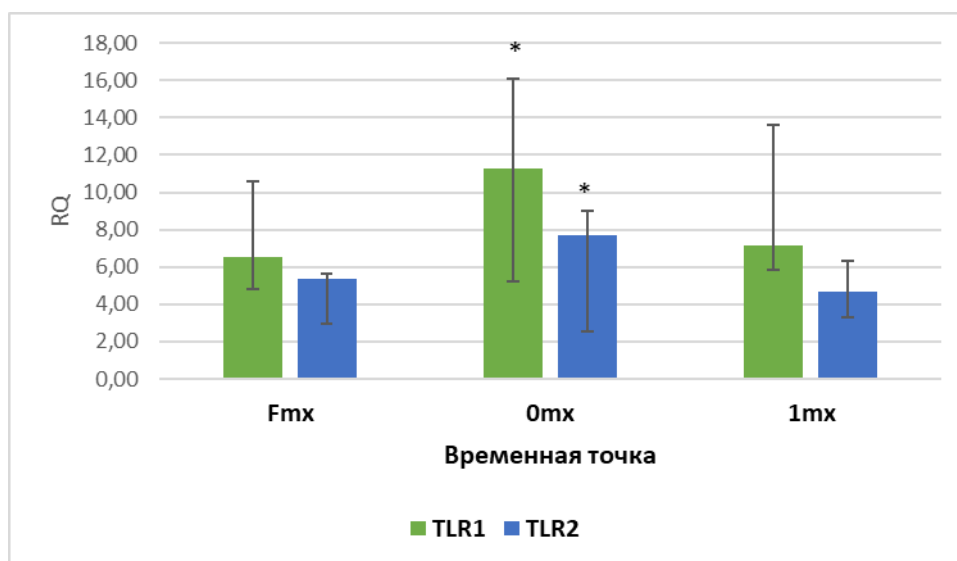


Рисунок 32. Динамика экспрессии генов *TLR1* и *TLR2* $CD14^+$ культур in vitro, стимулированных коктейлем лигандов до и после вращения на ЦКР. Данные представлены в виде Ме (Q25, Q75).

Вращение на ЦКР в течение часа в заданном режиме приводит также к достоверному снижению экспрессии генов *IL1 β* , *IL8* и *CCL2* в стимулированных коктейлем лигандов моноцитарных культур, причём снижение последнего наблюдалось и через час после воздействия (рисунок 33).

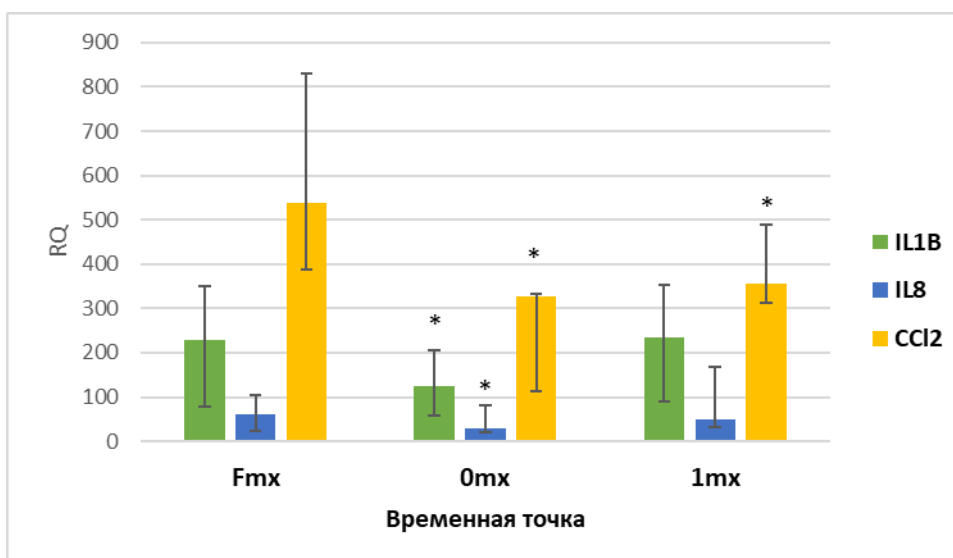


Рисунок 33. Динамика экспрессии генов *IL1B*, *IL8*, и *CCL2* $CD14^+$ культур in vitro, стимулированных коктейлем лигандов до и после вращения на ЦКР. Данные представлены в виде Me (Q25, Q75).

Заключение

В результате проведенного исследования после вращения на ЦКР в различных режимах было выявлено незначительное количество изменений в состоянии иммунной системы человека, причём все выявленные значимые изменения были характерны для показателей, характеризующих состояние врождённого иммунитета. В целом следует отметить, что искусственная гравитация, создаваемая при помощи ЦКР, практически не отражается на состоянии иммунной системы человека, что, с иммунологической точки зрения, позволяет рекомендовать ЦКР как средство профилактики действия микрогравитации.

3.4.2. Эксперимент с 21-суточной “сухой” иммерсией без средств профилактики

Одной из основных моделей, воспроизводящих эффекты реального КП, является “сухая иммерсия”. С целью установления влияния гиподинамии, условий безопроности, стресса и перераспределения жидкостных сред в организме человека на иммунную систему человека в 21-суточной СИ без средств профилактики была проведена комплексная оценка состояния системы иммунитета человека. В ходе эксперимента было показано, что динамика изменения уровня цитокинов в плазме крови имела выраженный индивидуальный характер. Из общих закономерностей следует отметить значимое повышение TNF- α , IL-12p70 и IFN- α на 14 сутки пребывания в условиях СИ (Рисунок 34 А, Б). Концентрация IFN- α достоверно превышала фоновые значения и на 21 сутки СИ (Рисунок 34Б). Интересно, что в отличие от TNF- α и IL-12p70, концентрация которых снижалась к 21 суткам эксперимента до фоновых значений, содержание IFN- α в плазме крови оставалось выше исходных величин, хотя следует отметить, что выявленное повышение не было статистически достоверным (Рисунок 34 Б). Концентрация

IL-10 в плазме крови снижалась на 7 сутки эксперимента по сравнению с фоновыми значениями и не отличалась от предэкспериментальных значений на 14 и 21 сутки СИ (Рисунок 34А). Концентрации других цитокинов не изменялись во время нахождения испытуемых в условиях СИ (таблица 38).

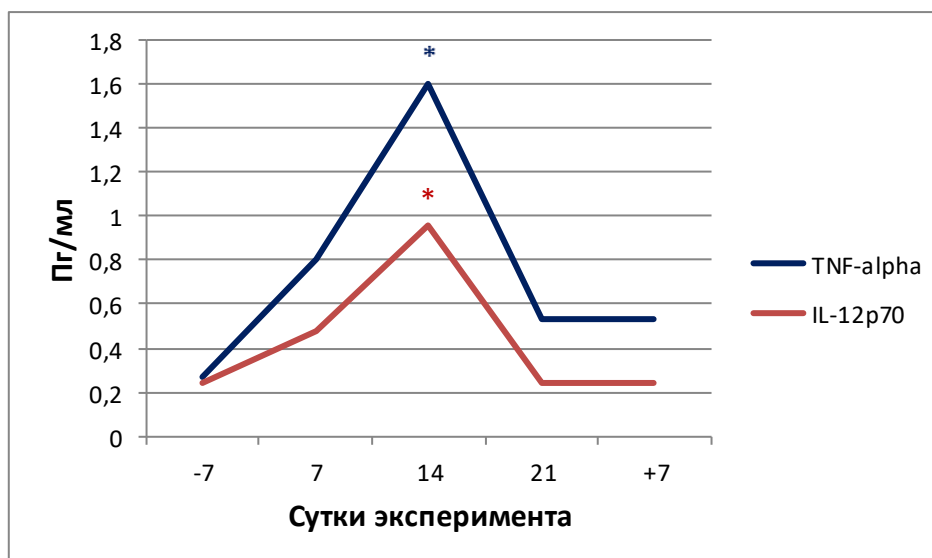


Рисунок 34 А. Изменение концентрации цитокинов TNF-alpha и IL-12p70 в плазме крови 10 добровольцев-испытателей до, во время и после пребывания в условиях 21-суточной “сухой” иммерсии без средств профилактики.

Условные обозначения: -7-фоновое исследование до эксперимента, 7,14, 21-исследование во время эксперимента, +7-исследование после завершения эксперимента.

*-достоверное различие с фоном ($p < 0.05$)

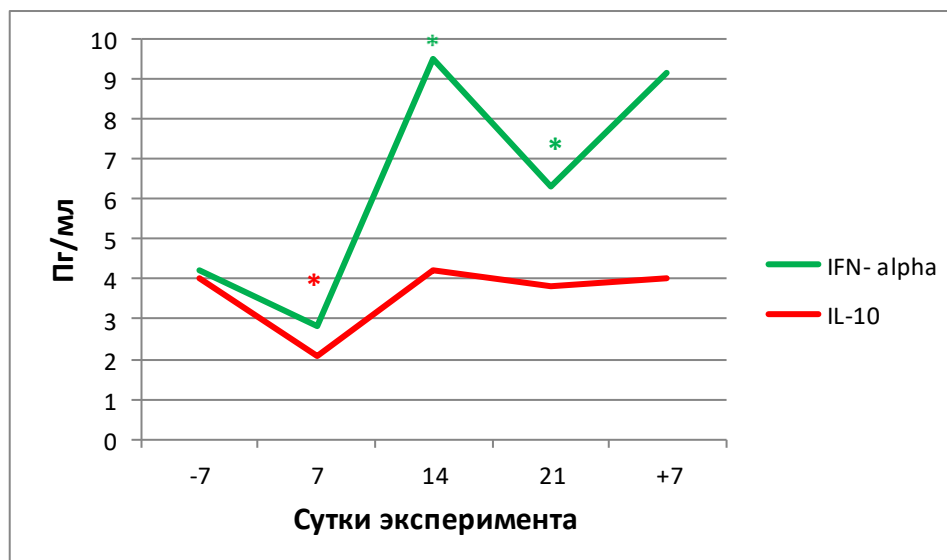


Рисунок 34 Б. Изменение концентрации цитокинов IFN-alpha и IL-10 в плазме крови 10 добровольцев-испытателей до, во время и после пребывания в условиях 21-суточной “сухой” иммерсии без средств профилактики.

Условные обозначения: -7-фоновое исследование до эксперимента, 7,14, 21-исследование во время эксперимента, +7-исследование после завершения эксперимента.

*-достоверное различие с фоном ($p < 0.05$)

Таблица 39. Динамика концентрации цитокинов в плазме крови 10 добровольцев-испытателей до, во время и после пребывания в условиях 21-суточной “сухой” иммерсии без средств профилактики. Данные приведены в виде медианы (ME), нижнего (q25) и верхнего квартилей (q75) Me(q25-q75).

Сутки эксперимента	Наименование цитокина			
	IL1-beta	IL-6	IL-8	IFN-gamma
-7 с	0,91(0,40-1,05)	1,60(1,23-1,83)	3,72(3,14-3,81)	3,71(1,14-3,93)
7 с	1,10(0,45-2,00)	0,85(0,65-1,64)	3,59(3,21-5,11)	2,57(2,27-4,57)
14 с	0,23(0,06-0,88)	1,40(0,77-4,10)	2,69(2,20-5,00)	2,29(1,60-6,36)
21 с	0,91(0,23-0,91)	1,40(0,56-1,61)	3,85(2,60-6,20)	4,79(3,79-5,86)
+7 с	0,91(0,71-2,93)	1,60(1,21-1,80)	3,97(1,20-5,80)	4,00(3,86-6,79)

Ключевая роль в регуляции системы иммунитета человека отводится Т-хелперному (Th) звену CD4⁺-лимфоцитов. Т-хелперы подразделяются на несколько субпопуляций, среди которых наиболее важными являются Th1 и Th2- лимфоциты. Th1 регулируют клеточный иммунитет, в то время как Th2 - гуморальный (Хайдуков С.В. и др. 2011). Th1 синтезируют IFN-gamma, IL-2, TNF-alpha, TNF-beta, IL-12. Эффекторным цитокином Th1 является IFN-gamma. Он активирует клеточный иммунитет, в первую очередь, направленный на борьбу с бактериями посредством фагоцитоза и выработки IgM, сопряженный с ингибированием синтеза IgG и IgE (Lee J et al 2021). Th2 продуцируют IL-4, IL-5, IL-10, IL-13. Главным эффекторным цитокином Th2 являются IL-10, он ингибирует дифференцировку CD4⁺-лимфоцитов в Th1 (Lee J et al 2021). При воздействии различных факторов баланс Th1/Th2 лимфоцитов может изменяться. Преобладание Th1-зависимого иммунного ответа приводит к развитию таких аутоиммунных заболеваний как рассеянный склероз, болезнь Крона, псориаз, ревматоидный артрит. Преобладание Th2-зависимого иммунного ответа приводит к развитию ряда аллергических заболеваний: аллергического дерматита, астмы, аллергического ринита (Lee J et al 2021, Shabrish S et al 2019). Для оценки баланса Th1/Th2 лимфоцитов используют

соотношение цитокинов IFN-gamma и IL-10 (Shabrish S et al 2019), что позволяет оценить смещение иммунного ответа в клеточную или гуморальную сторону.

Был показан сдвиг баланса Th1/Th2 в сторону усиления гуморального ответа на 14 сутки СИ. На 21 сутки СИ и через 7 дней после окончания эксперимента, показатель не отличался от фоновых значений (Рисунок 35). Выявленные нарушения Th1/Th2 баланса способны приводить к аллергическим проявлениям во время пребывания человека в условиях СИ.

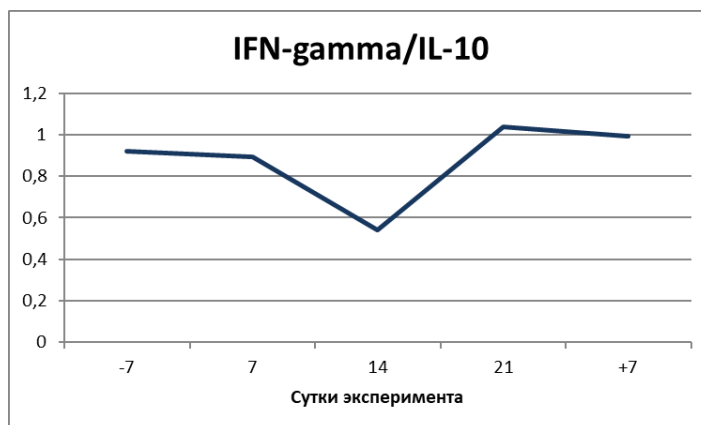


Рисунок 35. Баланс IFN-gamma/IL-10 в плазме крови у 10 добровольцев-испытателей до, во время и после пребывания в условиях 21-суточной “сухой” иммерсии без средств профилактики.

Условные обозначения: -7-фоновое исследование до эксперимента, 7,14, 21-исследование во время эксперимента, +7-исследование после завершения эксперимента.

Цитокины синтезируются не только клетками иммунной системы, но и фибробластами, клетками эндотелия и мышечной ткани (Gridley DS et al 2003). Это подчеркивает высокую степень интегрированности иммунной системы в гомеостатические процессы организма. Вырабатываемые клетками иммунной системы цитокины действуют на другие типы клеток, и наоборот, цитокины других типов клеток оказывают влияние на иммунитет. Таким образом, оценить вклад клеток иммунной системы в общее количество цитокинов в сыворотке крови не представляется возможным. Для оценки синтеза цитокинов клетками иммунной системы широко используется метод клеточных культур. Суть метода заключается в определении продукции цитокинов клеточными культурами в ответ на стимуляцию специфическими лигандами. Оценивалась способность CD14⁺-моноцитов синтезировать цитокины при стимуляции Toll-like рецепторов (TLRs) лигандами (таблица 2). В ходе анализа были выявлены некоторые общие закономерности. Во-первых, спонтанный синтез ряда цитокинов (IL-12, IL-8, IL-6, IL-1-beta, TNF-alpha) CD14⁺-моноцитами человека достоверно снижался на протяжении эксперимента (приложение 2). Эти данные свидетельствуют о том, что моноциты уже были активированы *in vivo*. Возможно, повлиял тот факт, что во время СИ испыталы находились в условиях карантина (контакты с экзогенной микрофлорой в значительной степени

сокращались), в то время как до СИ они находились в неконтролируемых условиях повседневной жизни и контактировал со значительным количеством антигенов. С другой стороны, для ряда цитокинов (IL-6, IL1-beta, IL-8) снижение наблюдалось уже за 2 суток до начала СИ. Для других цитокинов также наблюдалась тенденция к снижению спонтанной продукции цитокинов, хотя достоверными данные отличия не были. Различий между значениями, полученными за 2 дня до СИ, и значениями показателей, полученными во время СИ, обнаружено не было. Вероятно, имеет место быть влияние психологического стресса, связанного с ожиданием воздействия (Лебедева С.А. и др., 2019), на иммунную систему. Известно, что нейрогуморальные факторы могут оказывать существенное ингибирующее влияние на клеточный и гуморальный компоненты иммунитета (Buchheim J-I et al 2019). Снижение спонтанного синтеза ряда цитокинов во время СИ могло быть обусловлено как влиянием нейрогуморальных факторов, так и влиянием моделируемой микрогравитации на иммунную систему.

При стимуляции Toll-like рецепторов соответствующими лигандами были обнаружены интересные закономерности. Как и в случае спонтанного синтеза, была обнаружена индивидуальная вариабельность показателей. Было обнаружено снижение продукции цитокинов по сравнению фоновыми значениями, полученными за 7 дней до СИ. При стимуляции TLR4 и TLR5 не было обнаружено изменений продукции цитокинов. При этом, при стимуляции TLR2 наблюдалось изменение в продукции всех исследованных цитокинов (приложение 2).

Способность синтезировать цитокины является ключевым показателем, характеризующих состояние иммунной системы (Claus M et al 2015). В связи с этим можно предположить, что пребывание в условиях СИ оказывает негативное влияние на активационный потенциал моноцитов. Тем не менее, механизм влияния СИ на состояние моноцитов к настоящему моменту остаётся неизвестным.

Помимо продукции цитокинов, в эксперименте с 21 СИ без профилактики был изучен ряд генов, ассоциированных с функциональной активностью TLR.

Гены Toll-подобных рецепторов (TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR7, TLR8)

Было показано достоверное увеличение экспрессии генов TLR2 уже за двое суток до начала эксперимента со значимым снижением к 7-м суткам СИ, экспрессия TLR5 достоверно возрастала на 21-е сутки СИ, а динамика изменения экспрессии TLR8 имело разнонаправленную динамику в течение всего эксперимента: до 7х суток экспрессия снижалась, а после-значимо увеличивалась. Для генов остальных генов, кодирующих TLR достоверных изменений выявлено не было (рисунок 36).

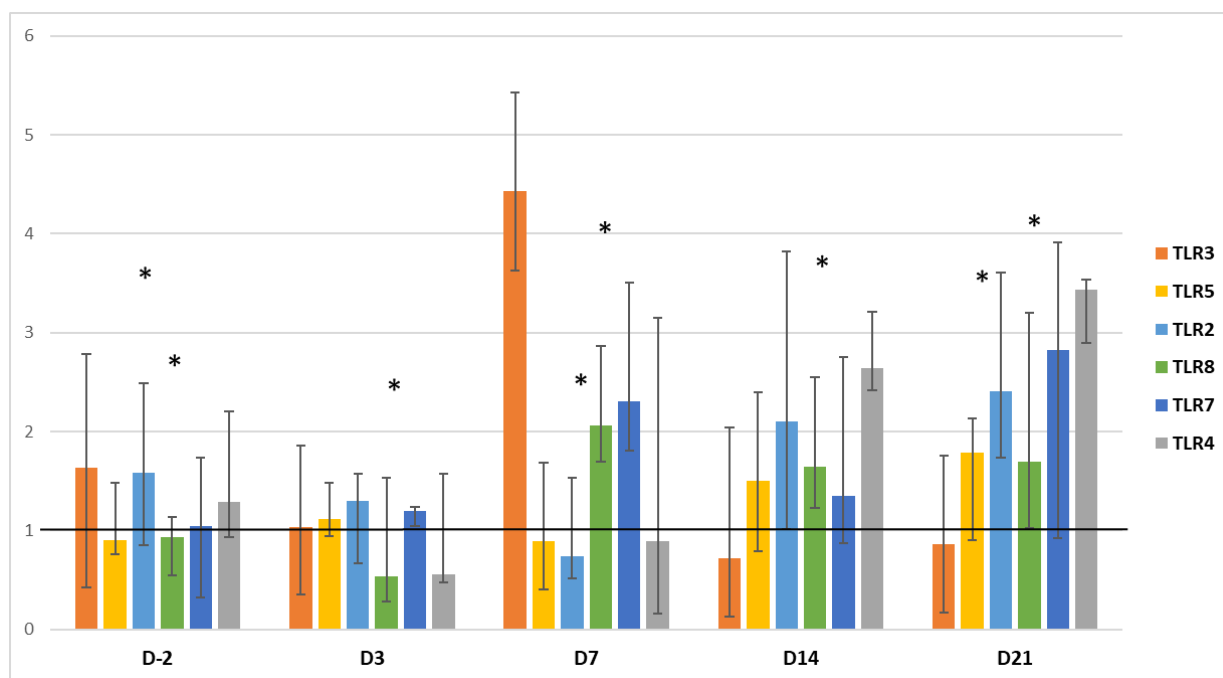


Рисунок 36 – Относительная экспрессия генов TLR (Me, Q25; Q75).

* – статистически достоверные отличия от фона ($p < 0.05$).

Гены TLR4-опосредованного пути (*FADD*, *HMGB1*, *MKK3,4*, *UBE2N*, *IRAK1*, *IRAK4*, *LY96*, *CASP8*, *MAPK13*, *TICAM1*, *TICAM2*, *CD14*, *C-FOS*, *MAP3K1*, *IFNG*)

После связывания TLR с лигандом передача внутриклеточного сигнала может осуществляться по MyD88-зависимому пути или по TRIF-зависимому пути. Первый механизм характерен для всех TLRs, кроме TLR3. Активация TLR4, в отличие от остальных TLRs, запускает MyD88-зависимый и TRIF-зависимый сигнальные каскады. В результате исследования экспрессии генов, ассоциированных с активацией MyD88-зависимого сигнального пути, было обнаружено увеличение экспрессии гена *TICAM2* на 3-и, 14-е и 21-е сутки пребывания в условиях СИ (рисунок 36). Известно, что *TICAM2* является ключевым фактором, участвующим в MyD88-зависимой передаче сигнала при активации TLR4 (Takeda K. et al 2015). Экспрессия гена *LY96* снижалась в два раза на 7-е сутки СИ. Этот ген кодирует адаптерный белок, без соединения с которым рецептор TLR4 не способен распознать свой главный лиганд – ЛПС (Takeda K et al 2015). Экспрессия гена *IRAK1* увеличивалась на 7-е сутки СИ в 2.5 раза и на 14-е сутки СИ в 5 раз. Экспрессия гена киназы *MKK3* достоверно снижалась на 3 сутки воздействия, а на 7-е, 14-е и 21-е значимо увеличивалась. (Рисунок 37). Выявленные изменения указывают на активацию TLR4-зависимых сигнальных каскадов на транскрипционном уровне.

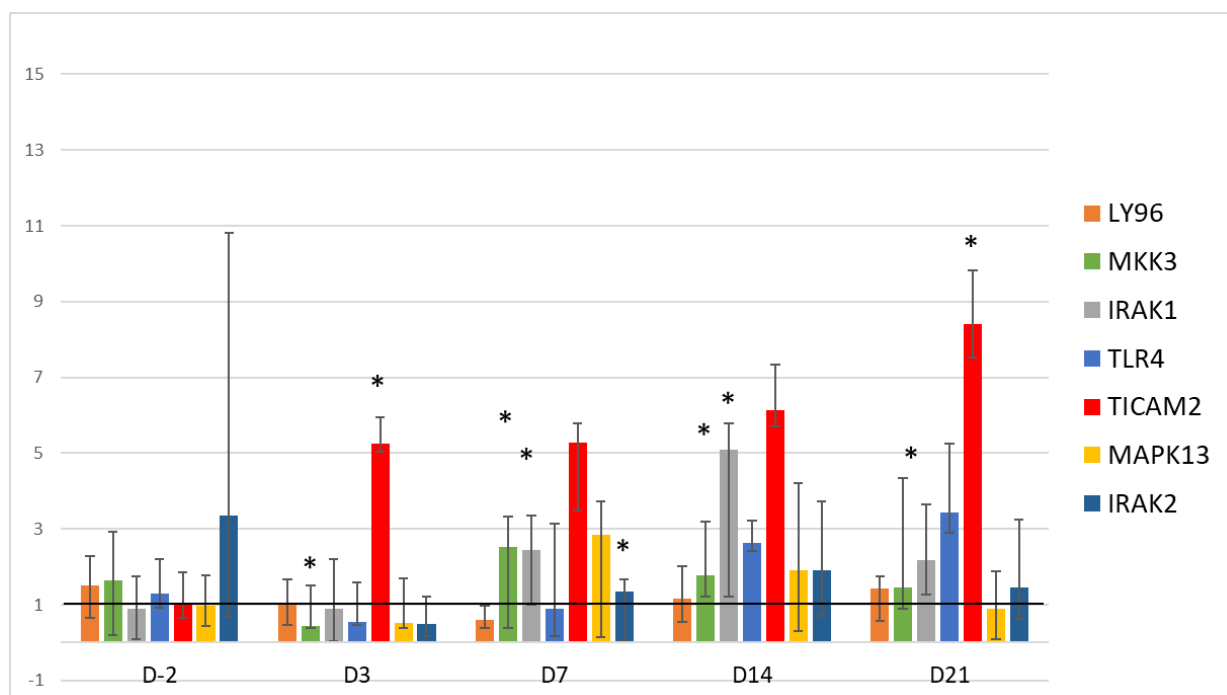


Рисунок 37– Относительная экспрессия генов TLR4-опосредованного пути (Me, Q25; Q75).

* – статистически достоверные отличия от фона ($p < 0.05$).

Гены Nf- κ B- (*TRAF6*, *TAB1*, *NFKBIA*, *CHUK* (*IKKA*)) и AP-1 сигнальных путей (*MKK*, *TAK1*, *C-FOS*, *MAPK13*)

MyD88-зависимый и TRIF-зависимый сигнальные каскады приводят к активированию Nf- κ B сигнальный путь. Таким образом, Nf- κ B сигнальный каскад можно считать TLR4-зависимым. Этот каскад включает семейство высоко консервативных транскрипционных факторов, кодируемых генами *NF- κ B1* (p50/p105), *NF- κ B2* (p52/p100), *RelA* (p65), *c-Rel* и *Rel β* . Эти транскрипционные факторы регулируют клеточный рост, воспалительный процесс и апоптоз. Основная функция данного пути, на наш взгляд, это регуляция апоптоза. В частности, при аденовирусной инфекции активация Nf- κ B запускает апоптоз, а в случае HIV, EBV и гепатита C активация Nf- κ B предотвращает апоптотическую реакцию (Wong LM et al 2021).

Были обнаружены изменения экспрессии гена *NFKB1 α* , относящегося к сигнальному каскаду Nf- κ B. Экспрессия гена снижалась на 3-и сутки СИ в 5 раз и достоверно не отличалась от фоновых значений на последующих точках до конца эксперимента. Ранее было показано снижение экспрессии *NFKB1A* в культурах клеток, подвергающихся воздействию реального космического полёта (Берендеева Т.А. и др., 2015). Экспрессия генов *TRAF6* и *TAB1* (рисунок 38) увеличивалась на 7 сутки СИ. Экспрессия *TRAF6* оставалась повышенной вплоть до конца эксперимента, тогда как экспрессия *TAB1* уже начиная с 14 суток СИ не отличалась от фоновых значений (рисунок 38).

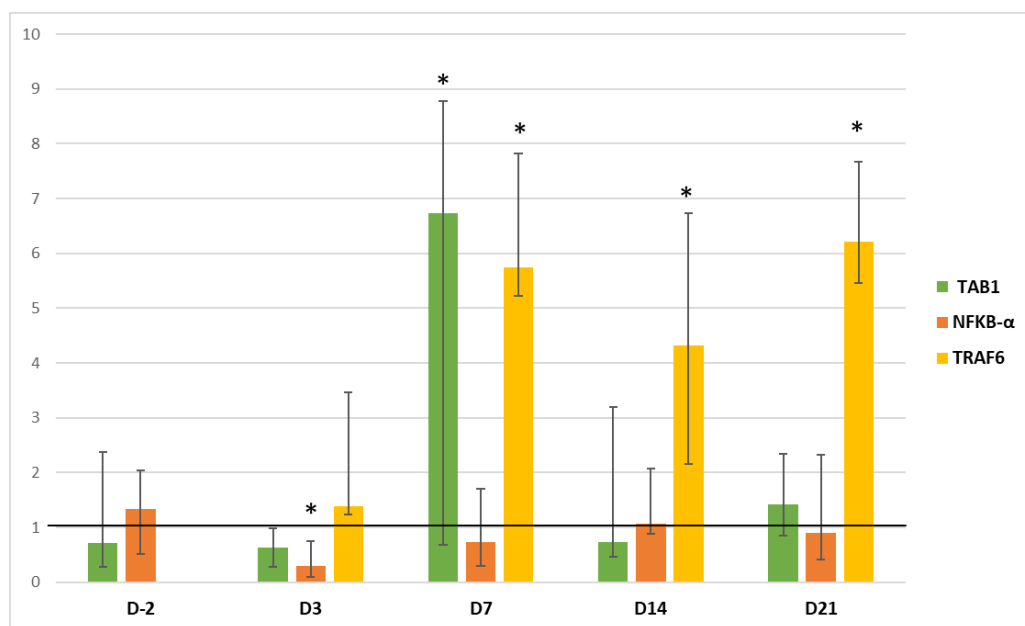


Рисунок 38– Относительная экспрессия генов Гены $\text{Nf-k}\beta$ - и AP-1сигнальных путей (Me, Q25; Q75).

* – статистически достоверные отличия от фона ($p < 0.05$).

Гены интерлейкинов, цитокинов, хемокинов (*IL10*, *IL6*, *IL12A*, *IL1A*, *IL8*, *IL1B*, *CCL2*, *CXCL10*, *CSF3*, *BTk*). Akt1/PKB регулирует экспрессию интерлейкинов и хемокинов, которые участвуют в процессах развития воспаления, а также его предотвращения. Было обнаружено пятикратное снижение экспрессии *IL12A* на 7-е сутки СИ и снижение экспрессии в 1,6 раза на 14 сутки СИ. Экспрессия *IL6* достаточно снижалась в 5 раз на 3-и и 7-е сутки СИ. Ранее в исследовании с моделированием микрогравитации с использованием Rotary Wall Vessel (RWV) в клеточных культурах не было обнаружено изменений секреции IL6 (Ludtka C et al 2021), в то время как космический полёт приводил к увеличению экспрессии *IL6* (Берендеева и др. 2015). Кроме того, было показано, что после СИ в культуре стимулированных лигандами TLR моноцитов наблюдается снижение секреции как IL12, так и IL6 (Пономарёв и др.. 2020).

Было показано достоверное увеличение экспрессии *IL10* на за 2 суток до начала воздействия, а также 3, 7, 14 и 21 сутки СИ. Эти данные согласуются с работой, в которой было обнаружено увеличение синтеза и секреции IL10 в активированных макрофагах при моделировании микрогравитации с помощью RWV (Ludtka et al 2021).

Экспрессия *IL8* увеличивалась за 2 суток до начала воздействия, а затем снижалась в пять раз на 3-и и 7-е сутки и увеличивалась на 14-е и 21-е сутки СИ. Эти данные согласуются с ранее опубликованной работой, в которой было обнаружено снижение экспрессии *IL8* (при одновременном снижении секреции соответствующих белков) при моделировании эффектов

микрографитации с использованием машины случайного позиционирования, и во время космического полёта (Ludtka et al 2021, Берендеева и др. 2015) (рисунок 39А).

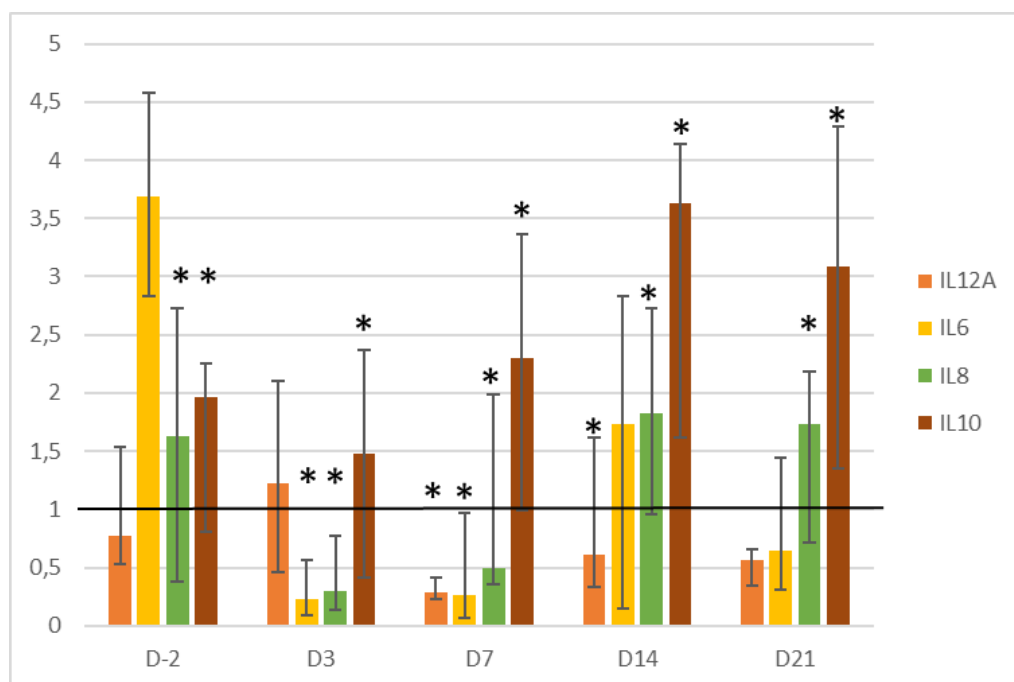


Рисунок 39А –относительная экспрессия генов Akt-сигнального пути (Me, Q25, Q75);
* – статистически достоверные отличия от фона ($p < 0.05$).

Экспрессия гена *IL1 α* возрастала на 21 сутки СИ, *CCL2*-в 3 раза снижалась на 3-и, 7-е сутки СИ а на 14-и 21 достоверно повышалась в несколько десятков раз. Экспрессия *CXCL10* достоверно возрастала на 14 и 21 сутки СИ, а *IL1 β* снижалась на седьмые сутки с достоверным увеличением к 14-м и 21-м суткам экспериментального воздействия (рисунок 39Б).

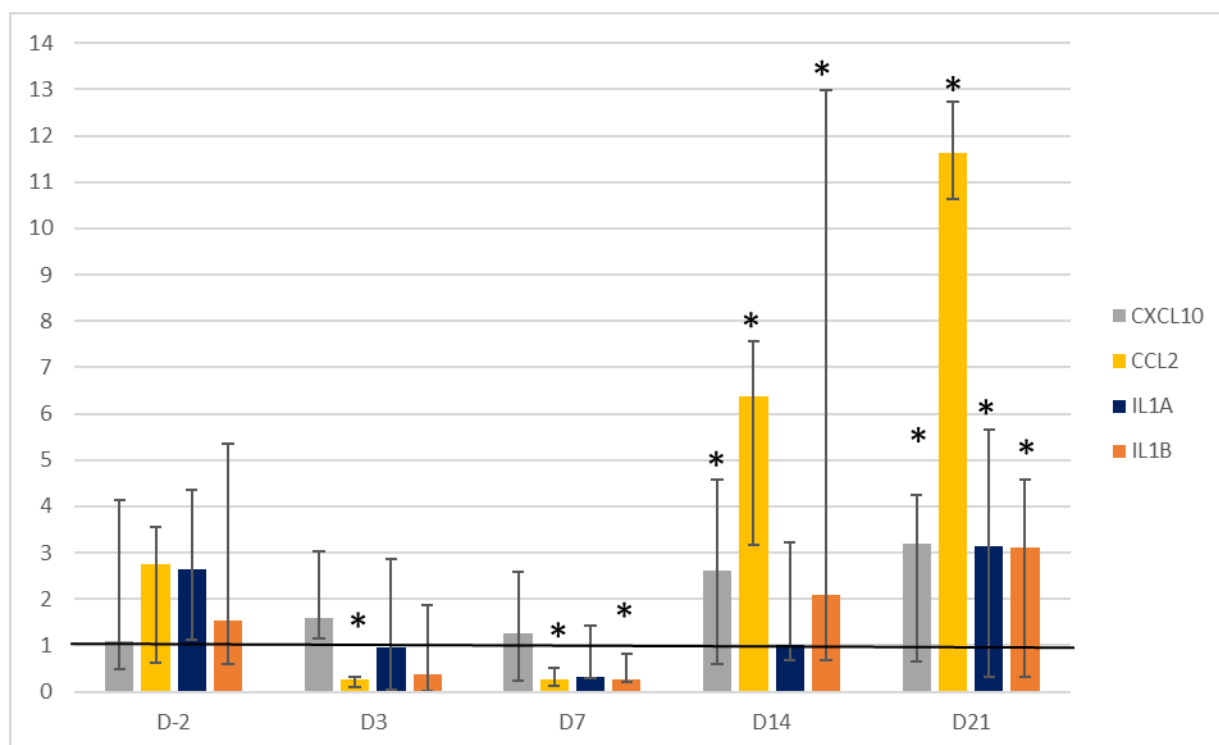


Рисунок 39Б –относительная экспрессия генов Akt-сигнального пути (Me, Q25, Q75);
* – статистически достоверные отличия от фона ($p < 0.05$).

Гены апоптоза (*FADD*, *CASP8*)

Известно, что связывание микобактериального трегалозо-6,6'-димиколата (TDM) с *CLEACE* приводит к фосфорилированию FCER1G. Результатом этого является активация SYK, CARD9 и NF-каппа-B и последующие созревание антигенпрезентирующих клеток и дифференцировка наивных Т-клеток в Т-хелперы 1 и 17 типов (Lee J et al 2021). Экспрессия генов *FADD* и *CASP8* достоверно не изменялась на протяжении эксперимента. При стимулировании моноцитарных культур коктейлем соответствующих лигандов наблюдалось ожидаемое увеличение экспрессии всех генов сигнального каскада TLR, при этом статистически значимые различия были характерны для малого количества исследованных генов. Было показано достоверное увеличение экспрессии *TLR3* на 3-и сутки СИ с достоверным снижением к 21 суткам эксперимента. Экспрессия *TLR2* значимо повышалась на 21 сутки экспериментального воздействия. Экспрессия гена *IL1 β* значимо повышалась на 3-и и седьмые сутки эксперимента. (рисунок 40).

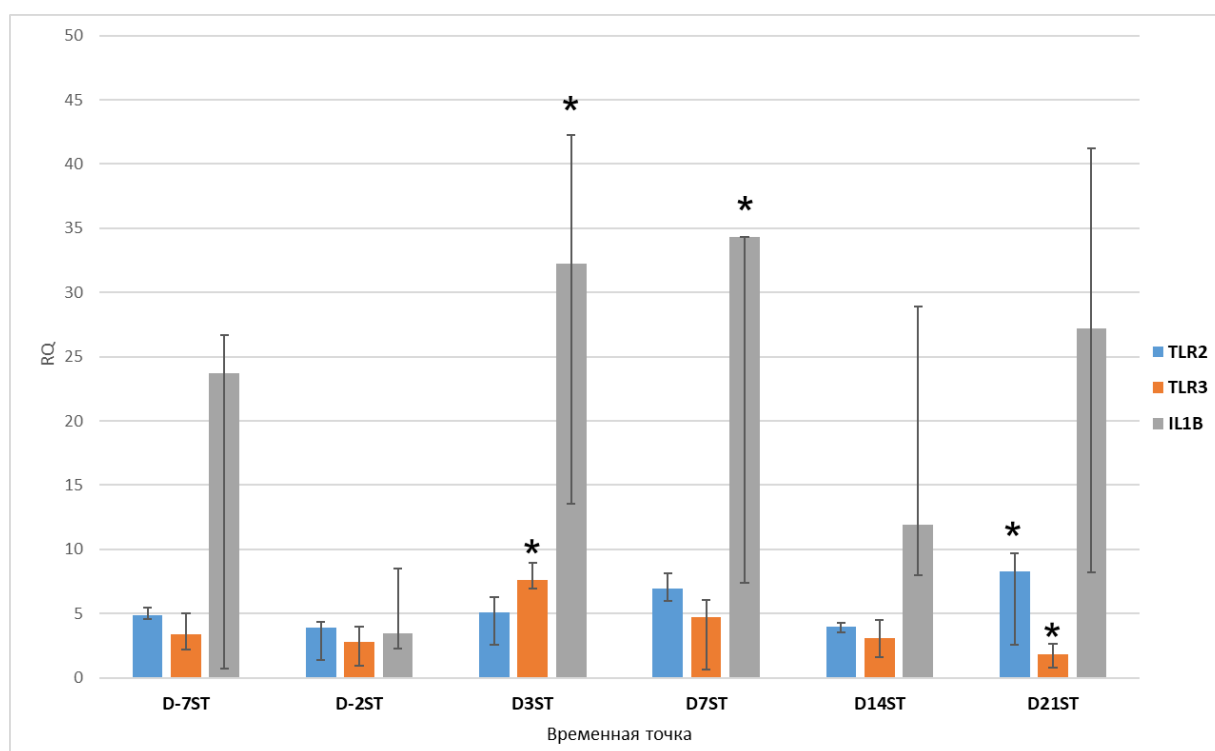


Рисунок 40. Экспрессия генов *TLR* и *IL1 β* в стимулированных коктейлем лигандов 24-часовых культурах моноцитов (Me, Q25, Q75);

* – статистически достоверные отличия от фона ($p < 0.05$).

В целом, можно отметить индивидуальную вариабельность при стимулировании моноцитов коктейлем лигандов TLR (приложение 1).

Анализ клеточных факторов иммунной системы человека, находящегося в условиях СИ, показал увеличение общего числа лейкоцитов на 3-и сутки СИ. Предположительно, это могло произойти за счёт увеличения абсолютного и относительного содержания гранулоцитов (таблица 38). Было обнаружено снижение только процентного содержания моноцитов, абсолютное содержание моноцитов на протяжении СИ не изменялось (таблица 38).

Важным результатом проведённого исследования является достоверное снижение относительного содержания гранулоцитов периферической крови с фенотипом $TLR4^+$ на протяжении всего эксперимента, при этом относительное содержание $TLR4^+$ -моноцитов достоверно повышалось только на 3-и и 7-е сутки иммерсии, а также на 7-е сутки после завершения эксперимента (таблица 39). Относительное количество $TLR5^+$ -гранулоцитов постепенно снижалось, начиная со второго фонового обследования, достигая значимых изменений на 7-е, 14-е и 21-е сутки СИ. На 7-е сутки восстановительного периода значимые изменения отсутствовали, но полученные значения оставались ниже исходных значений. Достоверные изменения относительного содержания $TLR5^+$ -моноцитов отсутствовали, однако наблюдалась тенденция к их снижению на 3-и сутки СИ и на 7-е сутки после окончания эксперимента. Гранулоциты с фенотипом $TLR6^+$ -достоверно снижались на 14-е и 21-е сутки

СИ, схожая динамика изменений была отмечена и на моноцитах, однако эти изменения не были статистически достоверными. Процентное содержание гранулоцитов, экспрессирующих на своей мембране TLR8 на протяжении эксперимента не изменялось, в то время как на 3-и сутки СИ наблюдалось достоверное повышение содержания в периферической крови моноцитов с этим же фенотипом с постепенным снижением их содержания к 21-м суткам экспериментального воздействия. Относительное количество TLR9⁺-гранулоцитов на 3-и и 7-е сутки повышалось, однако данные изменения не были статистически значимыми, при этом содержание TLR9⁺-моноцитов демонстрировало аналогичную динамику с достоверным повышением на 3-и и 7-е сутки СИ. Достоверных изменений относительного содержания моноцитов и гранулоцитов с фенотипом TLR1⁺, TLR2⁺, а также TLR3⁺ отмечено не было.

Абсолютное содержание моноцитов и гранулоцитов периферической крови также менялось на протяжении эксперимента. Так, было отмечено достоверное увеличение числа TLR1⁺ -моноцитов на 3-и сутки иммерсии с плавным снижением к 21-м суткам. TLR1⁺ -гранулоциты демонстрировали похожую динамику, однако достоверных различий с фоновыми значениями не было. Следует отметить, что повышение числа клеток наблюдалось уже за 2-е суток до начала СИ. Количество TLR2⁺-моноцитов и гранулоцитов достоверно не изменялось, но при этом наблюдалась тенденция к увеличению числа как моноцитов, так и гранулоцитов к 3-им суткам иммерсии. Интересно, что содержание TLR2⁺ - моноцитов в периферической крови заметно увеличилось ко второму фону, а гранулоцитов, наоборот, снизилось. Динамика изменений TLR3⁺-моноцитов и гранулоцитов была разнонаправленной, но достоверных отличий как в одном, так и другом случае отмечено не было. Содержание TLR4⁺-, TLR5⁺-, и TLR6⁺-моноцитов и гранулоцитов достоверно повышалось на 3-и сутки, причём в случае моноцитов значимые изменения проявлялись за двое суток до начала эксперимента, с последующим приближением к фоновому значению к завершению эксперимента; на 14-е сутки количество гранулоцитов достоверно снижалось по сравнению с фоновым значением. Изменения содержания моноцитов и гранулоцитов с фенотипом TLR8 также повышались на 3-и сутки пребывания в условиях иммерсионного воздействия, однако эти изменения достоверными не были. Количество TLR9⁺ -моноцитов и гранулоцитов повышалось на протяжении всего эксперимента, достоверные изменения были обнаружены на третьи, сутки у обоих типов клеток (таблица 39).

Наибольшее количество достоверных изменений было показано для моноцитов, стимулированных соответствующими лигандами TLR. Исследование поверхностной и внутриклеточной экспрессии TLRs CD14⁺ - моноцитами, стимулированными соответствующими лигандами TLR, показало, что в 24-часовых культурах клеток во все сроки

обследования испытуемых-добровольцев, находившихся в условиях СИ, не было обнаружено значимого снижения только количества моноцитов, экспрессирующих TLR3 и TLR8, однако присутствовала общая тенденция к снижению числа клеток, за исключением достоверного увеличения TLR8⁺ моноцитов на третьи сутки эксперимента. Во всех остальных случаях в клеточных культурах выявлено достоверное снижение числа моноцитов, экспрессирующих TLR2⁺, TLR5⁺, TLR6⁺, TLR9⁺, на 7-е сутки экспериментального воздействия, а клеток, экспрессирующих TLR1⁺ и TLR4⁺, ещё и на 3-и сутки (таблица 40).

Таким образом, в результате проведённых исследований системы сигнальных TLRs при воздействии на организм практически здорового человека 21-суточного пребывания в условиях СИ, был выявлен ряд изменений, затрагивающих абсолютное и относительное содержание моноцитов и гранулоцитов в периферической крови, а также изменения в культурах *in vitro* при стимуляции моноцитов различными специфическими лигандами TLRs. Как известно, относительное содержание клеток отражает процент клеточных факторов с определённым фенотипом в рассматриваемом клеточном пуле, а абсолютное содержание – непосредственно, их количество в периферической крови. Таким образом, относительное и абсолютное содержание клеток с различными фенотипическими признаками являются важными, взаимодополняющими показателями, характеризующими состояние клеточного иммунитета. В то же время изменения содержания TLRs⁺ моноцитов в культурах при стимуляции соответствующими лигандами характеризуют способность клеток к активации.

Таблица 40. Показатели лейкограммы периферической крови добровольцев-испытателей, участников проекта с 21-суточной “сухой” иммерсией без средств профилактики Me(q25-q75).

	Время обследования						
	-7 сутки	-2 сутки	3 сутки	7 сутки	14 сутки	21 сутки	+7 сутки
Лейкоциты, абс*10 ⁹ /л	4,92 (4,16-5,68)	5,48 (4,43-6,50)	7,73 (5,60-9,35)*	5,55 (5,38-6,03)	5,53 (4,68-6,05)	5,65 (4,50-6,70)	4,97 (3,85-5,50)
Моноциты, отн., %	4,05 (2,00-6,55)	4,58 (2,48-7,18)	1,77 (1,25-2,10)*	1,98 (1,50-2,08)*	2,10 (1,70-2,73)	1,92 (1,53-2,20)	2,00 (1,63-2,28)
Моноциты, абс*10 ⁹ /л	0,20 (0,10-0,33)	0,28 (0,13-0,38)	0,17 (0,10-0,20)	0,13 (0,10-0,13)	0,12 (0,10-0,18)	0,12 (0,10-0,14)	0,12 (0,10-0,20)
Гранулоциты, отн., %	69,20(65,10-74,40)	63,90 (64,71-66,72)	74,80 (73,64-76,88)*	69,79 (68,75-72,52)	69,69 (62,81-75,52)	68,84 (66,50-73,60)	69,07(65,21-71,10)
Гранулоциты, абс*10 ⁹ /л	3,43 (2,68-4,10)	3,40 (2,90-3,33)	5,67 (4,25-6,80)*	3,83 (3,30-4,20)	3,77 (3,30-4,08)	3,85 (3,08-4,58)	3,35 (2,63-3,75)

*-достоверное различие с -7 сутками (p<0.05)

#-достоверное различие с -2 сутками (p<0.05)

Таблица 41. Показатели субпопуляционного состава моноцитов и гранулоцитов в периферической крови добровольцев-испытателей, участников проекта с 21-суточной “сухой” иммерсией без средств профилактики Me(q25-q75).

Показатель	Время обследования						
Моноциты, экспрессирующие поверхностные TLRs	-7 сутки	-2 сутки	3 сутки	7 сутки	14 сутки	21 сутки	+7 сутки
TLR1 ⁺ отн., %	98,51 (78,22-98,83)	98,90 (88,82-99,95)	99,73 (53,07-99,84)	99,77 (57,24-99,97)	91,85 (52,84-100,00)	94,55 (89,57-99,73)	99,31 (96,83-100,00)
TLR1 ⁺ абс*10 ⁹ /л	0,10 (0,09-0,32)	0,25 (0,13-0,33)	0,30 (0,20-0,70)*	0,15 (0,10-0,45)	0,14 (0,05-0,20)	0,10 (0,09-0,16)	0,10 (0,10-0,18)
TLR2 ⁺ отн., %	95,09 (79,8-100,00)	100 (100-100)	100 (100-100)	100 (100-100)	100,00 (99,05-100,00)	99,00(98,00-100,00)	100,00 (98,9-100,00)
TLR2 ⁺ абс*10 ⁹ /л	0,10 (0,10-0,32)	0,35 (0,23-0,48)	0,20 (0,08-0,50)	0,15 (0,10-0,45)	0,15 (0,10-0,20)	0,10 (0,10-0,15)	0,10 (0,10-0,10)
TLR4 ⁺ отн., %	64,60 (63,20-86,40)	77,70 (74,60-93,70)	95,90 (53,00-99,90)*	89,70 (65,60-99,88)*	85,00 (78,10-96,05)	99,11 (88,62-99,41)	99,50 (97,71-99,91)*
TLR4 ⁺ абс*10 ⁹ /л	0,10 (0,09-0,25)	0,31 (0,21-0,43)	0,30 (0,20-0,70)*	0,15 (0,09-0,45)	0,12 (0,08-0,19)	0,10 (0,09-0,17)	0,10 (0,10-0,17)
TLR5 ⁺ отн., %	89,53 (82,17-91,34)	91,64 (87,07-96,85)	84,83 (82,17-94,24)	88,54 (72,47-69,35)	89,94(85,07-95,53)	92,25 (86,87-96,73)	78,53 (65,33-93,87)
TLR5 ⁺ абс*10 ⁹ /л	0,10 (0,09-0,33)	0,32 (0,21-0,51)	0,21 (0,16-0,56)*	0,15 (0,08-0,40)	0,14 (0,09-0,20)	0,10 (0,09-0,16)	0,10 (0,07-0,14)
TLR6 ⁺ отн., %	98,83 (75,14-99,87)	98,64 (99,44-99,65)	99,43 (92,67-100,00)	96,54 (89,34-100,00)	94,77 (63,35-98,05)	89,03 (70,04-98,77)	99,13(96,95-99,93)
TLR6 ⁺ абс*10 ⁹ /л	0,10 (0,10-0,27)	0,32 (0,22-0,51)	0,30 (0,20-0,70)*	0,15 (0,10-0,45)	0,15 (0,09-0,20)	0,10 (0,10-0,11)	0,10 (0,10-0,17)
Моноциты, экспрессирующие внутриклеточные TLRs							
TLR3 ⁺ отн., %	12,54 (3,90-16,95)	22,77 (16,65-72,13)	14,37 (6,04-18,65)	20,14 (11,34-27,27)	30,25 (8,70-51,63)	8,30 (4,40-27,03)	9,40 (4,40-14,15)
TLR3 ⁺ абс*10 ⁹ /л	0,06 (0,04-0,09)	0,10 (0,08-0,22)	0,02 (0,02-0,03)	0,02 (0,01-0,10)	0,04 (0,02-0,08)	0,02 (0,01-0,03)	0,03 (0,01-0,06)
TLR8 ⁺ отн., %	28,93 (12,95-47,25)	55,34 (37,35-65,15)	87,67 (64,43-89,37)*	67,24 (45,75-85,05)	45,45 (36,94-58,97)	64,24 (43,37-81,33)	54,34 (33,45-66,27)
TLR8 ⁺ абс*10 ⁹ /л	0,09 (0,01-0,28)	0,24 (0,10-0,39)	0,28 (0,18-0,38)	0,11 (0,08-0,19)	0,08 (0,05-0,10)	0,08 (0,06-0,10)	0,06 (0,05-0,09)
TLR9 ⁺ отн., %	12,73 (8,70-14,03)	22,23 (17,85-41,77)	40,44 (13,15-47,65)*	27,54 (16,37-54,14)*	36,83 (17,55-48,57)	6,85 (5,10-10,27)	6,20 (5,60-13,24)
TLR9 ⁺ абс*10 ⁹ /л	0,01 (0,01-0,02)	0,18 (0,03-0,29)	0,10 (0,07-0,12)	0,04 (0,02-0,23)	0,06 (0,04-0,08)	0,01 (0,01-0,04)#	0,01 (0,01-0,06)
Показатель	Время обследования						

Гранулоциты, экспрессирующие поверхностные TLRs	-7 сутки	-2 сутки	3 сутки	7 сутки	14 сутки	21 сутки	+7 сутки
TLR1 ⁺ отн., %	80,14 (76,17-83,14)	59,63 (43,07-74,94)	75,84 (30,25-89,27)	69,17(28,44-90,93)	71,33 (56,65-83,57)	58,74 (53,87-84,94)	73,97 (54,54-92,35)
TLR1 ⁺ абс*10 ⁹ /л	3,14 (2,36-3,78)	1,87 (1,21-2,65)	5,10 (4,05-6,35)	3,12 (2,47-3,78)	2,83 (2,15-3,20)	2,33 (1,90-3,13)	2,47 (1,59-2,94)
TLR2 ⁺ отн., %	98,85 (98,65-99,13)	98,23 (97,45-99,64)	94,94 (83,77-98,65)	98,43 (97,07-99,65)	96,53 (89,07-97,15)	99,53 (97,95-99,85)	99,64 (54,77-99,94)
TLR2 ⁺ абс*10 ⁹ /л	3,75 (2,57-4,19)	2,96 (2,86-3,30)	4,13 (3,77-6,26)	3,87 (3,51-4,15)	3,60 (3,20-3,96)	3,13 (2,64-4,33)	2,64 (2,14-3,14)
TLR4 ⁺ отн., %	65,41 (55,77-97,34)	38,65 (15,27-56,04)	35,05 (21,97-51,24)*	41,37(24,34-75,14)*	34,35(19,24-55,77)*	30,14(18,35-47,53)*	59,93 (30,47-91,44)
TLR4 ⁺ абс*10 ⁹ /л	2,14 (2,12-2,60)	1,51 (0,56-1,79)	2,73 (2,12-4,53)*	2,52 (1,55-3,38)	1,37 (0,73-2,15)*	1,22 (0,72-2,04)	2,38 (1,60-2,46)
TLR5 ⁺ отн., %	65,35 (55,49-88,70)	48,24 (36,55-59,77)	42,44 (14,37-71,94)	23,95(8,80-53,57)*	33,05 (15,24-42,47)*#	34,57(21,73-43,97)*	30,44 (16,47-49,45)
TLR5 ⁺ абс*10 ⁹ /л	2,06 (1,95-2,49)	1,42 (1,06-2,72)	4,03 (2,60-4,15)*	1,77 (0,92-2,73)	1,18 (0,58-1,83)*	1,23 (0,69-1,68)	0,94 (0,50-2,24)
TLR6 ⁺ отн., %	77,15 (70,87-98,44)	78,53 (56,77-96,57)	84,73 (22,57-99,55)	81,65 (26,23-97,67)	24,54 (7,505-73,43)*	51,13(39,15-77,49)*	77,43 (42,56-97,76)
TLR6 ⁺ абс*10 ⁹ /л	2,04 (1,86-4,17)	2,21 (1,64-3,00)	3,58 (3,48-6,03)*	3,49 (3,14-3,80)	0,80 (0,32-2,98)*	1,70 (1,22-3,65)	2,29 (1,57-2,65)
Гранулоциты, экспрессирующие внутриклеточные TLRs							
TLR3 ⁺ отн., %	68,43 (32,85-97,65)	97,82 (95,75-98,24)	90,42 (89,13-97,45)	87,13(67,13-94,52)	93,73 (89,43-96,53)	78,03 (63,43-87,74)	83,53 (41,54-86,35)
TLR3 ⁺ абс*10 ⁹ /л	2,15 (1,58-2,56)	2,87 (2,84-3,21)	3,69 (3,23-4,15)	2,70 (2,05-3,42)	3,59 (3,20-3,69)	2,89 (1,92-3,88)	2,17 (2,08-2,54)
TLR8 ⁺ отн., %	100	100	100	100	100	100	100
TLR8 ⁺ абс*10 ⁹ /л	3,43 (2,68-4,10)	3,40 (2,90-3,33)	5,67 (4,25-6,80)	3,83 (3,30-4,20)	3,77 (3,30-4,08)	3,85 (3,08-4,58)	3,35 (2,63-3,75)
TLR9 ⁺ отн., %	46,83 (29,74-91,65)	84,24 (74,05-89,53)	90,65 (83,44-91,03)	71,94 (35,75-88,93)	83,04 (46,45-88,23)	60,93 (43,54-82,05)	54,34 (51,14-64,08)
TLR9 ⁺ абс*10 ⁹ /л	2,02 (1,25-2,29)	2,68 (2,39-2,93)	3,09 (1,55-3,67)	1,94 (1,02-2,83)	2,88 (1,96-3,43)	2,60 (1,64-2,93)	1,95 (1,75-2,42)

*-достоверное различие с -7 сутками (p<0.05)

Таблица 42

Показатели субпопуляционного состава моноцитов в 24-часовых клеточных культурах, стимулированных соответствующими лигандами TLR, добровольцев-испытателей, участников проекта с 21-суточной “сухой” иммерсией без средств профилактики Me(q25-q75).

Показатель	Время обследования						
Моноциты, экспрессирующие поверхностные TLRs	-7 сутки	-2 сутки	3 сутки	7 сутки	14 сутки	21 сутки	+7 сутки
TLR1 ⁺ отн., %	73,01(62,40-78,12)	59,35(48,70-65,10)	58,85(37,35-71,15)*	49,10(40,40-61,10)*	67,80(38,27-82,4)	43,30(33,17-64,45)	62,95(50,07-66,70)
TLR2 ⁺ отн., %	84,80(48,70-88,60)	60,70(44,37-87,67)	75,45(54,30-77,32)	52,20(48,02-61,02)*	80,00(61,51-95,40)	68,05(47,32-72,9)	73,25(40,12-85,37)
TLR4 ⁺ отн., %	65,20(46,90-75,00)	46,90(27,15-51,10)	32,10(26,05-44,90)*	44,15(36,02-50,55)*	59,25(35,43-70,57)	38,80(23,17-62,50)	53,75(43,07-64,2)
TLR5 ⁺ отн., %	76,20(67,10-81,60)	65,45(49,45-68,32)	70,80(53,75-85,62)	41,70(22,17-58,75)*	50,75(16,75-74,05)	52,50(38,34-64-85)	46,80(43,15-49-17)
TLR6 ⁺ отн., %	85,60(81,80-91,10)	86,50(67,10-93,00)	78,15(76,17-83,57)	32,85(24,05-71,19)*	49,35(28,40-69,77)	67,80(43,4-76,75)	51,50(50,01-74,00)
Моноциты, экспрессирующие внутриклеточные TLRs							
TLR3 ⁺ отн., %	56,95(46,1-76,2)	47,80(41,8-51,55)	37,55(27,20-55,44)	46,10(28,07-54,15)	33,00(23,82-52,75)	37,80(30,97-52,28)	47,90(40,48-69,88)
TLR8 ⁺ отн., %	30,35(29,60-35,08)	53,20(39,00-65,98)	80,40(57,85-83,23)*	38,40(26,65-55,93)	43,20(36,55-52,85)	42,65(32,05-60,68)	72,85(58,33-80,04)
TLR9 ⁺ отн., %	44,85(41,63-50,60)	53,15(44,48-74,58)	53,15(31,15-72,45)	30,90(14,58-45,58)*	35,10(30,48-44,23)*	40,10(34,25-60,13)*	42,55(26,08-56,85)

*-достоверное различие с -7 сутками (p<0.05)

Примечательно, что динамика изменения абсолютного и относительного числа моноцитов и гранулоцитов, экспрессирующих TLRs с внутриклеточной и поверхностной локализацией, совпадала только для TLR9⁺ клеток. При этом, если сравнивать динамику только относительного содержания моноцитов и гранулоцитов в периферической крови, можно отметить её схожий характер для TLR3⁺, TLR9⁺. Совпадение динамики абсолютного содержания числа клеток наблюдалось только для TLR9⁺ клеток. Изменения относительного числа моноцитов и гранулоцитов в периферической крови, экспрессирующих на своей мембране TLR2, отсутствовали, а абсолютного - имели разнонаправленный характер для моноцитов и гранулоцитов. Кроме того, наибольшее количество достоверных изменений наблюдалось в относительном содержании TLRs⁺ клеток периферической крови.

Различия в реакциях моноцитов и гранулоцитов периферической крови, экспрессирующих TLRs, показано рядом авторов (Trzpis K. et al 2014, Пономарёв С.А. и др.. 2015), однако, к сожалению, подтверждённых теорий, объясняющих данный феномен, не предложено. Существуют отдельные гипотезы, в основе которых лежит предположение о том, что подобные особенности могут быть обусловлены функциональными различиями моноцитов и гранулоцитов, в основе которых заложены разные активационные механизмы (Пономарёв С.А. и др.. 2015).

Говоря о сравнении динамики изменений числа моноцитов периферической крови с моноцитами, стимулированными в клеточных культурах соответствующими лигандами, следует отметить, что она, во всех случаях, за исключением TLR8⁺ клеток, не совпадала. Различные типы реакции моноцитов в периферической крови и клеточной культуры, вероятно, обусловлены тем, что в культуре помимо перестроек, вызванных неспецифическим воздействием гиподинамии и опорной разгрузки, добавляется специфическое действие лигандов и активационный потенциал клеток моноцитарно-макрофагального ряда.

Интересно, что в подавляющем большинстве случаев, достоверные изменения как относительного, так и абсолютного содержания моноцитов и гранулоцитов периферической крови, а также моноцитов в клеточных культурах наблюдались в первые семь суток эксперимента, кроме того, полученные в фоновых обследованиях данные часто также различались между собой, однако эти различия не были значимыми для всех TLRs⁺ клеток, за исключением абсолютного содержания TLR4⁺, TLR5⁺, TLR6⁺ моноцитов периферической крови (Пономарёв С.А. и др. 2019).

В ходе 21-суточной СИ были обнаружены изменения и в состоянии адаптивного иммунитета. Проведённый анализ абсолютного и относительного содержания лимфоцитов в периферической крови испытуемых-добровольцев показал отсутствие отличий от фоновых значений на 21 сутки СИ и через 7 дней после окончания СИ. Был проведен анализ содержания CD3⁺ Т-лимфоцитов и двух субпопуляций CD8⁺ и CD4⁺ Т-лимфоцитов. Не было выявлено статистически значимых изменений (таблица 42). На 21 сутки пребывания в условиях СИ в периферической крови испытуемых-добровольцев было обнаружено достоверное повышение относительного и абсолютного содержания Т-лимфоцитов, экспрессирующих активационный маркер CD25.

Таблица 43. Показатели иммунограммы испытуемых-добровольцев, участников проекта с 21-суточной “сухой” иммерсией без средств профилактики Me(q25-q75).

Показатели		Время обследования		
		-7 сутки	21 сутки	+7 сутки
Лейкоциты,	абс., $\times 10^9/\text{л}$	5,40 (3,60-6,10)	5,40 (4,20-6,40)	4,95 (4,10-5,80)
Лимфоциты,	отн., %	31,90 (29,60-33,50)	30,60 (27,80-36,10)	28,50 (26,70-33,20)
	абс., $\times 10^9/\text{л}$	1,70 (1,10-2,40)	1,70 (1,50-2,00)	1,45 (1,20-1,70)
CD3 ⁺ -лимфоциты	отн., %	72,50 (71,00-73,00)	71,00 (70,00-74,00)	73,00 (72,00-73,00)
	абс., $\times 10^9/\text{л}$	1,23 (0,85-1,74)	1,24 (1,11-1,41)	1,03 (0,87-1,20)
CD3 ⁺ CD4 ⁺ -лимфоциты	отн., %	44,50 (43,00-48,00)	45,00 (44,00-48,00)	47,50 (42,00-50,00)
	абс., $\times 10^9/\text{л}$	0,80 (0,54-1,08)	0,78 (0,66-0,91)	0,62 (0,58-0,91)
CD3 ⁺ CD8 ⁺ -лимфоциты	отн., %	24,50 (24,00-26,00)	26,00 (21,00-27,00)	25,50 (24,00-27,00)
	абс., $\times 10^9/\text{л}$	0,39 (0,27-0,60)	0,41 (0,33-0,42)	0,33 (0,30-0,39)
CD3 ⁺ CD25 ⁺ -лимфоциты,	отн., %	3,55 (2,20-4,00)	4,80 (4,50-5,10)*	3,35 (2,90-4,00)
	абс., $\times 10^9/\text{л}$	0,06 (0,04-0,08)	0,08 (0,06-,09)	0,05 (0,04-0,08)

*-достоверное различие с -7 сутками ($p < 0.05$)

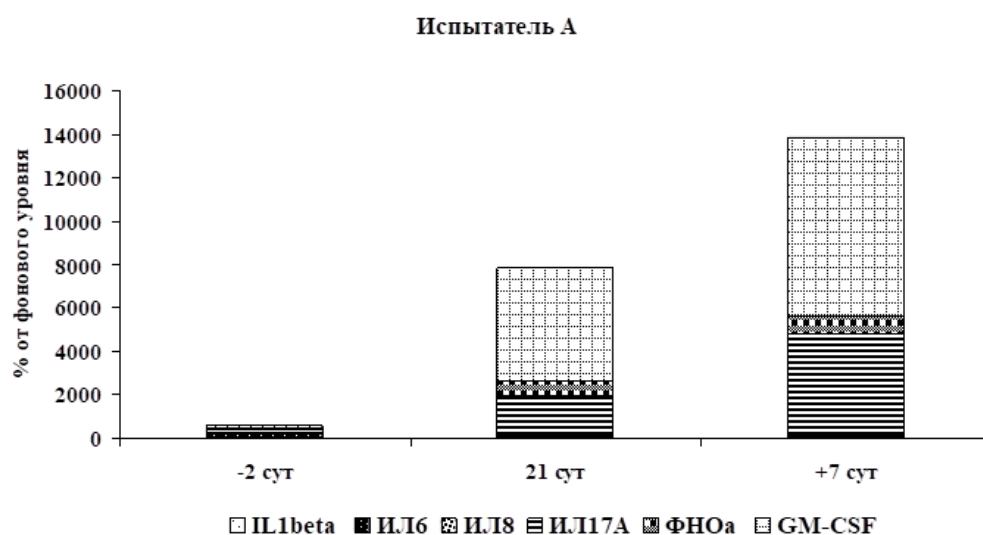
Активированные Т-лимфоциты синтезируют про и противовоспалительные цитокины. Был проведен анализ особенностей продукции цитокинов CD3⁺- лимфоцитами периферической крови испытуемых-добровольцев в первичной культуре на фоне CD2/CD3/CD28-антигеннезависимой стимуляции. На 21 сутки СИ и на 7 сутки после окончания СИ было обнаружено снижение содержания IL-8 в супернатантах клеточных культур (таблица 43). Кроме того, на 7 сутки после окончания СИ наблюдалось снижение способности CD3⁺-лимфоцитов продуцировать IL-1 β . Достоверных изменений синтеза других цитокинов выявлено не было.

Таблица 44. Продукция цитокинов CD3⁺-Т-лимфоцитами периферической крови испытуемых-добровольцев, участников проекта с 21-суточной “сухой” иммерсией без средств профилактики Me(q25-q75)

Цитокины, Пкг/мл	Время обследования		
	-2 сутки	21 сутки	+7 сутки
IL-1 β	0,81 (0,56-1,67)	0,68 (0,40-0,74)	0,52 (0,48-0,56)*
IL -3	7,53 (6,97-26,09)	12,65 (3,08-18,48)	11,90 (3,88-22,19)
IL -4	247,34 (61,42-1042,84)	222,95 (135,74-1300,37)	328,87 (207,70-4714,35)
IL -6	65,21 (18,16-94,43)	19,93 (9,79-54,93)	32,68 (4,10-39,39)
IL -8	77,76 (57,00-138,72)	30,64 (28,12-41,87)*	22,96 (17,51-51,42)*
IL -10	8006,14 (4721,61-12968,18)	5529,96 (4880,95-6123,90)	10405,63 (6120,70-11399,99)
IL -13	115,43 (96,7-205,69)	83,10 (61,97-174,85)	150,53 (44,57-229,50)
IL -17A	123,59 (111,59-4726,71)	83,20 (62,49-588,29)	163,18 (59,95-2170,79)
IFN- γ	19260,07 (10467,37-36985,10)	11501,81 (11227,77-12065,83)	14378,43 (13489,22-17013,28)
TNF α	12501,46 (11973,63-16671,58)	10433,84 (9954,69-10466,80)	12112,79 (7471,83-12622,07)
GM-CSF	241,88 (143,82-394,12)	114,12 (107,10-2567,90)	287,86 (67,66-2232,42)

*-достоверное различие с -7 сутками (p<0.05)

В целом, анализ индуцированного синтеза цитокинов в культурах лимфоцитов, выделенных из периферической крови, выявил индивидуальные флуктуации как в сторону повышения, так и снижения синтеза изученных цитокинов активированными Т-клетками (рисунок 41)



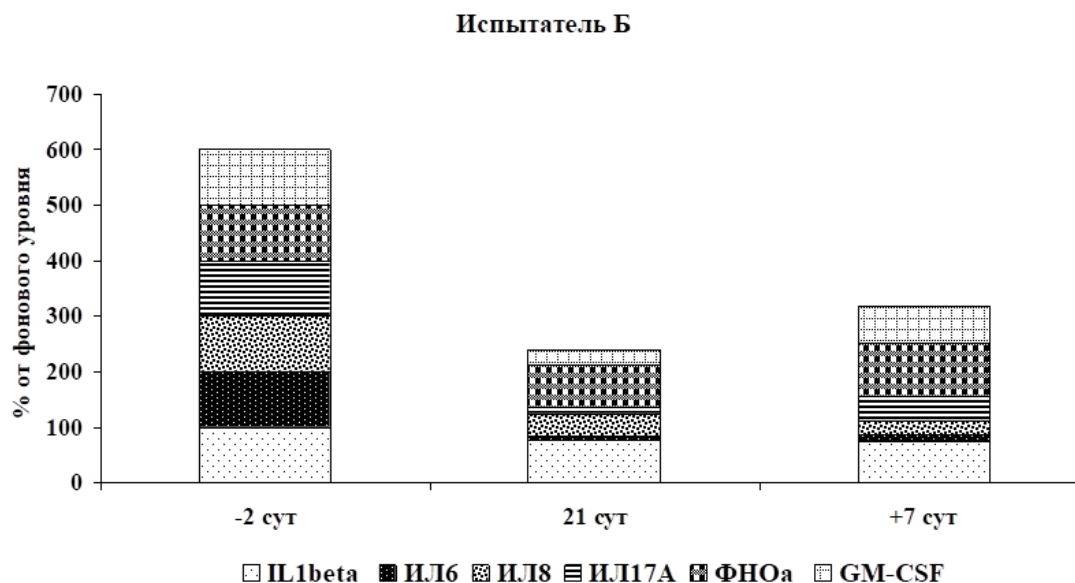


Рисунок 41. Типы цитокинпродуцирующей способности $CD3^+$ Т-лимфоцитов периферической крови испыателей-добровольцев, участников проекта с 21-суточной “сухой” иммерсией без средств профилактики (индивидуальные данные)

Проведённое исследование показало, что адаптация человека к условиям 21-суточной СИ без средств профилактики сопровождается рядом изменений в адаптивном и врождённом компонентах иммунной системы с преобладанием процессов, ассоциированных со снижением функциональной активности лимфоцитов и моноцитов. Как и в предыдущих исследованиях следует отметить наличие индивидуальной вариабельности результатов. Кроме того, у одного и того же испыателя можно проследить разнонаправленные изменения фенотипических и функциональных характеристик иммунитета, что, по-видимому, отражает сложный процесс взаимодействия иммунной системы с другими физиологическими системами, а также эндо- и экзогенными инфекционными агентами.

3.5. Реакция системы иммунитета на длительные космические экспедиции на МКС

В настоящее время существует существенное количество работ, посвящённых состоянию иммунной системы человека и животных во время действия факторов реального КП, большая часть из которых посвящена изучению влияния факторов КП на адаптивный компонент иммунной системы человека (Konstantinova et al 1973, 1993, Rykova et al. 2001, 2008, Morukov et al 2011, Crucian et al 2014, 2021). В ряде работ содержатся противоречивые сведения о влиянии КП на систему иммунитета. Так, в исследовании Taylor et al 1986 показано снижение числа моноцитов после кратковременного КП, а в работе Mills et al 2001-повышение. Количество различных субпопуляций лимфоцитов после КП может как снижаться (Crucian et al 2008), так и повышаться (Morukov et al 2011). Содержание цитокинов в плазме крови и

супернатантах стимулированных различными активаторами лимфоцитов также имеет разнонаправленную динамику (Kriger S et al 2021, Kuzichkin D et al 2022). Примечательно, что реакция иммунной системы на условия короткого и длительного КП практически полностью совпадает (Crucian 2008, 2013, 2015). Подобные расхождения в полученных результатах могут быть объяснены либо разницей в условиях полётов, либо, что представляется более вероятным, индивидуальным состоянием системы иммунитета в конкретный момент времени. Для проверки последней гипотезы была проведена оценка иммунного статуса космонавтом после нескольких КП. Также представлялось целесообразным узнать, оказывают ли влияние факторы КП на молекулярные процессы в системе врождённого иммунитета, а конкретно-на экспрессию компонентов сигнального каскада TLR.

В ходе проведённого послеполётного обследования 10 российских членов экипажа после завершения длительных КП на МКС, ни у одного из обследованных космонавтов не отмечались изменений 3х из 4х адаптерных протеинов (*MyD88*, *TRIF*, *TICAM2*), играющих ключевую роль в активации двух основных сигнальных каскадов TLR: *MyD88*-зависимого и *MyD88*-независимого, а также TLR взаимодействующих протеинов (*BTK*, *HRAS*, *HSPA1A*, *HSPD1*, *LY86*, *TOLLIP*), эффекторов (*EIF2AK2*, *MAP3K7 (TAK1)*, *NR2C2*, *PPARA*, *PRKRA*, *UBE2N*, *UBE2V1*) и компонентов путей внутриклеточной трансдукции сигнала (*CHUK*, *IKBKB*, *MAP4K4*, *NFKB1*, *TNFRSF1A*, *ELK1*, *MAP2K4 (JNKK1)*, *MAPK8 (JNK1)*, *TBK1*). В то же время на первые сутки после завершения длительных КП выявлены разнонаправленные изменения экспрессии генов *HMGB1*, *CD14*, *LY96 (MD- 2)*, *MAPK8IP3*, *PELI1*, *RIPK2*, *SARM1*, *TIRAP*, относящихся к категории TLR-взаимодействующих белков; *CASP8*, *IRAK1*, *IRAK2*, *MAP3K7IP1*, (*TAB1*), *ECSIT (SITPEC)*, *FADD*, *TRAF6*, относящихся к категории эффекторов; *CXCL10*, *IRF3*, *IFNG*, *IRF1*, *IFNA1*, *IFNB1*, относящихся к категории компонентов *IRF* пути, *IFNB1*, *IL1B*, *IL2*, *MAP3K1*, *CCL2*, *CSF2*, *CSF3*, *IFNA1*, *IFNG*, *IL10*, *IL12A*, *IL1A*, *IL6*, *IL8*, *LTA*, *NFKB2*, *NFKBIA*, *NFKBIL1*, *REL*, *TNF*, (*MEKK*), *NFRKB*, *RELA*, относящихся к NF-κB пути; *FOS (c-Fos)*, *JUN*, *MAP2K3*, относящихся к категории компонентов JNK/p38 пути; *CLECSF9*, *PTGS2*, относящихся к категории компонентов NF/IL6 пути; *CD80*, *CD86*, *RIPK2*, относящихся к категории регуляторов адаптивной иммунной системы. Экспрессия генов самих TLRs значимо менялась для *TLR2*, *TLR4* и *TLR6* (таблица 34), причём для *TLR2* и *TLR4* характерно увеличение экспрессии на первые сутки после завершения КП, а для *TLR6*-снижение. Сравнивая экспрессию транскриптов TLR с экспрессией молекул TLR на поверхности моноцитов, можно сделать вывод о том, что динамика изменений совпадает для *TLR2* и *TLR4*, в то время как для *TLR6* экспрессия транскрипта рецептора уменьшается, а самого рецептора-увеличивается (таблицы 34, 35). Экспрессия рецепторов TLR была исследована у 28 российских членов экипажей, в число которых входили те 10 космонавтов, у которых был определён уровень

экспрессии транскриптов. Следует отметить, что у данных космонавтов экспрессия поверхностного рецептора TLR6, в отличие от экспрессии его транскрипта, на 1-е сутки после завершения КП увеличивалась. Что же касается экспрессии остальных TLR, то на первые сутки периода реадaptации к земным условиям наблюдается достоверное повышение экспрессии TLR5 и TLR9 моноцитов (таблица 44), а также TLR2 и TLR5 гранулоцитов. При этом экспрессия TLR8 гранулоцитами на 1 сутки после завершения КП значимо снижалась (таблица 45).

Таблица 45. Экспрессия генов *TLR2*, *TLR4* и *TLR6* в лейкоцитах периферической крови у космонавтов в 1-е сутки после завершения длительных космических полетов, n=10.

Показатели	$2^{(-Avg.(Delta(Ct)))}$			
	До полета		1-е сутки после приземления	
	Медиана	Нижний – 25% и верхний – 75%, квартили	Медиана	Нижний – 25% и верхний – 75%, квартили
TLR2	0,067073	0,026523 - 0,605546	0,252593*	0,030359 - 0,827320
TLR4	0,037969	0,009896 - 0,245325	0,051668*	0,010582 - 0,342965
TLR6	0,030137	0,007577 - 0,266075	0,008928*	0,004434 - 0,067737

*-достоверное различие с фоном (p<0,05).

Таблица 46. Экспрессия TLR с внутриклеточной и поверхностной локализацией моноцитами периферической крови космонавтов до и после длительных КП на МКС, Ме (Q25, Q75), n=28.

	Время обследования		
	ФОН	+1 сутки	+7 сутки
TLR1	9,3 (6,0-18,1)	10,0(6,2-14,7)	10,3(6,55-18,68)
TLR2	33,0(15,7-65,9)	55,31(22,5-95,4)*	58, 3(45,3-79,6)
TLR3	3,7(2,8-10,3)	4,16(3,3-11,9)	4,3(3,1-5,9)
TLR4	12,7(4,6-36,5)	15,69 (8,6-53,9)*	34,2(9,4-78,4)
TLR5	3,3(2,5-5,7)	4,65(2,6-14,7)*	4,3(3,9-23,8)
TLR6	3,6(2,7-5,2)	4,27(3,8-6,9)*	4,1(3,5-5,1)
TLR8	3,3(2,3-18,7)	3,80(2,6-5,5)	3,4(2,6-6,7)
TLR9	4,5(3,7-17,4)	5,70(4,3-10,8)*	5,1(3,5-5,8)

*-достоверное различие с фоном (p<0,05).

Таблица 47. Экспрессия TLR с внутриклеточной и поверхностной локализацией гранулоцитами периферической крови космонавтов до и после длительных КП на МКС, Ме (Q25, Q75), n=28.

	Время обследования		
	ФОН	+1 сутки	+7 сутки
TLR1	4,8(3,8-7,2)	5,5(4,3-7,2)	4,8(4,0-9,2)
TLR2	5,3(3,5-7,7)	7,3(4,3-12,5)*	7,9(5,7-11,1)
TLR3	3,9(2,7-13,6)	4,5(3,0-8,3)	3,8(2,8-7,8)
TLR4	4,6(3,2-7,8)	4,6(3,8-6,0)	4,6(3,7-7,0)
TLR5	3,8(3,0-5,6)	4,7(3,8-6,0)*	4,4(3,5-5,7)
TLR6	4,1(2,8-5,7)	4,4(3,3-6,1)	4,5(3,3-6,2)

	Время обследования		
	ФОН	+1 сутки	+7 сутки
TLR8	7,37(3,6-7,9)	4,65(3,7-8,9)*	5,66(3,5-16,8)
TLR9	4,18(3,1-12,4)	5,44(3,7-7,8)	4,15(3,2-5,9)

Если рассмотреть индивидуальные данные космонавтов, то можно выявить в каждой группе изученных генов, так и самих рецепторов как повышение, так и снижение их экспрессии (рисунок 42).

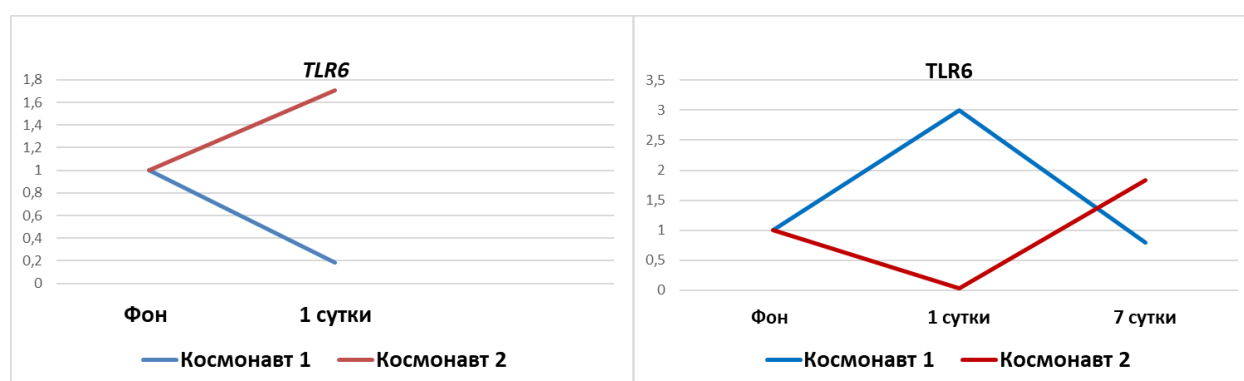
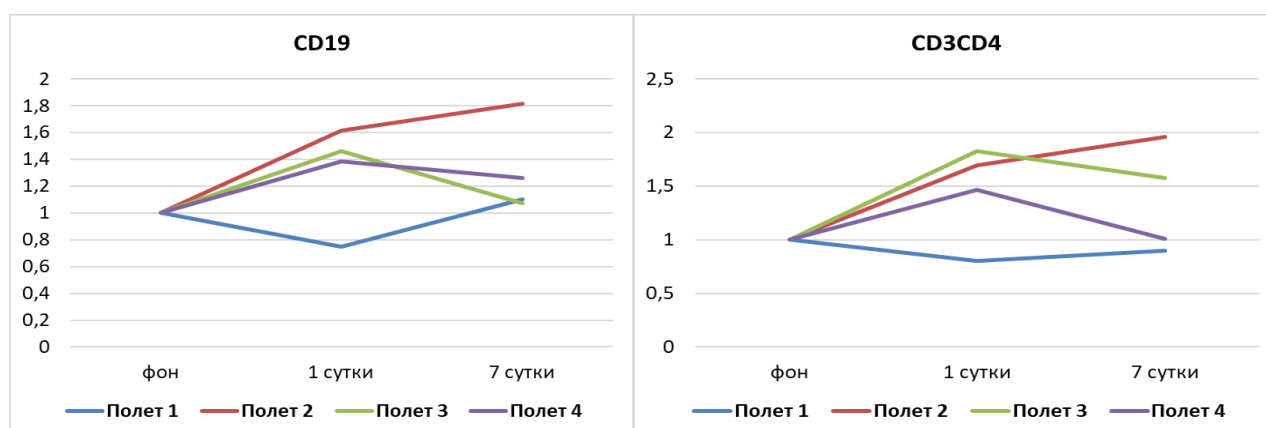
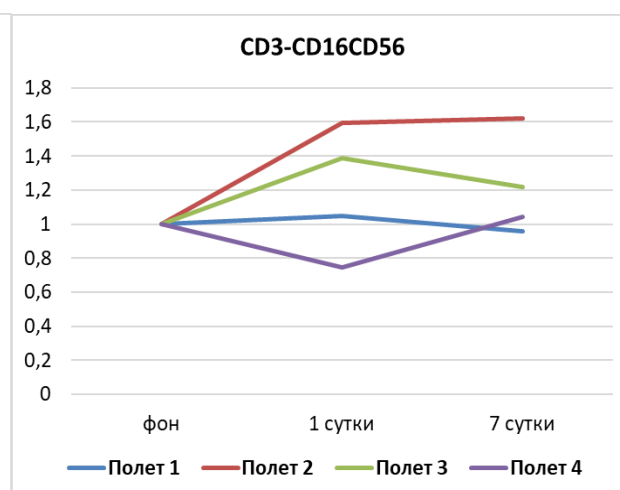
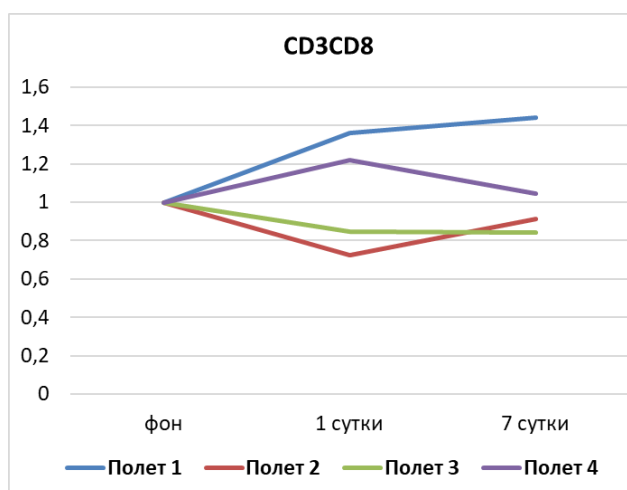
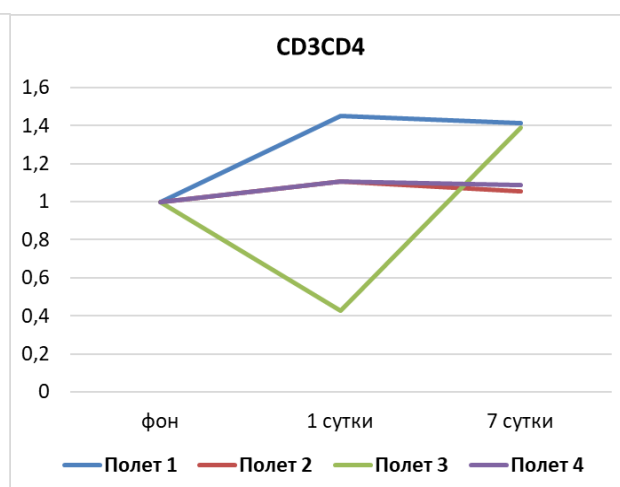
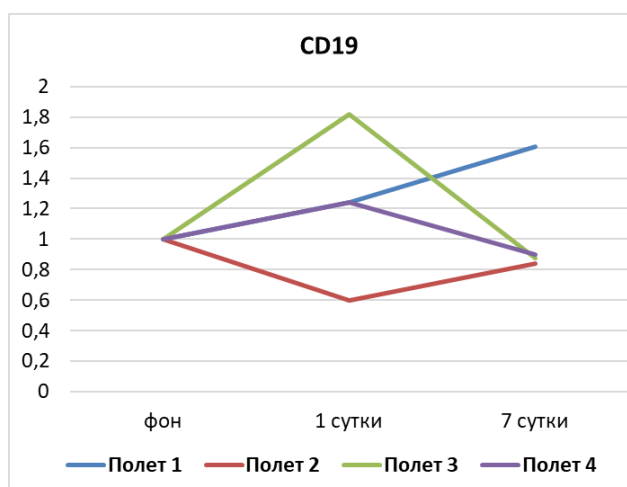
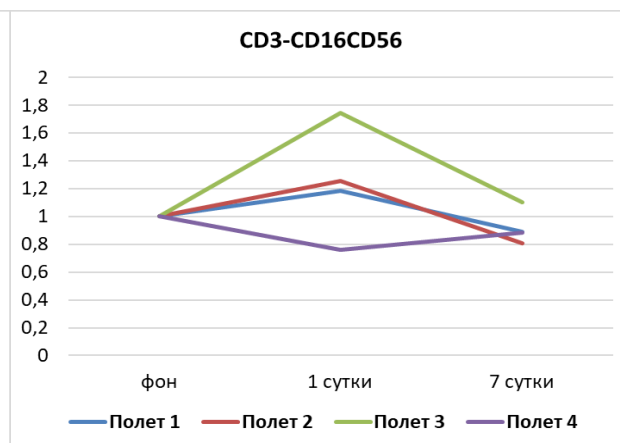
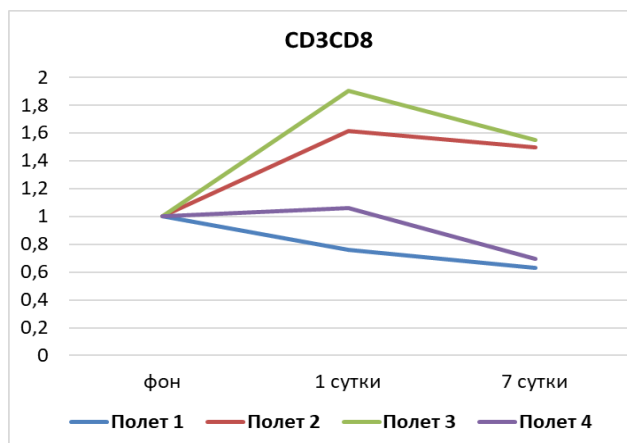
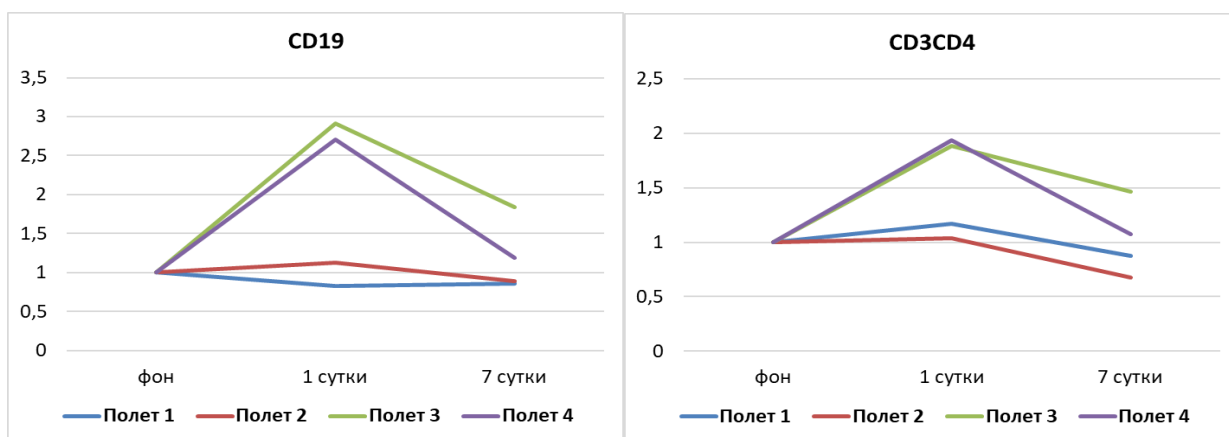
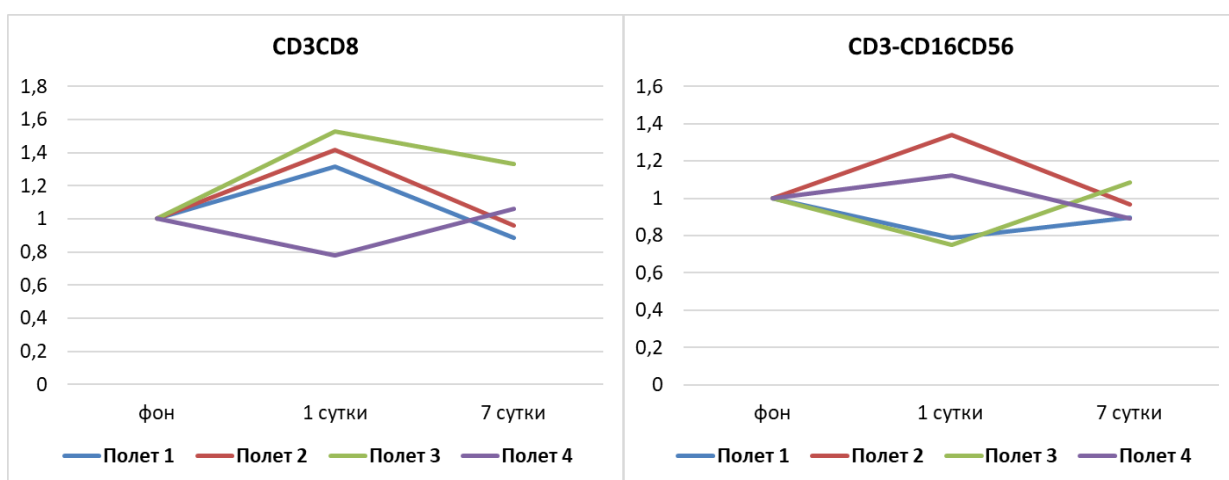
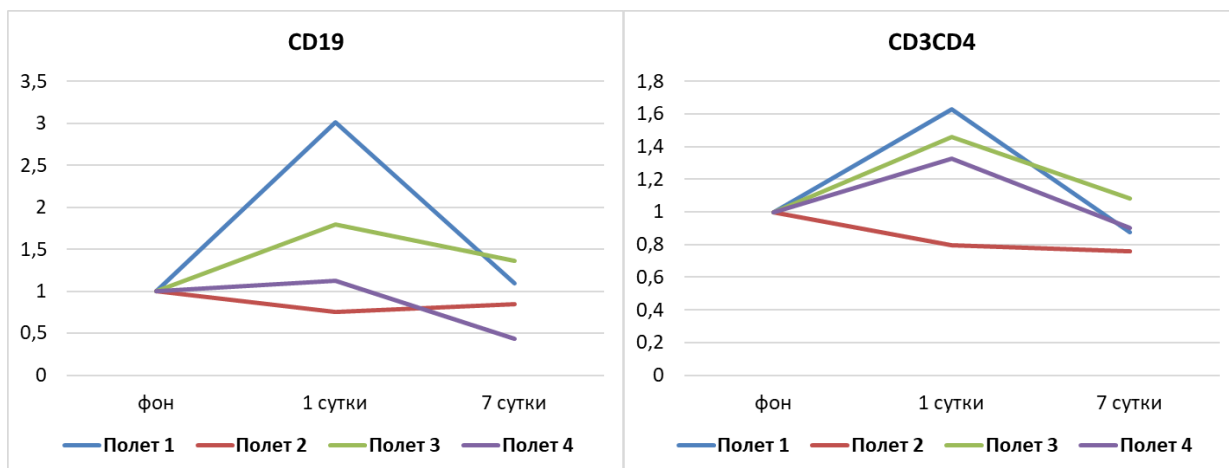


Рисунок 42. Индивидуальная динамика экспрессии гена *TLR6* и рецептора TLR6 на поверхности моноцитов периферической крови у двух космонавтов, совершивших длительный КП на МКС.

В контексте вышеизложенного несомненный интерес представляло изучение реакции организма человека на повторные полёты. Было обследовано пять российских космонавтов, каждый из которых совершил по четыре полугодовые экспедиции на МКС (рисунок 43).







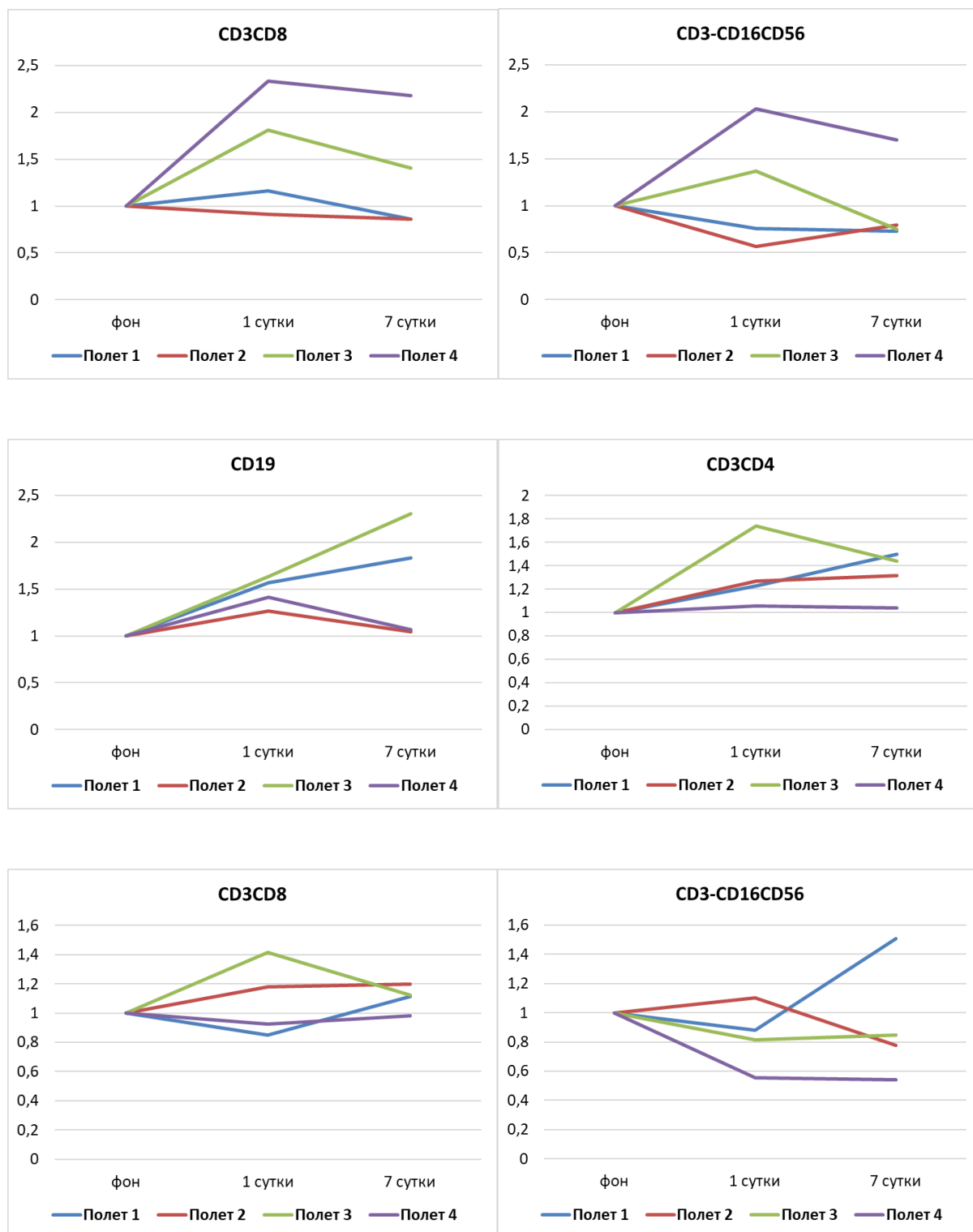


Рисунок 43. Динамика некоторых показателей, характеризующих состояние адаптивного звена иммунной системы космонавтов после четырёх длительных КП на МКС.

Также у четырёх космонавтов после КП была проведена оценка экспрессии моноцитами (рисунок 44А) и гранулоцитами (рисунок 44 Б). TLR с внутриклеточной и поверхностной локализацией после завершения двух КП на МКС.

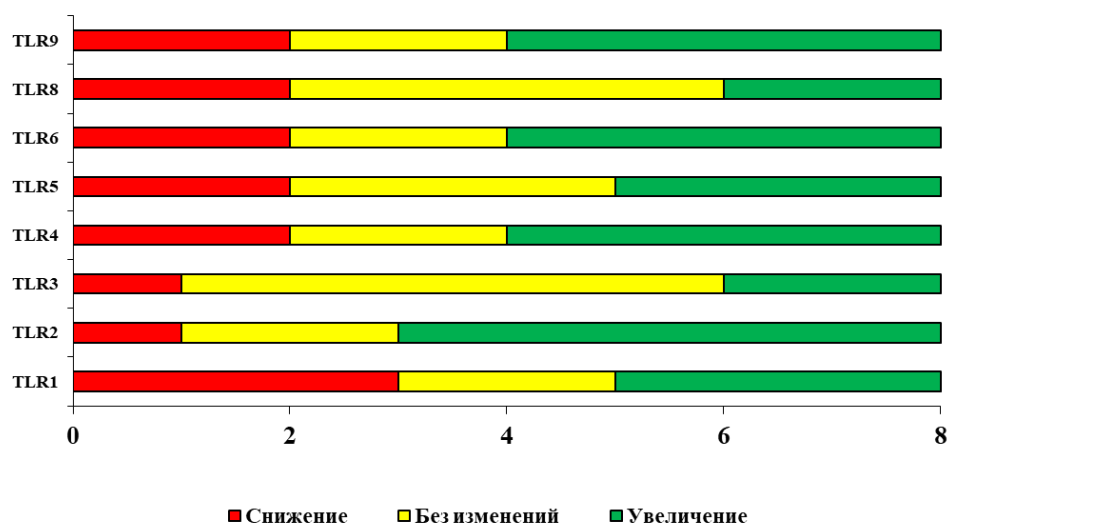


Рисунок 44А. Динамика изменения экспрессии TLR моноцитами периферической крови космонавтов после двух КП на МКС.

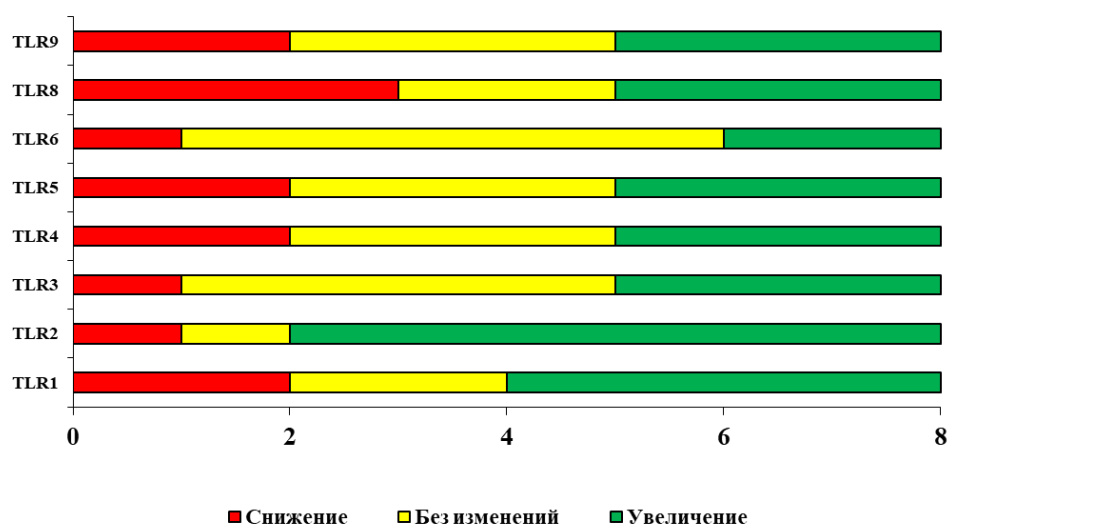


Рисунок 44Б. Динамика изменения экспрессии TLR гранулоцитами периферической крови космонавтов после двух КП на МКС.

Обсуждение результатов

Анализируя полученные данные, можно прийти к выводу о том, что, в целом, КП приводит к увеличению содержания в периферической крови клеточных факторов адаптивного и врождённого иммунитета, что было показано ранее в ряде работ отечественных и зарубежных авторов (Morukov et al 2011, Рыкова 2013, Crucian et al 2015, Kuzichkin et al 2022). В настоящем исследовании впервые было показано, что КП оказывает влияние не только на количественные показатели содержания в периферической крови различных субпопуляций лимфоцитов и моноцитов, но и приводит к изменению экспрессии TLR как с внутриклеточной, так и с поверхностной локализацией. Кроме того, было показано, что факторы длительного КП приводят к изменению экспрессии генов проводящих путей TLR моноцитов периферической крови. Таким образом, КП оказывает комплексное влияние на иммунную систему человека, вызывая изменения на разных уровнях её организации. Это свидетельствует о значительной глубине процессов перестройки функциональной активности иммунитета человека при действии факторов КП. Одной из задач настоящей работы являлась оценка влияния повторных полётов на систему иммунитета. Ранее было показано, что превалирующей реакцией на действие факторов КП со стороны иммунной системы, в первую очередь, со стороны адаптивного иммунитета является повышение содержания клеточных и гуморальных факторов в периферической крови (Рыкова 2013, Crucian et al 2016, Kuzichkin et al 2022). Тем не менее, проведённое исследование позволило установить, что в ряде случаев это правило нарушается. Так, количество CD19⁺-лимфоцитов у космонавта 2 после первого, третьего и четвёртого полёта увеличивается, а после второго – уменьшается, в то время как у этого же космонавта содержание CD3⁺CD16⁺CD56⁺-лимфоцитов снижается после четвёртого полёта, повышаясь после остальных, CD3⁺CD4⁺ -клеток снижается после третьего, возрастая после других КП. У космонавта 3 количество CD19⁺-лимфоцитов после завершения первого КП снижается, а после остальных трёх-увеличивается, количество цитотоксических лимфоцитов с фенотипом CD3⁺CD8⁺ после первого полёта увеличивается, после второго-снижается, по завершению третьего и четвёртого-снова увеличивается. Количество NK-клеток снижается после первых двух КП, а после остальных-увеличивается (рисунок 43). Анализ экспрессии TLR с внутриклеточной и поверхностной локализацией на моноцитах и гранулоцитах показал, что у космонавтов также наблюдаются гетерогенные изменения плотности рецепторов. Как видно из рисунка 43., наблюдается как снижение, так и увеличение экспрессии TLR с преимущественным увеличением экспрессии рецепторов. Под изменением как в сторону снижения, так и в сторону увеличения экспрессии понималась отклонение от предполётных значений более чем на 25%. Индивидуальное рассмотрение полученных результатов показывает, что также, как и в случае адаптивного иммунитета, при повторном полёте

экспрессия TLR у одного и того же космонавта имеет разнонаправленную динамику (рисунок 45).

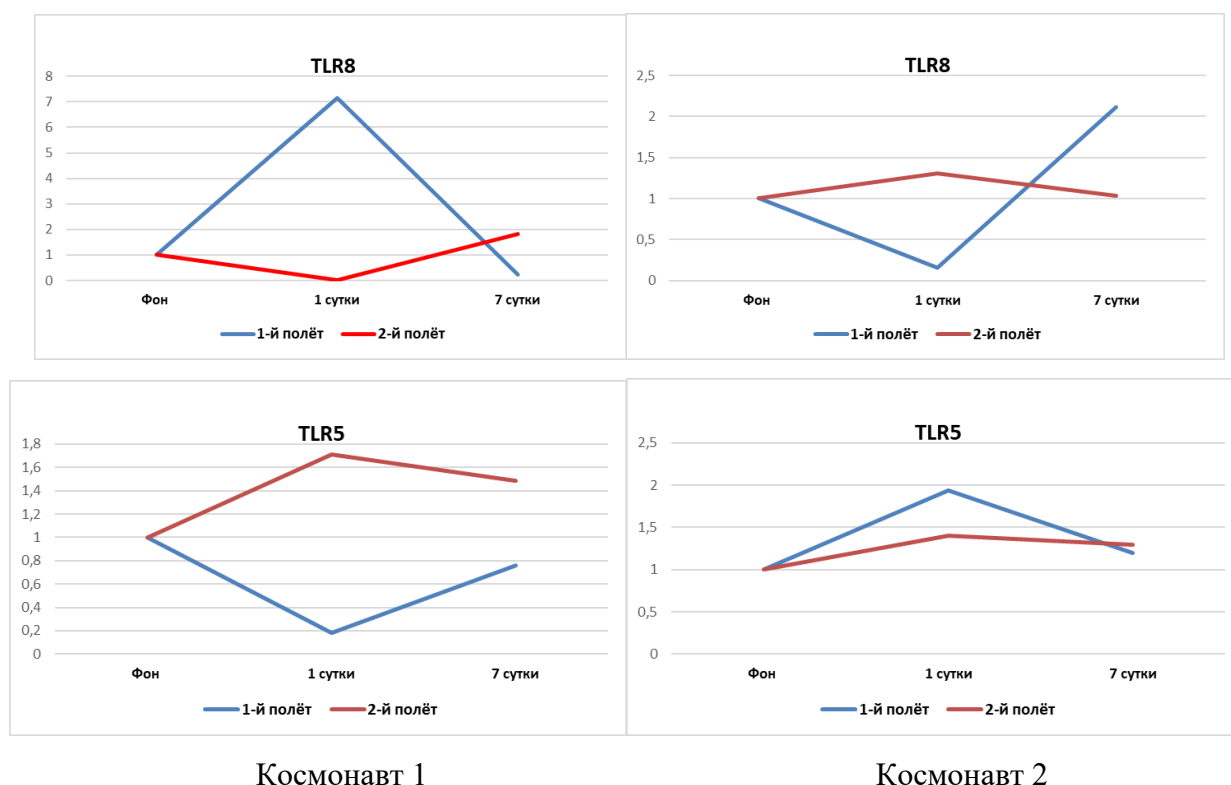


Рисунок 45. Изменение экспрессии TLR5 и TLR8 на моноцитах периферической крови у российских космонавтов после завершения длительных КП на МКС.

Полученные результаты демонстрируют, что изменения в иммунной системе человека после КП связаны, в первую очередь, с состоянием системы иммунитета в конкретный временной интервал. Интересно, что показатели, характеризующие состояние врождённого иммунитета, демонстрируют больший полиморфизм реакций по сравнению с приобретённым иммунитетом, что, по-видимому, связано с большей лабильностью системы естественной резистентности по сравнению с адаптивным звеном. Врождённый иммунитет является первой линией иммунной защиты организма от экзо и эндогенных угроз, который запускается ещё до инициации каскада реакций адаптивного звена иммунной системы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Влияние факторов, ассоциированных с КП, на иммунную систему организма человека является одним из направлений глобальной проблемы изучения воздействий условий окружающей среды на иммунитет человека. Влияния на иммунную систему человека можно условно разделить на специфические и неспецифические. В случае специфических воздействий рассматривается взаимодействие иммунной системы с различного рода микроорганизмами, вирусами, грибами или с изменёнными собственными тканями организма, в частности, с раковыми клетками. В этой ситуации происходит развитие иммунного ответа, в конечном итоге приводящего к уничтожению и элиминации чужеродной или изменённой антигенной структуры. В случае неспецифических воздействий наблюдается реакция со стороны различных компонентов иммунной системы, приводящей к изменению её функционирования. Работу системы иммунитета упрощённо можно представить в виде двух моделей: замковой и векторно-стохастической (Ponomarev S.A. et al 2022) (рисунок 46).



Рисунок 46. Принципиальная схема работы иммунной системы и данные о спонтанном синтезе цитокинов в 24-часовых культурах моноцитов периферической крови в 21-суточной СИ и повседневном режиме труда и отдыха (PTO), индивидуальные данные.

Замковая модель представляет собой ряд анатомических и физиологических барьеров, стоящих на пути патологического антигена инфекционной и неинфекционной природы, начиная с барьерных тканей, различного рода защитных гуморальных факторов, колонизационных барьеров эндогенной микрофлоры (Ильин В.К. и др. 2005), а также врождённого и адаптивного иммунитета, где адаптивный иммунитет играет роль последнего бастиона защиты в случае, если другие системы резистентности не смогли справиться с возникшей угрозой. По сути, замковая модель описывает классическое развитие иммунного ответа. В настоящей работе была выдвинута гипотеза о том, что функционирование иммунной системы человека во время экстремальных воздействий различного генеза, в первую очередь, ассоциированных с космическим полётом, объективировано в комплексной, часто разнонаправленной молекулярно-клеточной реакции её отдельных компонентов. Она может кардинально отличаться у одного и того же человека в разные периоды времени и не является специфичной для рассмотренных действующих факторов. В целях иллюстрации настоящей гипотезы применительно к воздействию экстремальных факторов окружающей среды была разработана векторно-стохастическая модель, наглядно демонстрирующая естественные колебания (циклы увеличения-уменьшения) различных факторов иммунитета с течением времени и иллюстрирующая индивидуальные для каждого человека коридоры этих изменений. Иммунная система находится в динамическом равновесии с внутренней и внешней средой, что обуславливает естественный фон колебания различных её компонентов. Стрессорные факторы различного генеза создают некий направляющий вектор, который может выводить параметры, характеризующие систему иммунитета за пределы данного коридора, как в сторону увеличения, так и в сторону уменьшения их количественных значений. Также воздействие может не приводить к выходу показателей иммунитета за пределы индивидуального коридора значений, но при этом наблюдается их изменение, как в сторону повышения, так и в сторону снижения относительно исходного уровня, то есть их изменения не переходят черту фоновых значений, оставаясь в верхнем или нижнем пределе. Кроме того, экстремальное воздействие имеет свойство синхронизировать естественные флуктуации у группы людей, находящихся в одних и тех же условиях (рисунок 46). Такого рода изменения являются предрасполагающим фактором развития нарушений функционирования иммунной системы, таким как иммунодефицитные состояния (Makedonas et al, 2020), аллергические или аутоиммунные заболевания (Bucheim et al, 2017).

Как было отмечено ранее, вплоть до настоящего момента существовало два глобальных вопроса иммунологии экстремальных воздействий, в частности, космической иммунологии. Первый заключается в механизмах воздействия экстремальных факторов среды обитания на иммунную систему. В настоящий момент существует несколько теорий, объясняющих

воздействие факторов окружающей среды на иммунную систему организма человека. Первая теория говорит о том, что действия такого рода факторов реализуется через нейроэндокринную систему (Peters et al, 2021), в первую очередь, за счёт вовлечения β 2-адренорецепторов и глюкокортикоидных рецепторов, встречающихся практически на всех клетках системы иммунитета (Walsh et al 2021).

Вторая теория, объясняющая выявляемые при действии экстремальных факторов изменения, приводит убедительные доказательства прямого действия факторов окружающей среды на клетки. Наглядным примером в данном случае является реальное или моделируемое изменение гравитационных условий (Moser D et al 2019, Ludka D et al, 2021), а также гипербарические воздействия (Matsuo H et al 2000, De Wolde et al, 2021). Механизмы действия разных уровней гравитации на клетки иммунной системы могут реализовываться через нарушение структуры клеточного цитоскелета, вовлечение механочувствительных ионных каналов (Häder DP et al, 2017), из-за изменения ферментативной активности во время инициации каскада реакций проведения сигнала внутри клетки (Dhar S et al. 2021), и даже мембраны клеточного ядра (Selezneva A et al 2022). В случае гипербарических воздействий действие физического фактора может быть связано с повреждениями мембраны (Shinomiya N et al 1994), а также с изменениями в экспрессии генов, опосредованными активными формами кислорода и азота (Kendall AC et al 2012).

Вероятно, в случае действия факторов КП и других экстремальных воздействий, может быть вовлечено сразу несколько механизмов, связанных с прямым и опосредованным влиянием условий на систему иммунитета. Факт прямого действия экстремальных факторов на клеточные эффекторы иммунной системы имеет важное значение с точки зрения разработки новых перспективных средств и методов профилактики негативных изменений в системе иммунитета человека.

Второй важный вопрос иммунологии экстремальных воздействий заключается в том, с чем связан полиморфизм реакций на одни и те же воздействия у разных людей, то есть является ли это генетически детерминированной особенностью, когда иммунная система человека в ответ на неспецифическое воздействие всегда реагирует повышением или снижением тех или иных показателей, характеризующих иммунный статус, либо вызываемые действием факторов окружающей среды изменения зависят в большей степени от состояния иммунной системы в конкретный временной интервал, то есть её баланса с другими физиологическими системами организма, микрофлорой и собственными клеточными компонентами с изменённой антигенной структурой. Результаты повторного обследования испытуемых-добровольцев в наземных модельных экспериментах, а также космонавтов после завершения длительных КП, позволяют с уверенностью утверждать, что ответ на второй вопрос найден. Описываемые в рамках

волновой модели изменения демонстрируют флуктуацию показателей, характеризующих состояние системы иммунитета как в сторону увеличения, так и уменьшения их значений. У одних и тех же испытуемых-добровольцев или космонавтов, выявляемые изменения одних и тех же показателей в разные периоды времени могут кардинально отличаться как степенью выраженности, так и общей направленностью динамики, что свидетельствует о ключевой роли состояния иммунитета в конкретный временной интервал.

Понимание процессов, происходящих в иммунной системе человека при действии экстремальных факторов среды обитания, создаёт основу для поиска новых перспективных подходов к профилактике и коррекции дисфункции иммунитета лиц, чья профессиональная деятельность неразрывно связана с воздействием экстремальных факторов окружающей среды, включая космонавтов, подводников и участников полярных зимовок. Полученные данные, помимо космической и экстремальной медицины, могут быть использованы для разработки персонализированного подхода селективной коррекции, направленной на поддержание тех компонентов иммунной системы человека, которые претерпевают наиболее выраженные негативные изменения в результате стрессорных воздействий различного генеза с целью предотвращения развития болезни или сокращения периода её течения.

ВЫВОДЫ

1. Трёхминутная экспозиция в воздушной криосауне при -70°C оказывает существенное, преимущественно активирующее влияние на иммунную систему организма человека.
2. 16-часовое пребывание в ослабленном в 500 раз по сравнению с земным магнитным полем не вызывает существенных изменений в работе иммунной системы человека.
3. Процесс адаптации иммунной системы человека к условиям изоляции в гермообъекте с искусственной средой обитания различной продолжительности, а также 21-суточной “сухой” иммерсии сопровождается комплексными разнонаправленными молекулярно-клеточными изменениями показателей врождённого и адаптивного иммунитета.
4. Пребывание в гермообъекте с кислородно-азотно-аргоновой гипоксической газовой смесью при избыточном давлении приводит к преимущественному увеличению содержания в периферической крови клеточных факторов адаптивного и врождённого иммунитета.
5. Искусственная сила тяжести в 2-2.5g на уровне стоп, генерируемая при помощи часового вращения на ЦКР, не приводит к значимым изменениям в системе адаптивного и врождённого иммунитета, что позволяет рассматривать ЦКР как перспективное средство для разработки системы профилактики негативного воздействия эффектов микрогравитации на организм человека.
6. Длительные КП приводят к разнонаправленным молекулярно-клеточным изменениям во врождённом и адаптивном компонентах иммунной системы человека, с преобладанием процессов активации.
7. Повторные воздействия экстремальных условий на иммунную систему одного и того же человека способны вызывать разнонаправленную реакцию со стороны одних и тех же параметров, характеризующих состояние иммунной системы.
8. Изменения в работе иммунной системы человека во время экстремальных воздействий проявляется на разных этапах иммунного процесса, включая количественные изменения содержания в периферической крови иммунокомпетентных клеток, плотности рецепторов, трансдукции сигнала от мембранного или цитоплазматического рецептора в клеточное ядро и функциональной активности клеток врождённого и адаптивного иммунитета.
9. Выявляемые изменения в работе иммунной системы на разных этапах развития иммунного процесса при действии на организм человека экстремальных факторов среды обитания позволяют рекомендовать использование комплекса профилактических, а

также корректирующих мероприятий и средств, направленных на поддержание иммунного гомеостаза.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

APC- antigen-presenting cell
BTK - Bruton tyrosine kinase
CASP8 – caspase 8
CCL2 - C-C motif ligand 2
CD14 – cluster of differentiation 14
C-FOS – Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit
CHUK (IKKA) – component of inhibitor of nuclear factor kappa B kinase complex (inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit alpha)
CLEC4E – C-type lectin domain family 4 member E
CSF3 – colony stimulating factor 3
CXCL5 - C-X-C Motif Chemokine Ligand 5
FADD – Fas associated via death domain
Fitc – fluorescein isothiocyanate
GM-CSF- granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
Gran-granulocyte
HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HMGB1 – high mobility group box 1
HSPD1 – heat shock protein family D (Hsp60) member 1
HSP–heat shock protein
IL- interleukin
IFN-interferon
IRAK1 – interleukin 1 receptor associated kinase 1
IRAK4 – interleukin 1 receptor associated kinase 4
IRF1 – interferon regulatory factor 1
IRF5 – interferon regulatory factor 5
IκB – inhibitor of κ light chain gene enhancer in B cells
LTA – lymphotoxin alpha
LY96 - Lymphocyte Antigen 96
MAP3K1 – mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1
MAP3K14 – mitogen-activated protein kinase kinase kinase 14
MAPK13 – mitogen-activated protein kinase 13

MD-2 - Myeloid Differentiation Protein-2

MIP- Macrophage Inflammatory Protein

MKK3 – mitogen-activated protein kinase kinase 3

MKK4 – mitogen-activated protein kinase kinase 4

Mon-monocyte

MyD88 - myeloid differentiation primary response gene 88

NFKBIA – NFkB inhibitor alpha

NF-κB – nuclear factor-κB

NK-natural killer cell

NKT-natural killer t cell

NLR-nod-like receptor

PAMP –pathogen-associated molecular patterns

PE – phycoerythrin

PELI1 – pellino E3 ubiquitin protein ligase 1

PRKRA – protein activator of interferon induced protein kinase EIF2AK2

PRP1 – pre-mRNA processing gene

PRR– pattern recognition receptor

RELA – RELA proto-oncogene, NF-kB subunit (v-rel avian reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A)

RIP2 - receptor-interacting protein 2

RLR-rig-like receptor

RT-PCR- real time polymerase chain reaction

SARM – sterile α and HEAT-Armadillo motifs-containing protein

TAK1 - transforming growth factor-β-activated kinase 1

TANK - TRAF family member-associated NF-κB activator

TBK1 - TANK binding kinase 1

Th-t-helper cell

TIRAP/Mal – TIR domain-containing adaptor protein / MyD88-adapte-like

TLR – Toll-like receptor

TNFRSF1A – TNF receptor superfamily member 1A

TNF-tumor necrosis factor

TONSL – tonsoku like, DNA repair protein (nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor-like 2)

TRAF6 - TNF receptor-associated factor 6

TRAM/TICAM-2 – TRIF-related adaptor molecule/TIR domain-containing adaptor molecule 2

TRIF/TICAM-1 – TIR domain-containing adaptor inducing IFN- β /TIR domain-containing adaptor molecule 1

UBE2N - Ubiquitin Conjugating Enzyme E2 N

UEV1A - ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1 isoform A

АФК-активные формы кислорода

ГБК-глубоководный водоллазный комплекс

ГМУ-гипомагнитные условия

Гр –гранулоциты

ЕК– лимфоциты естественные киллеры

ИЛ– интерлейкин

ИСТ-искусственная сила тяжести

ИФН– интерферон

КП – космический полёт

ЛПС – липополисахарид

МКС – Международная космическая станция

Мн – моноциты

МНК– моноклассные клетки

НЭК-наземный экспериментальный комплекс

ПЦР-полимеразная цепная реакция

СИ – «сухая» иммерсия

ФГА – фитогемагглютинин

ФНО – фактор некроза опухолей

ЦКР-центрифуга короткого радиуса

ЭДТА- этилендиаминтетрауксусная кислота

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Adak A, Khan MR An insight into gut microbiota and its functionalities.// Cell Mol Life Sci. 2019 Feb;76(3):473-493
2. Ahlen C, Mandal LH, Iversen OJ. The impact of environmental *Pseudomonas aeruginosa*
3. Ahrens S, Zelenay S, Sancho D, Hanc P, Kjaer S, Feest C, et al. F-actin is an evolutionarily conserved damage-associated molecular pattern recognized by DNGR-1, a receptor for dead cells. Immunity. 2012;36(4):635–45.
4. Allebban Z, Ichiki AT, Gibson LA, Jones JB, Congdon CC, Lange RD Effects of spaceflight on the number of rat peripheral blood leukocytes and lymphocyte subsets.// J Leukoc Biol 1994 55(2):209–213
5. Alvarez AH, Martínez Velázquez M, Prado Montes de Oca E./Human β -defensin 1 update: Potential clinical applications of the restless warrior// Int J Biochem Cell Biol. 2018 Nov;104:133-137.
6. Al-Waili NS, Butler GJ. Effects of hyperbaric oxygen on inflammatory response to wound and trauma: possible mechanism of action. Sci World J. 2006;6:425–41.
Argon induces protective effects in cardiomyocytes during the second window of preconditioning. Int J Mol Sci. 2016;17
7. Asea A. Heat shock proteins and toll-like receptors Handb Exp Pharmacol. 2008;(183):111-27.
8. Badolati I, Sverremark-Ekström E, van der Heiden M.// Th9 cells in allergic diseases: A role for the microbiota? Scand J Immunol. 2020 Apr;91(4):e12857. doi: 10.1111/sji.12857. Epub 2019 Dec 23.
9. Banfi G, Melegati G, Barassi A, et al. Effects of whole-body cryotherapy on serum mediators of inflammation and serum muscle enzymes in athletes. J Thermal Biol 2009; 34: 55-9
10. Bansal A, Henao-Mejia J, Simmons RA. Immune System: An Emerging Player in Mediating Effects of Endocrine Disruptors on Metabolic Health //Endocrinology. 2018 Jan 1;159(1):32-45
11. Bascove M, Gueguinou N, Schaerlinger B, Gauquelin-Koch G, Fripiat JP Decrease in antibody somatic hypermutation frequency under extreme, extended spaceflight conditions. // FASEB J 2011 25:2947–2955.
12. Bascove M, Guéguinou N, Schaerlinger B, Gauquelin-Koch G, Fripiat JP Decrease in antibody somatic hypermutation frequency under extreme, extended spaceflight conditions. // FASEB J 25:2947–2955.

13. Bascove M, Huin-Schohn C, Guéguinou N, Tschirhart E, Frippiat JP Spaceflight-associated changes in immunoglobulin VH gene expression in the amphibian *Pleurodeles waltl*. // 2009 FASEB J 23:1607–1615.
14. Battista N., Meloni, M. A., Bari M., Mastrangelo N., Galleri G., Rapino C., Dainese E., Finazzi A., Pippia P., Maccarrone M. 5-Lipoxygenase-dependent apoptosis of human lymphocytes in the International Space Station: data from the ROALD experiment // The FASEB Journal.- 2012.- V. - 26 (5). - P. 1791–1798.
15. Bauer ME, Fuente Mde L The role of oxidative and inflammatory stress and persistent viral infections in immunosenescence. // Mech Ageing Dev 2016 158:27–37.
16. Becker M, Serr I, Salb VK, Ott VB, Mengel L, Blüher M, Weigmann B, Hauner H, Tschöp MH, Daniel C. Short-term cold exposure supports human Treg induction in vivo// Mol Metab. 2019 Oct;28:73-82.
17. Benjamin CL, Stowe RP, St John L, Sams CF, Mehta SK, Crucian BE, Pierson DL, Komanduri KV. Decreases in thymopoiesis of astronauts returning from space flight// JCI Insight. 2016 Aug 4;1(12):e88787.
18. Beutler B. // Innate immunity: an overview. Mol Immunol. 2004 Feb;40(12):845-59. doi: 10.1016/j.molimm.2003.10.005.
blood white cells in acute otitis media. // Otolaryngol Pol. 2014. V.68. P. 77-82. doi: 10.1016/j.otpol.2013.06.006. Epub 2013 Jun 28.
19. Borrego F, Peña J, Solana R. Regulation of CD69 expression on human natural killer cells: differential involvement of protein kinase C and protein tyrosine kinases // Eur J Immunol. 1993 May;23(5):1039-43.
20. Bosch JA, Berntson GG, Cacioppo JT, Marucha PT. Differential mobilization of functionally distinct natural killer subsets during acute psychologic stress. // Psychosom Med. May-Jun 2005;67(3):366-75
21. Bottazzi B, Doni A, Garlanda C, Mantovani A. An integrated view of humoral innate immunity: pentraxins as a paradigm// Annu Rev Immunol. 2010;28:157-83.
22. Boxio R, Dournon C, Frippiat JP Effets of a long-term spaceflight on immunoglobulin heavy chains of the urodele amphibian *Pleurodeles waltl*. // J Appl Physiol 2005 98:905–910
23. Bradley JH, Stein R, Randolph B, Molina E, Arnold JP, Gregg RK T cell resistance to activation by dendritic cells requires long-term culture in simulated microgravity. // Life Sci Space Res 2017 (Amst) 15:55–61.
Brain Behav Immun. 2016 Mar;53:172-182.

24. Branzk N, Lubojemska A, Hardison SE, Wang Q, Gutierrez MG, Brown GD, Neutrophils sense microbe size and selectively release neutrophil extracellular traps in response to large pathogens. // *Nat Immunol.* 2014 Nov;15(11):1017-25
25. Brazaitis M, Eimantas N, Daniuseviciute L, Daniuseviciute L., Mickeviciene D., Steponaviciute R., Skurvydas A. Two Strategies for Response to 140C Cold-Water Immersion: Is there a Difference in the Response of Motor, Cognitive, Immune and Stress Markers? *PLoS One.* 2014 Oct 2;9(9)
26. Breen M., Bethell N., Mujica-Parodi L., Carlson J, Ensign W, Woelk C., Rana B. Acute psychological stress induces short-term variable immune response. //
27. Brenner I, Shephard RJ, Shek PN. 1999. Immune function in hyperbaric environments, diving, and decompression. *Undersea Hyperb Med* 26: 27–39
28. Brisse M, Ly H. Comparative Structure and Function Analysis of the RIG-I-Like Receptors: RIG-I and MDA5 // *Front Immunol.* 2019 Jul 17;10:1586.
29. Broussard CL. Hyperbaric oxygenation and wound healing. // *J Vasc Nurs.* 2004;22:42–8.175-96
30. Buchheim JI, Ghislin S, Ouzren N, Albuissou E, Vanet A, Matzel S, Ponomarev S, Rykova M, Choukèr A, Fripiat JP. Plasticity of the human IgM repertoire in response to long-term spaceflight // *FASEB J.* 2020 Dec;34(12):16144-16162.
31. Buchheim JI, Hoskyns S, Moser D, Han B, Deindl E, Hörl M, Biere K, Feuerecker M, Schelling G, Choukèr A. Oxidative burst and Dectin-1-triggered phagocytosis affected by norepinephrine and endocannabinoids: implications for fungal clearance under stress // *Int Immunol.* 2018 Mar 8;30(2):79-89.
32. Buchheim J-I, Matzel S, Rykova M, Vassilieva G., Ponomarev S., Nichiporuk I., Horl M., Moser D., Biere K., Feuerecker M., Schelling G., Thieme D., Kaufmann I., Thiel M., Choukèr A. Stress Related Shift Toward Inflammaging in Cosmonauts After Long-Duration Space Flight // *Front Physiol.* 2019 Feb 19;10:85.
33. Buravkova L.B., Grigorieva O.V., Rykova M.P. The effects of microgravity on the in vitro NK cell function during six International Space Station Missions) // *Bremen Microgravity Science and Technology.* - 2007. - V.19. - №2. –P.45-47.
34. Buscher K, Marcovecchio P, Hedrick CC, Ley K Patrolling Mechanics of Non-Classical Monocytes in Vascular Inflammation// *Front Cardiovasc Med.* 2017 Dec 19;4:80.
35. Cabral-Marques O, Schimke LF, de Oliveira EB Jr, El Khawanky N, Ramos RN, Al-Ramadi BK, Segundo GRS, Ochs HD, Condino-Neto A. Flow Cytometry Contributions for the Diagnosis and Immunopathological Characterization of Primary Immunodeficiency Diseases With Immune Dysregulation. // *Front Immunol.* 2019 Nov 26;10:2742.

36. Capellino S, Claus M, Watzl C Regulation of natural killer cell activity by glucocorticoids, serotonin, dopamine, and epinephrine// *Cell Mol Immunol*. 2020 Jul;17(7):705-711.
37. Cariappa MP, Dutt M, Reddy KP, Mukherji S. 'Health, Environment and Training': Guidance on conduct of physical exertion in hot and humid climates // *Med J Armed Forces India*. 2018 Oct;74(4):346-351
38. Castanheira FVS, Kubes P. Neutrophils and NETs in modulating acute and chronic inflammation // *Blood*. 2019 May 16;133(20):2178-2185.
39. Chang T.T., Walther I., Li C-F., Boonyaratanakornkit J., Galleri G., Meloni M.A., Pippia P., Cogoli A., Hughes-Fulford M. The Rel/NF-kappaB pathway and transcription of immediate early genes in T cell activation are inhibited by microgravity // *J Leukoc Biol*. - 2012. - V.92. - P.1133–1145.
40. Chapes SK, Morrison DR, Guikema JA, Lewis ML, Spooner BS Production and action of cytokines in space. // *Adv Space Res* 1994 14(8):5–9
41. Chapes SK, Simske SJ, Forsman AD, Bateman TA, Zimmerman RJ Effects of space flight and IGF-1 on immune function.// *Adv Space Res* 1999a 23(12):1955–1964
42. Chapes SK, Simske SJ, Sonnenfeld G, Miller ES, Zimmerman RJ (1999b) Effects of spaceflight and PEG-IL-2 on rat physiological and immunological responses. *J Appl Physiol* 1999b 86(6):2065–2076
43. Cho JH, Fraser IP, Fukase K, Kusumoto S, Fujimoto Y, Stahl GL, Ezekowitz RA. Human peptidoglycan recognition protein S is an effector of neutrophil-mediated innate immunity// *Blood*. 2005 Oct 1;106(7):2551-8.
44. Choukèr A, Smith L, Christ F et al Effects of confinement (110 and 240 days) on neuroendocrine stress response and changes of immune cells in men. // *J Appl Physiol* 2002 92:1619–1627
45. Choukèr A, Thiel M, Baranov V, Meshkov D, Kotov A, Peter K, Messmer K, Christ F. Simulated microgravity, psychic stress, and immune cells in men: observations during 120-day 6 degrees HDT // *J Appl Physiol* (1985). 2001 May;90(5):1736-43.
46. Cibrián D, Sánchez-Madrid F. CD69: from activation marker to metabolic gatekeeper // *Eur J Immunol*. 2017 Jun;47(6):946-953.
47. Clark J.E. Moving in extreme environments: Inert gas narcosis and underwater activities. *Extrem Physiol Med*. 2015; 4(1):1–7. DOI: 10.1186/s13728-014-0020-7.
48. Claus M, Dychus N, Ebel M, et al. Measuring the immune system: a comprehensive approach for the analysis of immune functions in humans. *Arch Toxicol*. 2016 Oct;90(10):2481-95. doi: 10.1007/s00204-016-1809-5
49. Cogoli A, Tschopp A, Fuchs-Bislin P Cell sensitivity to gravity. // *Science* 1984 225:228–230

50. Cohrs RJ, Mehta SK, Schmid DS, Gilden DH, Pierson DL. Asymptomatic reactivation and shed of infectious varicella zoster virus in astronauts // *J Med Virol*. 2008 Jun;80(6):1116-22.
51. Collin M, Ginhoux F. Human dendritic cells // *Semin Cell Dev Biol* . 2019 Feb; 86:1-2.
52. Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA The biology of human natural killer-cell subsets. // *Trends Immunol* 2001 22:633–664
53. Costa S, Bevilacqua D, Cassatella MA, Scapini P. Recent advances on the crosstalk between neutrophils and B or T lymphocytes // *Immunology*. 2019 Jan;156(1):23-32.
54. Cronkite DA, Strutt TM. The Regulation of Inflammation by Innate and Adaptive Lymphocytes // *J Immunol Res*. 2018 Jun 11;2018:1467538.
55. Crucian B, Babiak-Vazquez A, Johnston S, Pierson DL, Ott CM, Sams C Incidence of clinical symptoms during long-duration orbital spaceflight. // 2016 *Int J Gen Med* 9:383–391.
56. Crucian B, Johnston S, Mehta S, Stowe R, Uchakin P, Quiriarte H, Pierson D, Laudenslager ML, Sams C. A case of persistent skin rash and rhinitis with immune system dysregulation onboard the International Space Station // *J Allergy Clin Immunol Pract*. Jul-Aug 2016;4(4):759-762.e8.
57. Crucian B, Simpson RJ, Mehta S, Stowe R, Chouker A, Hwang SA, Actor JK, Salam AP, Pierson D, Sams C. Terrestrial stress analogs for spaceflight associated immune system dysregulation.// *Brain Behav Immun*. 2014 Jul;39:23-32.
58. Crucian B, Stowe R, Mehta S, Uchakin P, Quiriarte H, Pierson D, Sams C Immune system dysregulation occurs during short duration spaceflight on board the space shuttle. // *J Clin Immunol* 2013 33(2):456–465
59. Crucian B, Stowe RP, Mehta S, Quiriarte H, Pierson D, Sams C Alterations in adaptive immunity persist during long-duration spaceflight. // *NPJ Microgravity* 2015 1:15013.
60. Crucian B, Valentine R, Calaway K, Miller R, Rubins K, Hopkins M, Salas Z, Krieger S, Makedonas G, Nelman-Gonzalez M, McMonigal K, Perusek G, Lehnhardt K, Easter B. Spaceflight validation of technology for point-of-care monitoring of peripheral blood WBC and differential in astronauts during space missions // *Life Sci Space Res (Amst)*. 2021 Nov;31:29-33.
61. Crucian B., Choukèr A., Simpson R. Mehta S, Marshall G., Smith S., Zwart S., Heer M., Ponomarev S., Whitmire A, Frippiat J-P., Douglas G., Lorenzi H, Buchheim J-I, Makedonas G., Ginsburg G, Ott M, Pierson D., Krieger S., Baecker N., and Sams C. Immune System Dysregulation During Spaceflight: Potential Countermeasures for Deep Space Exploration Missions // *Front Immunol* – 2018-; Vol. 9 Art. 1437.

62. Crucian BE, Cubbage ML, Sams CF Altered cytokine production by specific human peripheral blood cell subsets immediately following space flight. // J. Interf 2000 Cytokine Res 20(6):547–556
63. Crucian BE, Stowe RP, Mehta SK, Yetman DL, Leal MJ, Quiriarte HD, Pierson DL, Sams CF. Immune status, latent viral reactivation, and stress during long-duration head-down bed rest. // Aviat Space Environ Med. 2009 May;80(5 Suppl): A37-44.
64. Crucian BE, Stowe RP, Pierson DL, Sams CF Immune system dysregulation following short- vs long-duration spaceflight. // Aviat Space Environ Med 2008 79(9):835–843
65. Crucian BE, Zwart SR, Mehta S, Uchakin P, Quiriarte HD, Pierson D, Sams CF, Smith SM Plasma cytokine concentrations indicate that in vivo hormonal regulation of immunity is altered during long-duration spaceflight. // 2014 J. Interf Cytokine Res 34(10):778–786.
66. Dabrowska AK, Spano F, Derler S, Adlhart C, Spencer ND, Rossi RM. The relationship between skin function, barrier properties, and body-dependent factors // Skin Res Technol. 2018 May;24(2):165-174.
67. D'Agostino DP, Colomb DG Jr, Dean JB. Effects of hyperbaric gases on membrane nanostructure and function in neurons. // J Appl Physiol (1985). 2009 Mar;106(3):996-1003
68. Dantzer R. Neuroimmune Interactions: From the Brain to the Immune System and Vice Versa // Physiol Rev.- 2018- Vol. 98 №1 P. 477–504.
69. David HN, Haelewyn B, Risso JJ, Abraini JH. Modulation by the noble gas argon of the catalytic and thrombolytic efficiency of tissue plasminogen activator. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 2013;386:91–5.
70. De Giorgio D., Magliocca A., Fumagalli F., Novelli D., Olivari D., Staszewsky L., et al. Ventilation with the noble gas argon in an in vivo model of idiopathic pulmonary arterial hypertension in rats. Med Gas Res. 2021;11(3):124–5. DOI: 10.4103/2045-9912.314333.
71. De Paepe B. Progressive Skeletal Muscle Atrophy in Muscular Dystrophies: A Role for Toll-like Receptor-Signaling in Disease Pathogenesis // Int J Mol Sci 2020 Jun 22;21(12):4440
72. de Vries RD, Nieuwkoop NJ, Pronk M, de Bruin E, Leroux-Roels G, Huijskens EGW, van Binnendijk RS, Krammer F, Koopmans MPG, Rimmelzwaan GF Influenza virus-specific antibody dependent cellular cytotoxicity induced by vaccination or natural infection // Vaccine. 2017 Jan 5;35(2):238-247.
73. De Wolde SD, Hulskes RH, Weenink RP, Hollmann MW, Van Hulst RA. The Effects of Hyperbaric Oxygenation on Oxidative Stress, Inflammation and Angiogenesis. Biomolecules (2021) 11(8):1210. doi: 10.3390/biom11081210
74. Decaestecker E, Gaba S, Raeymaekers JA, Stoks R, Van Kerckhoven L, Ebert D, et al. Host-parasite ‘Red Queen’ dynamics archived in pond sediment. Nature. 2007;450(7171):870–3.

75. Dhar S, Kaeley DK, Kanan MJ, Yildirim-Ayan E. Mechano-Immunomodulation in Space: Mechanisms Involving Microgravity-Induced Changes in T Cells. *Life (Basel)*. 2021 Oct 3;11(10):1043. doi: 10.3390/life11101043.
76. Djurhuus R, Nossum V, Lundsett N, Hovin W, Svardal AM, Havnes MB, Fismen L, Hjelde A, Brubakk AO Simulated diving after heat stress potentiates the induction of heat shock protein 70 and elevates glutathione in human endothelial cells // *Cell Stress Chaperones*. 2010 Jul;15(4):405-14.
77. Domoto H, Iwaya K, Ikomi F, Matsuo H, Tadano Y, Fujii S, Tachi K, Itoh Y, Sato M, Inoue K, Shinomiya N. Up-Regulation of Antioxidant Proteins in the Plasma Proteome during Saturation Diving: Unique Coincidence under Hypobaric Hypoxia // *PLoS One*. 2016 Oct 14;11(10)
78. Doni A, D'Amico G, Morone D, Mantovani A, Garlanda C. Humoral innate immunity at the crossroad between microbe and matrix recognition: The role of PTX3 in tissue damage// *Semin Cell Dev Biol*. 2017 Jan;61:31-40.
79. Dopp JM, Miller GE, Myers HF et al Increased natural killer-cell mobilization and cytotoxicity during marital conflict. *Brain Behav Immun* 2000 Mar; 14(1):10-26
80. Dorofteiu M., Morariu V.V., Marina C., Zirbo M. The effects of near null magnetic field upon the leucocyte response in rats. // *Cytobios*.1995;84(338-339):179-89
81. Dragoş D, Tănăsescu MD The effect of stress on the defense systems. // *J Med Life*. 2010 Jan-Mar;3(1):10-8.
82. Du K, Liu J, Broering R, Zhang X, Yang D, Dittmer U, Lu M. Recent advances in the discovery and development of TLR ligands as novel therapeutics for chronic HBV and HIV infections // *Expert Opin Drug Discov*. 2018 Jul;13(7):661-670.
83. Duan T, Du Y, Xing C, Wang HY, Wang RF Toll-Like Receptor Signaling and Its Role in Cell-Mediated Immunity// *Front Immunol*. 2022 Mar 3;13:812774.
84. Dumpa V, Bhandari V. Surfactant, steroids and non-invasive ventilation in the prevention of BPD//*Semin Perinatol*. 2018 Nov;42(7):444-452
85. Eckenhoff RG, Hughes JS. Hematologic and hemostatic changes with repetitive air diving. // *Aviat Space Environ Med*. 1984;55:592–7.
86. Eckes B, Dogic D, Colucci-Guyon E, Wang N, Maniotis A, Ingber D, Merckling A, Langa F, Aumailley M, Delouvé A, Koteliansky V, Babinet C, Krieg T. Impaired mechanical stability, migration and contractile capacity in vimentin-deficient fibroblasts. // *J Cell Sci* 1998;111:1897–1907
87. Eftedal I, et al. Acute and potentially persistent effects of scuba diving on the blood transcriptome of experienced divers. *Physiol Genomics*. 2013;45:965–72.

88. Eftedal I, Flatberg A, Drvis I, Dujic Z. Immune and inflammatory responses to freediving calculated from leukocyte gene expression profiles. // *Physiol Genomics*. 2016;48:795–802.
89. Eigenbrod T, Park JH, Harder J, Iwakura Y, Nunez G. Cutting edge: critical role for mesothelial cells in necrosis-induced inflammation through the recognition of IL-1 alpha released from dying cells. *J Immunol*. 2008;181(12):8194–8.
90. Evans W. NK cell recruitment and exercise: Potential immunotherapeutic role of shear stress and endothelial health // *Med Hypotheses*. 2017 Nov;109:170-173.
91. Fernandes JS, Araujo MI, de Almeida TVVS, Andrade LS, Lopes DM, de Mello LM, Carvalho EM, Cruz AA, Cardoso LS Impaired immunoregulatory network of the CD4 T lymphocytes in refractory asthma // *Clin Exp Allergy*. 2019 May;49(5):644-654.
92. Fernandez-Gonzalo R., Baatout S., Moreels M. Impact of Particle Irradiation on the Immune System: From the Clinic to Mars // *Front Immunol*. 2017 Feb 22;8:177
93. Feuerecker, M., Crucian, B., Salam, A., Schmitt, D., Stowe, R., Morrels, M., Mehta, S., Strewe, C., Martignoni, A., Quintens, R., Kaufmann, I., Schelling, G., Baatout, S., Abbal, M., Thiel, M., Pierson, D., Sams, C., Chouker, A., Consequences of longterm Confinement and Hypobaric Hypoxia on Immunity in the Antarctic Concordia Environment (CHOICE): a hypoxia controlled field study to prepare for manned exploration class mission. // 2012 In: *Life in Space for Life on Earth – 12th European Life Sciences Symposium 33rd Annual International Gravitational Physiology Meeting*, vol. June 18–22, Aberdeen, United Kingdom.
94. Fitzgerald K.A., Kagan J.C. Toll-like Receptors and the Control of Immunity. *Cell*. 2020; 180(6):1044–66. DOI: 10.1016/j.cell.2020.02.041.
95. Fitzgerald W, Chen S, Walz C, Zimmerberg J, Margolis L, Grivel JC Immune suppression of human lymphoid tissues and cells in rotating suspension culture and onboard the International Space Station. // *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2009 45(10):622–632
96. Forcina L., Miano C., Scicchitano B-M. Signals from the Niche: Insights into the Role of IGF-1 and IL-6 in Modulating Skeletal Muscle Fibrosis // *Cells* 2019 Mar 11;8(3):232.
97. Frutoso M, Mortier E. NK Cell Hyporesponsiveness: More Is Not Always Better // *Int J Mol Sci*. 2019 Sep 12;20(18):4514.
98. Fuchs BB, Medvedev AE Countermeasures for ameliorating in-flight immune dysfunction. // *J Leukoc Biol* 1993 54(3):245–252
99. Gajendrareddy PK, Junges R, Cygan G, Zhao Y, Marucha PT, Engeland CG. Increased oxygen exposure alters collagen expression and tissue architecture during ligature-induced periodontitis. // *J Periodontal Res*. 2017;52(3):644–9.

100. Galimberti M, Leuenberger C, Wolf B, Szilágyi SM, Foll M, Wegmann D. Hypergravity speeds up the development of T-lymphocyte motility // *Genetics*. 2020 Dec;216(4):1205-1215.
101. Gardiner CM NK cell metabolism // *J Leukoc Biol*. 2019 Jun;105(6):1235-1242.
102. Gasperi V., Rapino C., Battista N., Bari M., Mastrangelo N., Angeletti S., Dainese E., Maccarrone M. A functional interplay between 5-lipoxygenase and μ -calpain affects survival and cytokine profile of human Jurkat T lymphocyte exposed to simulated microgravity // *Biomed Res Int*. – 2014. – 2014:782390.
103. Geckin B, Konstantin Föhse F, Domínguez-Andrés J, Netea MG. // Trained immunity: implications for vaccination. *Curr Opin Immunol*. 2022 Aug;77:102190. doi: 10.1016/j.coi.2022.102190. Epub 2022 May 18
- genotypes on skin infections in occupational saturation diving systems. // *Scand J Infect Dis*. 2001;33:413–9.
104. Gezina TML, Kirsten F Smit, Djai vd Vondervoort, Daniel Brevoord, Arjan Hoogendijk, Catharina W Wieland, Markus W Hollmann, Benedikt Preckel, Nina C Weber Effects of helium and air inhalation on the innate and early adaptive immune system in healthy volunteers ex vivo// *J Transl Med*. 2012; 10: 201. Published online 2012 Sep 24
105. Gmunder FK, Konstantinova I, Cogoli A, Lesnyak A, Bogomolov W, Grachov AW Cellular immunity in cosmonauts during long duration spaceflight on board the orbital MIR station. *Aviat Space Environ Med* 1994 65:419–423
106. Goldberg BS, Ackerman ME Antibody-mediated complement activation in pathology and protection // *Immunol Cell Biol*. 2020 Apr;98(4):305-317.
107. Gould CL, Lyte M, Williams J, Mandel AD, Sonnenfeld G Inhibited interferon-gamma but normal interleukin-3 production from rats flown on the space shuttle. // *Aviat Space Environ Med* 1987 58(10):983–986
108. Gridley DS, Nelson GA, Peters LL, Kostenuik PJ, Bateman TA, Morony S et al (2003) Genetic models in applied physiology: selected contribution: effects of spaceflight on immunity in the C57BL/6 mouse. II. Activation, cytokines, erythrocytes, and platelets. // *J Appl Physiol* 2003 94(5):2095–2103
109. Gridley DS, Slater JM, Luo-Owen X, Rizvi A, Chapes SK, Stodieck LS et al (2009) Spaceflight effects on T lymphocyte distribution, function and gene expression. // *J Appl Physiol* 2009 106(1):194–202
110. Grimm E, Bonavida B Mechanism of cell mediated cytotoxicity at the single cell level. I. Estimation of cytotoxic T lymphocyte frequency and relative lytic efficiency. // *J Immunol* 1979 123:2861–2868

111. Grondin JA, Kwon YH, Far PM, Haq S, Khan WI. Mucins in Intestinal Mucosal Defense and Inflammation: Learning From Clinical and Experimental Studies // *Front Immunol* 2020 Sep 4;11:2054.
112. Grudzien M, Rapak A. Effect of Natural Compounds on NK Cell Activation // *J Immunol Res*. 2018 Dec 25;2018:4868417.
113. Grywalska E, Bartkowiak-Emeryk M, Pasiarski M, Olszewska-Bożek K, Mielnik M, Podgajna M, Pieczykolan M, Hymos A, Fitas E, Surdacka A, Gózdź S, Roliński J. Relationship between the expression of CD25 and CD69 on the surface of lymphocytes T and B from peripheral blood and bone marrow of patients with chronic lymphocytic leukemia and established prognostic factors of this disease // *Adv Clin Exp Med*. 2018 Jul;27(7):987-999.
114. Gueguinou N, Huin-Schohn C, Bascove M, Bueb JL, Tschirhart E, Legrand-Frossi C. Could spaceflight-associated immune system weakening preclude the expansion of human presence beyond Earth's orbit? // *J Leukoc Biol* 2009 86(5):1027–1038
115. Guo D, Pan S, Wang M, Guo Y. Hyperbaric oxygen therapy may be effective to improve hypoxemia in patients with severe COVID-2019 pneumonia: two case reports// *Undersea Hyperb Med*. Second-Quarter 2020;47(2):181-187.
116. Häder DP, Braun M, Grimm D, Hemmersbach R. Gravireceptors in eukaryotes-a comparison of case studies on the cellular level. *NPJ Microgravity* (2017) 3:13. doi: 10.1038/s41526-017-0018-8
117. Häder DP, Braun M, Grimm D, Hemmersbach R. Gravireceptors in eukaryotes-a comparison of case studies on the cellular level // *NPJ Microgravity*. 2017 Apr 28;3:13
118. Hafner C, Qi H, Soto-Gonzalez L, Doerr K, Ullrich R, Tretter EV. Argon preconditioning protects airway epithelial cells against hydrogen peroxide-induced oxidative stress. *Eur Surg Res*. 2016;57:252–62.
119. Hashemi BB, Penkala JE, Vens C, Huls H, Cubbage M, Sams CF. T cell activation responses are differentially regulated during clinorotation and in spaceflight // *FASEB J*. 1999 Nov;13(14):2071-82.
120. Hawkins W, Zieglschmid J (1975) Clinical aspects of crew health. In: Johnston R, Dietlein L, Berry C (eds) *Biomedical results of Apollo*. // NASA, Washington, DC, pp 43–81
121. Heesterbeek DAC, Angelier ML, Harrison RA, Rooijackers SHM. Complement and Bacterial Infections: From Molecular Mechanisms to Therapeutic Applications// *J Innate Immun*. 2018;10(5-6):455-464.
122. Heintz-Buschart A, Wilmes P. Human Gut Microbiome: Function Matters // *Trends Microbiol*. 2018 Jul;26(7):563-574

123. Herranz R., Anken R., Boonstra J., Braun M., Christianen P.C.M., de Geest M., Hauslage J., Hilbig R., Hill R.J.A., Michael Lebert M., Medina F.J., Vagt N., Ullrich O., van Loon J.J.W.A., Hemmersbach R. Ground-based facilities for simulation of microgravity: organism-specific recommendations for their use, and recommended terminology // *Astrobiology*. - 2013. - V.13. - P.1–17.
124. Hetmann A, Kowalczyk S. Membrane receptors recognizing MAMP/PAMP and DAMP molecules that activate first line of defence in plant immune system// *Postepy Biochem*. 2018 Jun 30;64(1):29-45.
125. Hickey MJ, Kubes P Intravascular immunity: the host-pathogen encounter in blood vessels// *Nature Reviews. Immunology*. 2009 9 (5): 364–75.
126. Hoff P, Belavý DL, Huscher D, Lang A, Hahne M, Kuhlmeier AK, Maschmeyer P, Armbrrecht G, Fitzner R, Perschel FH, Gaber T, Burmester GR, Straub RH, Felsenberg D, Buttgerit F. Effects of 60-day bed rest with and without exercise on cellular and humoral immunological parameters // *Cell Mol Immunol*. 2015 Jul;12(4):483-92.
127. Hoffmann C, Weigert C. Skeletal Muscle as an Endocrine Organ: The Role of Myokines in Exercise Adaptations. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2017 Nov 1;7(11):a029793. doi: 10.1101/cshperspect.a029793
128. Hofman P, d'Andrea L, Guzman E, Selva E, Le Negrate G, Far DF, Lemichez E, Boquet P, Rossi B. Neutrophil F-actin and myosin but not microtubules functionally regulate transepithelial migration induced by interleukin 8 across a cultured intestinal epithelial monolayer. // *Eur Cytokine Netw* 1999 10:227–236.
129. Höllig A, Schug A, Fahlenkamp AV, Rossaint R, Coburn M Argon: systematic review on neuro- and organoprotective properties of an "inert" gas // *Int J Mol Sci*. 2014 Oct 10;15(10):1
130. Horwitz AR, Parsons JT Cell migration–movin’ on. // *Science* 1999 286:1102–1103.
131. Hou H, Guo Y, Chang Q, Luo T, Wu X, Zhao X.C-type Lectin Receptor: Old Friend and New Player // *Med Chem*. 2017;13(6):536-543.
132. Huang KL, Lin YC. Activation of complement and neutrophils increases vascular permeability during air embolism. *Aviat Space Environ Med*. 1997;68:300–5.
133. Ichiki AT, Gibson LA, Jago TL, Strickland KM, Johnson DL, Lange RD et al Effects of spaceflight on rat peripheral blood leukocytes and bone marrow progenitor cells. // *J Leukoc Biol* 1996 60(1):37–43
134. Ihara F, Sakurai D, Takami M, Kamata T, Kunii N, Yamasaki K, Iinuma T, Nakayama T, Motohashi S, Okamoto Y. Regulatory T cells induce CD4 - NKT cell anergy and suppress NKT cell cytotoxic function // *Cancer Immunol Immunother*. 2019 Dec;68(12):1935-1947

135. Inforzato A, Bottazzi B, Garlanda C, Valentino S, Mantovani A. Pentraxins in humoral innate immunity // *Adv Exp Med Biol*. 2012;946:1-20.
136. Ingber DE The architecture of life. // 1998 *Sci Am* 278:48–57
137. Iniesta P, Revilla N, Chen-Liang TH, Hurtado AM, Vicente V, Heras I, Jerez A, Lozano ML. An early increase of CD56 bright natural killer subset as dominant effect and predictor of response to extracorporeal photopheresis for graft-versus-host disease // *Transfusion*. 2018 Dec;58(12):2924-2932.
138. Jabrane-Ferrat N. Features of Human Decidual NK Cells in Healthy Pregnancy and During Viral Infection // *Front Immunol*. 2019 Jun 28;10:1397.
139. Jacubowski A, Abeln V, Vogt T, Yi B, Choukèr A, Fomina E, Strüder HK, Schneider S. The impact of long-term confinement and exercise on central and peripheral stress markers // *Physiol Behav*. 2015 Dec 1;152(Pt A):106-11.
140. Jager A, Kuchroo VK Effector and regulatory T-cell subsets in autoimmunity and tissue inflammation. // *Scand J Immunol* 2010 72(3):173–184
141. Jallali N, Withey S, Butler PE. Hyperbaric oxygen as adjuvant therapy in the management of necrotizing fasciitis. // *Am J Surg*. 2005;189:462–6.
142. Janeway CA Jr. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1989;54(Pt 1):1–13.
143. Janeway CA Jr. The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. *Immunol Today*. 1992;13(1):11–6.
144. Jansky L, Pospisilova D, Honzova S, et al. Immune system of cold-exposed and cold-adapted humans. *Eur J Appl. Physiol Occup Physiol*. 1996;72:445– 450
145. Jones DM, Bailey SP, Roelands B, Buono MJ, Meeusen R. Cold acclimation and cognitive performance: A review // *Auton Neurosci* 2017 Dec;208:36-42.
146. Jung SY, Kim D, Park DC, Kim SS, Oh TI, Kang DW, Kim SH, Yeo SG Toll-Like Receptors: Expression and Roles in Otitis Media // *Int J Mol Sci*. 2021 Jul 23;22(15):7868.
147. Jurberg AD, Cotta-de-Almeida V, Temerozo JR, Savino W, Bou-Habib DC, Riederer I Neuroendocrine control of macrophage development and function. // *Front Immunol* 2018 9:1440.
148. Kaufmann I, Feurecker M, Salam A, Schelling G, Thiel M, Choukèr A Adenosine A2(A) receptor modulates the oxidative stress response of primed polymorphonuclear leukocytes after parabolic flight. // *Hum Immunol* 2011 72:547–552.
149. Kaufmann I, Schachtner T, Feurecker M, Schelling G, Thiel M, Choukèr A Parabolic flight primes cytotoxic capabilities of polymorphonuclear leucocytes in humans. // *Eur J Clin Invest* 2009 39(8):723–728

150. Kaur A, Baldwin J, Brar D, Salunke DB, Petrovsky N. // Toll-like receptor (TLR) agonists as a driving force behind next-generation vaccine adjuvants and cancer therapeutics *Curr Opin Chem Biol*. 2022 Oct;70:102172. doi: 10.1016/j.cbpa.2022.102172. Epub 2022 Jul 1.
151. Kaur I, Simons ER, Castro VA, Ott CM, Pierson DL. Changes in monocyte functions of astronauts. // *Brain Behav Immun* 2005 19:547–554
152. Kaur I, Simons ER, Castro VA, Ott CM, Pierson DL. Changes in neutrophil functions in astronauts. // *Brain Behav Immun* 2004 18:443–450
153. Kaur I, Simons ER, Kapadia AS, Ott CM, Pierson DL Effect of spaceflight on ability of monocytes to respond to endotoxins of gram-negative bacteria // *Clin Vaccine Immunol* 2008 15(10):1523–1528
154. Kendall AC, Whatmore JL, Harries LW, Winyard PG, Smerdon GR, Eggleton P. Changes in inflammatory gene expression induced by hyperbaric oxygen treatment in human endothelial cells under chronic wound conditions. *Exp Cell Res*. 2012 Feb 1;318(3):207-16. doi: 10.1016/j.yexcr.2011.10.014. Epub 2011 Oct 28.
155. Keyel P. How is inflammation initiated? Individual influences of IL-1, IL-18 and HMGB1 Cytokine. 2014 Sep;69(1):136-45.
156. Kimzey SL (1977) Hematology and immunology studies. In: Biomedical results from Skylab. NASA-SP-377. // National Aeronautics and Space Administration, U.S. Government Printing Office, Washington, DC, pp 249–282
157. Kimzey SL, Ritzmann SE, Mengel CE, Fischer CL Skylab experiment results: hematology studies. // *Acta Astronaut* 1975 2(1–2):141–154
158. Knox BP, Blachowicz A, Palmer JM, Romsdahl J, Huttenlocher A, Wang CC, Keller NP, Venkateswaran K. Characterization of *Aspergillus fumigatus* Isolates from Air and Surfaces of the International Space Station // *mSphere*. 2016 Oct 26;1(5):e00227-16.
159. Kofler S, Nickel T, Weis M. Role of cytokines in cardiovascular diseases: a focus on endothelial responses to inflammation *Clin Sci (Lond)*. 2005 Mar;108(3):205-13. doi: 10.1042/CS20040174.
160. Kokuina E, Breff-Fonseca MC, Villegas-Valverde CA, Mora-Díaz I. Normal Values of T, B and NK Lymphocyte Subpopulations in Peripheral Blood of Healthy Cuban Adults // *MEDICC Rev*. Apr-Jul 2019;21(2-3):16-21.
161. Konstantinova IV, Antropova YN, Legenkov VI, Zazhirey VD Study of reactivity of blood lymphoid cells in crew members of the Soyuz-6, Soyuz-7 and Soyuz-8 spaceships before and after flight. *Space Biol Med* (1973) 7:48–55

162. Konstantinova IV, Fuchs BB The immune system in Space and other extreme conditions. // Harwood Academic Publishers, 1991 Reading, Berkshire
163. Konstantinova IV, Rykova MP, Lesnyak AT, Antropova EN Immune changes during longduration missions. // J Leukoc Biol 1993 54(3):189–201
164. Koziakova M, Harris K, Edge CJ, Franks NP, White IL, Dickinson R. Noble gas neuroprotection: xenon and argon protect against hypoxic-ischaemic injury in rat hippocampus in vitro via distinct mechanisms // Br J Anaesth . 2019 Nov;123(5):601-609.
165. Kozlovskaya IB, Grigoriev AI (2004) Russian system of countermeasures on board of the International Space Station (ISS): the first results. // Acta Astronaut 55:233–237
166. Kozlovskaya IB, Grigoriev AI, Stepantsov VI Countermeasure of the negative effects of weightlessness on physical systems in long-term space flights. // Acta Astronaut 1995 36:661–668
167. Krammer F. The human antibody response to influenza A virus infection and vaccination // Nat Rev Immunol. 2019 Jun;19(6):383-397.
168. Krieger SS, Zwart SR, Mehta S, Wu H, Simpson RJ, Smith SM, Crucian B. Alterations in Saliva and Plasma Cytokine Concentrations During Long-Duration Spaceflight // Front Immunol. 2021 Aug 24;12:725748. doi: 10.3389/fimmu.2021.725748.
169. Kriegsmann K, Kriegsmann M, von Bergwelt-Baildon M, Cremer M, Witzens-Harig M. NKT cells - New players in CAR cell immunotherapy? // Eur J Haematol. 2018 Dec;101(6):750-757.
170. Krog J, et al. Natural killer cells as biomarkers of hyperbaric stress during a dry heliox saturation dive. Aviat Space Environ Med. 2010;81:467–74.
171. Kumar V. A STING to inflammation and autoimmunity// J Leukoc Biol. 2019 Jul;106(1):171-185.
172. Kunz H, Quiriarte H, Simpson RJ, Ploutz-Snyder R, McMonigal K, Sams C, Crucian B Alterations in hematologic indices during long-duration spaceflight. // BMC Hematol 2017 17:12.
173. Kuzichkin DS, Nichiporuk IA, Zhuravleva OA, Markin AA, Rykova MP, Zhuravleva TV, Sadova AA, Kutko OV, Shmarov VA, Ponomarev SA. Endothelial dysfunction markers and immune response indices in cosmonauts' blood after long-duration space flights //
174. Land W, Schneeberger H, Schleibner S, Illner WD, Abendroth D, Rutili G, et al. The beneficial effect of human recombinant superoxide dismutase on acute and chronic rejection events in recipients of cadaveric renal transplants. Transplantation. 1994;57(2):211–7.

175. Lee J, Lozano-Ruiz B, Yang FM, Fan DD, Shen L, González-Navajas JM. // The Multifaceted Role of Th1, Th9, and Th17 Cells in Immune Checkpoint Inhibition Therapy. *Front Immunol*. 2021 Mar 12;12:625667. doi: 10.3389/fimmu.2021.625667. eCollection 2021.
176. Lee YS, Wollam J, Olefsky JM. An Integrated View of Immunometabolism // *Cell*. 2018 Jan 11;172(1-2):22-40
177. Leicht CA, Kouda K, Umemoto Y, Banno M, Kinoshita T, Moriki T, Nakamura T, Bishop NC, Goosey-Tolfrey VL, Tajima F. Hot water immersion induces an acute cytokine response in cervical spinal cord injury // *European Journal of Applied Physiology* volume 115, pages 2243–2252(2015)
178. Lendeckel U, Venz S, Wolke C. Macrophages: shapes and functions // *ChemTexts*. 2022;8(2):12.
179. Lin CH, Su WH, Chen YC, Feng PH, Shen WC, Ong JR, Wu MY, Wong CS. Treatment with normobaric or hyperbaric oxygen and its effect on neuropsychometric dysfunction after carbon monoxide poisoning: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials // *Medicine (Baltimore)* 2018 Sep;97(39):e12456
180. Lindsay A, Othman MI, Prebble H, Davies S, Gieseg SP. Repetitive cryotherapy attenuates the in vitro and in vivo mononuclear cell activation response // *Exp Physiol*. 2016 Jul 1;101(7):851-65
181. Ling M, Murali M. Analysis of the Complement System in the Clinical Immunology Laboratory// *Clin Lab Med*. 2019 Dec;39(4):579-590.
182. Liou K, et al. Patent foramen ovale influences the presentation of decompression illness in SCUBA divers. // *Heart Lung Circ*. 2015;24:26–31.
183. Liu J, Wang N, Liu Y, Jin Y, Ma M. The antimicrobial spectrum of lysozyme broadened by reductive modification // *Poult Sci*. 2018 Nov 1;97(11):3992-3999
184. Liu W, et al. Dual effects of hyperbaric oxygen on proliferation and cytotoxic T lymphocyte activity of rat splenic lymphocytes. *Undersea Hyperb Med*. 2009;36:155–60.
185. Liu W., Zhu X., Zhao L., Yang X., Cao F., Huang Y., Mu P. Effects of simulated weightlessness on biological activity of human NK cells induced by IL-2 // *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi*. – 2015. - 31(10):1297–1300, 1305.
186. Loetscher PD, Rossaint J, Rossaint R, Weis J, Fries M, Fahlenkamp A, et al. Argon: Neuroprotection in in vitro models of cerebral ischemia and traumatic brain injury. *Crit Care*. 2009;13
187. Lopez JV, Peixoto RS, Rosado AS Inevitable future: space colonization beyond Earth with microbes first // *FEMS Microbiol Ecol*. 2019 Oct 1;95(10):fiz127

188. Lubkowska A, Bryczkowska I, Szygula Z, Gienza C, Skrzek A, Rotter I, Lombardi G, Banfi G. The effect of repeated whole-body cryostimulation on the HSP-70 and lipid metabolisms in healthy subjects// *Physiol Res*. 2019 Jun 30;68(3):419-429
189. Lubkowska A, Szygula Z, Klimek AJ Do sessions of cryostimulation have influence on white blood cell count, level of IL6 and total oxidative and antioxidative status in healthy men? *Eur J Appl Physiol*. 2010 May;109(1):67-72.
190. Lubkowska A, Szygula Z, Klimek AJ, et al. Do sessions of cryostimulation have influence on white blood cell count, level of IL6 and total oxidative and antioxidative status in healthy men? *Eur J Appl Physiol*. 2010 May;109(1):67-72.
191. Lubkowska A., Szyguła Z, Chlubek D, et al. The effect of prolonged whole-body cryostimulation treatment with different amounts of sessions on chosen pro- and anti-inflammatory cytokines levels in healthy men. *Scand J Clin Lab Invest*. 2011 Sep;71(5):419-25
192. Lubkowska A., Szyguła Z, Chlubek D. The effect of prolonged whole-body cryostimulation treatment with different amounts of sessions on chosen pro- and anti-inflammatory cytokines levels in healthy men. *Scand J Clin Lab Invest*. 2011 Sep;71(5):419-25
193. Ludtka C, Silberman J, Moore E, Allen JB. Macrophages in microgravity: the impact of space on immune cells. *NPJ Microgravity* (2021) 7(1):13. doi: 10.1038/s41526-021-00141-z
194. Makedonas G, Mehta SK, Scheuring RA, Haddon R, Crucian BE. SARS-CoV-2 Pandemic Impacts on NASA Ground Operations to Protect ISS Astronauts. *J Allergy Clin Immunol Pract* (2020) 8(10):3247-3250. doi: 10.1016/j.jaip.2020.08.064
195. Manfredi AA, Ramirez GA, Rovere-Querini P, Maugeri N. The Neutrophil's Choice: Phagocytosis vs Make Neutrophil Extracellular Traps//*Front Immunol*. 2018 Feb 20;9:288.
196. Mann V, Sundaresan A, Chaganti M. Cellular changes in the nervous system when exposed to gravitational variation // *Neurol India*. 2019 May-Jun;67(3):684-691
197. Mann V., Sundaresan A., Mehta S., Crucian B., Doursout M., Devakottai S. Effects of microgravity and other space stressors in immunosuppression and viral reactivation with potential nervous system involvement // *Neurol India*. May-Jun 2019;67 (Supplement):S198-S203.
198. Manolis AS, Manolis SA, Manolis AA, Manolis TA, Apostolaki N, Melita H. Winter Swimming: Body Hardening and Cardiorespiratory Protection Via Sustainable Acclimation// *Curr Sports Med Rep*. 2019 Nov;18(11):401-415.
199. Manson J, Thiemermann C, Brohi K. Trauma alarmins as activators of damage-induced inflammation. *Br J Surg*. 2012;99(Suppl 1):12–20.
200. Martin MD, Badovinac VP. Defining Memory CD8 T Cell. // *Front Immunol*. 2018 Nov 20;9:2692.

201. Martinet L, Smyth MJ. Balancing natural killer cell activation through paired receptors. // Nat Rev Immunol. 2015 Apr;15(4):243-54.
202. Martino C.F., Perea H., Hopfner U. et al. Effects of weak static magnetic fields on endothelial cells // Bioelectromagnetics.- 2010. - V.31. №4. P.296-301
203. Matsuo H, Shinomiya N, Suzuki S. Hyperbaric stress during saturation diving induces lymphocytesubset changes and heat shock protein expression. Undersea Hyperb Med. 2000;27:37–41.
204. Matzinger P. Tolerance, danger, and the extended family. Annu Rev Immunol. 1994;12:991–1045
205. Mayer A, Zhang Y, Perelson AS, Wingreen NS. Regulation of T cell expansion by antigen presentation dynamics // Proc Natl Acad Sci USA. 2019 Mar 26;116(13):5914-5919.
206. McComb, Mayer B, Soppert J, Kraemer S, Schemmel S, Beckers C, Bleilevens C S, Thiriot A, Akache B. Introduction to the Immune System // Methods Mol Biol. 2019;2024:1-24.
207. McKinnon KM. Flow Cytometry: An Overview // Curr Protoc Immunol. 2018
208. Meehan R, Whitson P, Sams C The role of psychoneuroendocrine factors on spaceflightinduced immunological alterations. // JLeukocBiol 1993 54:236–244
209. Mehta SK, Cohrs RJ, Forghani B, Zerbe G, Gilden DH, Pierson DL (2004) Stress-induced subclinical reactivation of varicella zoster virus in astronauts. // J Med Virol 72(1):174–179
210. Mehta SK, Crucian B, Pierson DL, Sams C, Stowe RP Monitoring immune system function and reactivation of latent viruses in the Artificial Gravity Pilot Study. // J Gravit Physiol 2007 14:P21–P25
211. Mehta SK, Laudenslager ML, Stowe RP, Crucian BE, Feiveson AH, Sams CF, Pierson DL Latent virus reactivation in astronauts on the international space station. // 2017 NPJ Microgravity 3:11.
212. Mehta SK, Laudenslager ML, Stowe RP, Crucian BE, Sams CF, Pierson DL Multiple latent viruses reactivate in astronauts during Space Shuttle missions. //Brain Behav Immun 2014 41:210–217.
213. Mehta SK, Nelman-Gonzalez M, Tying SK, Tong Y, Beitman A, Crucian BE, Renner AN, Pierson DL. Localization of VZV in saliva of zoster patients // J Med Virol. 2017 Sep;89(9):1686-1689
214. Mehta SK, Pierson DL, Cooley H, Dubow R, Lugg D Epstein-Barr virus reactivation associated with diminished cell-mediated immunity in Antarctic expeditioners. // J Med Virol 2000 61(2):235–240

215. Mehta SK, Stowe RP, Feiveson AH, Tying SK, Pierson DL Reactivation and shedding of cytomegalovirus in astronauts during spaceflight. // 2000 J Infect Dis 182(6):1761–1764
216. Meshkov D, Rykova M The natural cytotoxicity in cosmonauts on board space stations. // Acta Astronaut 1995 36:719–726
217. Miller ES, Koebel DA, Sonnenfeld G Influence of spaceflight on the production of interleukin-3 and interleukin-6 by rat spleen and thymus cells. // J Appl Physiol 1995 78(3):810–813
218. Mills PJ, Meck JV, Waters WW, D'Aunno D, Ziegler MG Peripheral leukocyte subpopulations and catecholamine levels in astronauts as a function of mission duration.// Psychosom Med 2001 63(6):886–890
219. Mills PJ, Meck JV, Waters WW, D'Aunno D, Ziegler MG. Peripheral leukocyte subpopulations and catecholamine levels in astronauts as a function of mission duration. // Psychosom Med. 2001 Nov-Dec;63(6):886-90.
220. Morukov B., Rykova M., Antropova E. et al. T-cell immunity and cytokine production in cosmonauts after long-duration space flights // Acta Astronautica.2011.Vol.68.P.739-746.
221. Moser D, Sun SJ, Li N, Biere K, Hoerl M, Matzel S, et al. Cells' Flow and Immune Cell Priming under alternating g-forces in Parabolic Flight Sci Rep (2019) ;9(1):11276. doi: 10.1038/s41598-019-47655-x
222. Moss WJ. Measles. Lancet. 2017 Dec 2;390(10111):2490-2502
223. Muire P., Mangum L., Wenke J. Time Course of Immune Response and Immunomodulation During Normal and Delayed Healing of Musculoskeletal Wounds// Front Immunol. 2020 Jun 4;11:1056.
224. Münter R, Bak M, Christensen E, Kempen P, Larsen J, Kristensen K, Parhamifar L, Andresen TL. Mechanisms of Selective Monocyte Targeting by Liposomes Functionalized with a Cationic, Arginine-Rich Lipopeptide // Acta Biomater. 2022 Mar 18;S1742-7061(22)00159-3
225. Murphy K, Travers P, Walport M, Janeway C (2012) Janeway's immunobiology, 8th edn. Garland Science, New York
226. Mylabathula P.L., Bigley A.B., Li L., Crucian B.E., Pierson D.L., Mehta S.K., Rezvani K, Simpson R.J. Simulated microgravity 'disarms' human Natural Killer cells and suppresses cytotoxic activity against tumor target cells // Brain, Behavior, and Immunity. - 2017. – V. 66. - e31. 10.1016/j.bbi.2017.07.115.
227. Najrana T, Sanchez-Esteban J Mechanotransduction as an adaptation to gravity. // Front Pediatr 2016 4:140

228. Navasolava N, Yuan M, Murphy R, Robin A, Coupé M, Wang L, Alameddine A, Gauquelin-Koch G, Gharib C, Li Y, Custaud MA. Vascular and Microvascular Dysfunction Induced by Microgravity and Its Analogs in Humans: Mechanisms and Countermeasures// *Front Physiol.* 2020 Aug 20;11:952
229. Navasolava NM, Pajot A, Gallois Y, Pastushkova LKh, Kulchitsky VA, Gauquelin-Koch G, Kozlovskaya IB, Heer M, Hand O, Larina IM, Custaud MA.
230. Nespoli F., Redaelli S., Ruggeri L., Fumagalli F., Olivari D., Ristagno G. A complete review of preclinical and clinical uses of the noble gas argon: Evidence of safety and protection. *Ann Card Anaesth.* 2019; 22(2):122–35. DOI: 10.4103/aca.ACA_111_18.
231. Netea MG, Schlitzer A, Placek K, Joosten LAB, Schultze JL. Innate and Adaptive Immune Memory: an Evolutionary Continuum in the Host's Response to Pathogens // *Cell Host Microbe.* 2019 Jan 9;25(1):13-26.
232. Niedzwiecki MM, Walker DI, Vermeulen R, Chadeau-Hyam M, Jones DP, Miller GW. The Exposome: Molecules to Populations // *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2019 Jan 6;59:107-127
233. Niggli V Microtubule-disruption-induced and chemotactic-peptide-induced migration of human neutrophils: implications for differential sets of signalling pathways.// *J Cell Sci* 2003 116:813–822
234. Nikzad R, Angelo LS, Aviles-Padilla K, Le DT, Singh VK, Bimler L, Vukmanovic-Stejić M, Vendrame E, Ranganath T, Simpson L, Haigwood NL, Blish CA, Akbar AN, Paust S. Human natural killer cells mediate adaptive immunity to viral antigens // *Sci Immunol.* 2019 May 10;4(35):eaat8116.
235. Ning J, Zhao H, Chen B, Mi EZ, Yang Z, Qing W, Lam KWJ, Yi B, Chen Q, Gu J, Ichim T, Bogin V, Lu K, Ma D. Argon Mitigates Impaired Wound Healing Process and Enhances Wound Healing In Vitro and In Vivo. // *Theranostics.* 2019 Jan 1;9(2):477-490
236. Novikova N, De Boever P, Poddubko S, Deshevaya E, Polikarpov N, Rakova N, Coninx I, Mergeay M. Survey of environmental biocontamination on board the International Space Station // *Res Microbiol.* Jan-Feb 2006;157(1):5-12.
NPJ Microgravity. 2022 Nov 2;8(1):46. doi: 10.1038/s41526-022-00237-0.
NT-ProBNP levels, water and sodium homeostasis in healthy men: effects of 7 days of dry immersion. // *Eur J Appl Physiol.* 2011 Sep;111(9):2229-37
237. Nussler AK, Wittel UA, Nussler NC, Beger HG Leukocytes, the Janus cells in inflammatory disease// 1999 *Langenbeck's Arch Surg* 384:222–232
238. Nyquist P, Ball R, Sheridan MJ. Complement levels before and after dives with a high risk of DCS. *Undersea Hyperb Med.* 2007;34:191–7.

239. Nyquist P, Ball R, Sheridan MJ. Complement levels before and after dives with a high risk of DCS. *Undersea Hyperb Med.* 2007;34:191–7.
240. Oba R, Isomura M, Igarashi A, Nagata K. Circulating CD3 + HLA-DR + Extracellular Vesicles as a Marker for Th1/Tc1-Type Immune Responses // *J Immunol Res.* 2019 May 8;2019:6720819.
241. Orange JS Formation and function of the lytic of the NK-cell immunological synapse. // *Nat Rev Immunol* 2008 8:713–725
242. Ortega MT, Pecaut MJ, Gridley DS, Stodieck LS, Ferguson V, Chapes SK Shifts in bone marrow cell phenotypes caused by spaceflight. // *J Appl Physiol* 2009 106(2):548–555
243. Owen AM, Fults JB, Patil NK, Hernandez A, Bohannon JK. //TLR Agonists as Mediators of Trained Immunity: Mechanistic Insight and Immunotherapeutic Potential to Combat Infection *Front Immunol.* 2021 Feb 18;11:622614. doi: 10.3389/fimmu.2020.622614. eCollection 2020.
244. Pahl JHW, Cerwenka A, Ni J. Memory-Like NK Cells: Remembering a Previous Activation by Cytokines and NK Cell Receptors// *Front Immunol.* 2018 Nov 28;9:2796.
245. Palinkas LA, Suedfeld P Psychological effects of polar expeditions. // *Lancet* 2008 371:153–163
246. Parkin J., Cohen B. An overview of the immune system *Lancet.* 2001 Jun 2;357(9270):1777-89
247. Patente TA, Pinho MP, Oliveira AA, Evangelista GCM, Bergami-Santos PC, Barbuto JAM. Human Dendritic Cells: Their Heterogeneity and Clinical Application Potential in Cancer Immunotherapy // *Front Immunol.* 2019 Jan 21;9:3176.
248. Paulsen K, Tauber S, Dumrese C, Bradacs G, Simmet DM, Götz N, Hauschild S, Raig C, Engeli S, Gutewort A, Hürlimann E, Biskup J, Unverdorben F, Rieder G, Hofmänner D, Mutschler L, Krammer S, Buttron I, Philpot C, Hüge A, Lier H, Barz I, Engelmann F, Layer LE, Thiel CS, Ullrich O.Regulation of ICAM-1 in cells of the monocyte/macrophage system in microgravity. // *Biomed Res Int* 2015:538786
249. Paulsen K., Tauber S., Goelz N., Simmet D.M., Engeli S., Birlem M., Dumrese C., Karer A., Hunziker S., Biskup J., Konopasek S., Suh D., Huerlimann E., Signer C., Wang A., Sang C., Grote K.H., Zhuang F., Ullrich O. Severe disruption of the cytoskeleton and immunologically relevant surface molecules in a human macrophageal cell line in microgravity—results of an in vitro experiment on board of the Shenzhou-8 space mission // *Acta Astronautica.* - 2014. - V.94. - P. 277-292.
250. Pawelec G, Gouttefangeas C T-cell dysregulation caused by chronic antigenic stress: the role of CMV in immunosenescence?// 2006 *Aging Clin Exp Res* 18:171–173

251. Peake JM, Neubauer O, Walsh NP, Simpson RJ. Recovery of the immune system after exercise // *J Appl Physiol* (1985). 2017 May 1;122(5):1077-1087.
252. Pecaut MJ, Nelson GA, Peters LL, Kostenuik PJ, Bateman TA, Morony S et al (2003) Genetic models in applied physiology: selected contribution: effects of spaceflight on immunity in the C57BL/6 mouse. I. Immune population distributions. *J Appl Physiol* 94(5):2085–2094
253. Peng Y, van Wersch R, Zhang Y. Convergent and Divergent Signaling in PAMP-Triggered Immunity and Effector-Triggered Immunity // *Mol Plant Microbe Interact* .2018 Apr;31(4):403-409.
254. Peters EMJ, Schedlowski M, Watzl C, Gimsa U. To stress or not to stress: Brain-behavior-immune interaction may weaken or promote the immune response to SARS-CoV-2. *Neurobiol Stress* (2021) 14:100296. doi: 10.1016/j.ynstr.2021.100296
255. Pierce S, Geanes ES, Bradley T. Targeting Natural Killer Cells for Improved Immunity and Control of the Adaptive Immune Response // *Front Cell Infect Microbiol*. 2020 May 19;10:231.
256. Pierson DL, Stowe RP, Phillips TM, Lugg DJ, Mehta SK. Epstein-Barr virus shedding by astronauts during space flight. // *Brain Behav Immun* 200519:235–242
257. Plett PA, Abonour R, Frankovitz SM, Orschell CM. Impact of modeled microgravity on migration, differentiation, and cell cycle control of primitive human hematopoietic progenitor cells. 2004 *Exp Hematol* 32:773–781
258. Ponchel F, Burska AN, Hunt L, Gul H, Rabin T, Parmar R, Buch MH, Conaghan PG, Emery P. T-cell subset abnormalities predict progression along the Inflammatory Arthritis disease continuum: implications for management// *Sci Rep*. 2020 Feb 28;10(1):3669.
259. Ponomarev SA, Sadova AA, Rykova MP, Orlova KD, Vlasova DD, Shulgina SM, Antropova EN, Kutko OV, Germanov NS, Galina VS, Shmarov VA. The impact of short-term confinement on human innate immunity // *Sci Rep*. 2022 May 19;12(1):8372. doi: 10.1038/s41598-022-12380-5.
260. Ponomarev, S., Kalinin, S., Sadova, A., Rykova M., Orlova, K., Crucian, B. // Immunological Aspects of Isolation and Confinement *Front Immunol*. 2021 Jun 24;12:697435. doi: 10.3389/fimmu.2021.697435. eCollection 2021.
261. Ponomarev, S.A., Rykova, M.P., Antropova, E.N., O.V. Kutko, S.A. Kalinin, S.M. Shulgina et al // Cytokine Profile in Volunteers during a 21-Day Dry Immersion without Countermeasures. *Human Physiology* 2020, 46(7), pp. 787–791doi:10.1134/S0362119720020139

262. Poyrazoglu Y, Topal T, Yuksel R, Bircan FS, Simsek K, Gocgeldi E, Ersoz N, Korkmaz A. Effects of hyperbaric oxygen and preconditioning on wound healing in colonic anastomoses. // *J Invest Surg*. 2015;28:188–9
263. Rasmussen P., Siebenmann C., Díaz V., Lundby C. Red cell volume expansion at altitude: A meta-analysis and Monte Carlo simulation. *Med Sci Sports Exerc*. 2013;45(9):1767–72. DOI: 10.1249/MSS.0b013e31829047e5.
264. Reina-Campos M, Scharping NE, Goldrath AW. CD8+ T cell metabolism in infection and cancer. *Nat Rev Immunol*. 2021 Nov;21(11):718-738. doi: 10.1038/s41577-021-00537-8. Response // *Oxid Med Cell Longev*. 2022 Mar 7;2022:9611362.
265. Ribatti D. Sir Frank Macfarlane Burnet and the clonal selection theory of antibody formation // *Clin Exp Med*. 2009 Dec;9(4):253-8.
266. Rieger K. E., Chu G., Portrait of transcriptional responses to ultraviolet and ionizing radiation in human cells // *Nucleic Acids Res*. - 2004. - V.32. - P. 4786–4803.
267. Rizvi M, Jawad N, Li Y, Vizcaychipi MP, Maze M, Ma D Effect of noble gases on oxygen and glucose deprived injury in human tubular kidney cells. *Exp Biol Med (Maywood)* 2010;235:886–91
268. Roers A, Hiller B, Hornung V. Recognition of Endogenous Nucleic Acids by the Innate Immune System // *Immunity*. 2016 Apr 19;44(4):739-54
269. Roh JS, Sohn DH. Damage-Associated Molecular Patterns in Inflammatory Diseases // *Immune Netw*. 2018 Aug 13;18(4):e27
270. Roman A, Tombarkiewicz B. Prolonged weakening of the geomagnetic field (GMF) affects the immune system of rats // *Bioelectromagnetics*. 2009 Jan;30(1):21-8
271. Roman A., Tombarkiewicz B. Prolonged weakening of the geomagnetic field (GMF) affects the immune system of rats. // *Bioelectromagnetics*. 2009 Jan; 30 (1):21-8
272. Romee R, Schneider SE, Leong JW, Chase JM, Keppel CR, Sullivan RP, Cooper MA, Fehniger TA. Cytokine activation induces human memory-like NK cells // *Blood*. 2012 Dec 6;120(24):4751-60.
273. Romsdahl J, Blachowicz A, Chiang AJ, Singh N, Stajich JE, Kalkum M, Venkateswaran K, Wang CCC. Characterization of *Aspergillus niger* Isolated from the International Space Station // *mSystems*. 2018 Sep 18;3(5):e00112-18
274. Rooney BV, Crucian BE, Pierson DL, Laudenslager ML, Mehta SK. Herpes Virus Reactivation in Astronauts During Spaceflight and Its Application on Earth // *Front Microbiol*. 2019 Feb 7;10:16.

275. Rösner H, Wassermann T, Möller W, Hanke W. Effects of altered gravity on the actin and microtubule cytoskeleton of human SH-SY5Y neuroblastoma cells. // *Protoplasma*. 2006 Dec;229(2-4):225-34.
276. Roth DB. V(D)J Recombination: Mechanism, Errors, and Fidelity // *Microbiol Spectr*. 2014 Dec;2(6):10.1128/microbiolspec.MDNA3-0041-2014.
277. Rucker J, Rudemiller N., Crowley S. Salt, Hypertension, and Immunity *Annu Rev Physiol*. 2018 Feb 10; 80: 283–307.
278. Rykova MP, Antropova EN, Larina IM, Morukov BV Humoral and cellular immunity in cosmonauts after the ISS missions. // *Acta Astronaut* 2008 63(7–10):697–705
279. Rykova MP, Antropova EN, Meshkov DO Results of immunological studies. In: *Orbital'naya stantsiya, vol 2. MIR (Mir Space Station)*, 2001 Moscow, p 615
280. Salam AP Exploration Class Missions on Earth: Lessons Learnt from Life in Extreme Antarctic Isolation and Confinement // *Stress challenges and immunity in space*, 2020 – Springer
281. Salzer U, Sack U, Fuchs I. Flow Cytometry in the Diagnosis and Follow Up of Human Primary Immunodeficiencies // *EJIFCC* 2019 Nov 25;30(4):407-422.
282. Sanada F, Taniyama Y, Muratsu J, Otsu R, Shimizu H, Rakugi H, Morishita R Source of chronic inflammation in aging. // *Front Cardiovasc Med* 2018 5:12.
283. Santocki M, Kolaczowska E. On Neutrophil Extracellular Trap (NET) Removal: What We Know Thus Far and Why So Little // *Cells*. 2020 Sep 11;9(9):2079
284. Satter S. The Role of the Immune System Beyond the Fight Against Infection // *Adv Exp Med Biol*. 2017;1003:3-14
285. Savary C.A., Graziutti M.L., Przepiorka D., Tomasovic S.P., McIntyre B.W., Woodside D.C., Pellis N.R., Pierson D.L., Rex J.H. Characteristics of human dendritic cells generated in a microgravity analog culture system // *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Animal.* - 2001. - V.37. - № 4. - P. 216-222.
286. Sawka M.N., Convertino V.A., Eichner E.R., Schnieder S.M., Young A.J. Blood volume: Importance and adaptations to exercise training, environmental stresses, and trauma/sickness. *Med Sci Sports Exerc*. 2000;32(2):332–48. DOI: 10.1097/00005768-200002000-00012.
287. Schreiner D, King CG CD4+ Memory T Cells at Home in the Tissue: Mechanisms for Health and Disease // *Front Immunol*. 2018 Oct 16;9:2394
288. Schwanhäusser B, Busse D, Li N, Dittmar G, Schuchhardt J, Wolf J et al // Global quantification of mammalian gene expression control *Nature*. 2011 May 19;473(7347):337-42. doi: 10.1038/nature1009

289. Sciola L, Cogoli-Greuter M, Cogoli A, Spano A, Pippia P. Influence of microgravity on mitogen binding and cytoskeleton in Jurkat cells. // *Adv Space Res* 1999 24:801–805
290. Seifert M, Küppers R. Human memory B cells // *Leukemia*. 2016 Dec;30(12):2283-2292.
291. Selezneva A, Gibb AJ, Willis D. The Nuclear Envelope as a Regulator of Immune Cell Function. // *Front Immunol*. 2022 Jun 10;13:840069. doi: 10.3389/fimmu.2022.840069.
292. Semko VV, A A Povazhenko, K K Petrova, T I Ryzhova, A P Neustroev, E V Kozyreva, L G Puzanova Immunologic response of divers working in the conditions of increased microbial contamination of water under pressure up to 51 MPa. // *Fiziol Z*. 1991;37:92–7.
293. Seumen CHT, Grimm TM, Hauck CR. // Protein phosphatases in TLR signaling. *Cell Commun Signal*. 2021 Apr 21;19(1):45. doi: 10.1186/s12964-021-00722-1.
294. Shabrish S, Desai M, Saxena V et al IFN- γ :IL-10 Ratio: a Putative Predictive Biomarker to Discriminate HLH From Severe Viral Infections. *J Clin Immunol*. 2019 Feb;39(2):135-137 doi: 10.1007/s10875-019-00601
295. Sharma K, Aaghaz S, Shenmar K, Jain R Short Antimicrobial Peptides.// *Recent Pat Antiinfect Drug Discov*. 2018;13(1):12-52.
296. Shearer WT, Lugg DJ, Rosenblatt HM, Nickolls PM, Sharp RM, Reuben JM, Ochs HD. Antibody responses to bacteriophage phi X-174 in human subjects exposed to the antarctic winter-over model of spaceflight // *J Allergy Clin Immunol*. 2001 Jan;107(1):160-4.
297. Shearer WT, Lugg DJ, Rosenblatt HM, Nickolls PM, Sharp RM, Reuben JM, Ochs HD. Antibody responses to bacteriophage ϕ X-174 in human subjects exposed to the Antarctic winter-over model of spaceflight // *Journal of Allergy and Clinical Immunology* Volume 107, Issue 1, January 2001, Pages 160-164
298. Shinomiya N, Suzuki S, Hashimoto A, Oiwa H. Effects of deep saturation diving on the lymphocyte subsets of healthy divers. *Undersea Hyperb Med*. 1994;21:277–86.
299. Shinomiya N, Suzuki S, Ikeda T, Oiwa H. Immunological capacities during deep saturation diving-changes of lymphocyte subsets under high pressure. In: XXth annual meeting EUBS; 1994. p. 217–22.
300. Shinomiya N, Suzuki S, Ito M, Hiromichi O. Effect of compression speed on the lymphocyte subset change during deep saturation diving. In: XXIst Annual Meeting of EUBS 95; 1995.p. 37–42.
301. Shinomiya N. Effect of hyperbaric stress on human immune system. In: Kannno C, Hayashi R, editors. High pressure bioscience and biotechnology. //Kyoto: Sanei Shuppan; 2000. p. 129–38

302. Sigvardsson M. Molecular Regulation of Differentiation in Early B-Lymphocyte Development // *Int J Mol Sci*. 2018 Jun 30;19(7):1928.
303. Silvestre-Roig C, Fridlender ZG, Glogauer M, Scapini P. Neutrophil Diversity in Health and Disease. // *Trends Immunol*. 2019 Jul;40(7):565-583.
304. Simpson RJ, Bigley AB, Spielmann G, Kunz HE, Agha N, Baker F, Rooney B, Mylabathula PL, Graff RM, Crucian BE, Laughlin M, Mehta SK, Pierson DL (2016) Long duration spaceflight impairs NK-cell function in astronauts. *Med Sci Sports Exerc* 48(5 Suppl 1):87
305. Simpson RJ, Bigley AB, Spielmann G, Kunz HE, Agha N, Baker F, Rooney B, Mylabathula PL, Graff RM, Crucian BE, Laughlin M, Mehta SK, Pierson DL Long duration spaceflight impairs NK-cell function in astronauts. // *Med Sci Sports Exerc* 2016 48(5 Suppl 1):87
306. Sitkovsky MV, Lukashev D, Apasov S, Kojima H, Koshiba M, Caldwell C, Ohta A, Thiel M. Physiological control of immune response and inflammatory tissue damage by hypoxia-inducible factors and adenosine A2A receptors. // *Annu Rev Immunol* 2004 22:657–682.
307. Sonnenfeld G, Davis S, Taylor GR, Mandel AD, Konstantinova IV, Lesnyak A et al Effect of space flight on cytokine production and other immunologic parameters of rhesus monkeys. // *J Interf Cytokine Res* 1996 16(5):409–415
308. Sonnenfeld G, Gould CL, Williams J, Mandel AD Inhibited interferon production after space flight. // *Acta Microbiol Hung* 1988 35(4):411–416
309. Sonnenfeld G, Miller ES The role of cytokines in immune changes induced by spaceflight. // *J Leukoc Biol* 1993 54(3):253–258
310. Sonnenfeld G. Space flight, microgravity, stress, and immune responses // *Adv Space Res*. 1999;23(12):1945-53.
311. Sonnenfeld G., Shearer W.T., Immune function during space flight // *Nutrition*. 2002. Vol.18. P.899-903.
312. Sorrells SF, Sapolsky RM An inflammatory review of glucocorticoid actions in the CNS. // *Brain Behav Immun* 2007 21:259–272.
313. Spaggiari S, Kepp O, Rello-Varona S, Chaba K, Adjemian S, Pype J, Galluzzi L, Lemaire M, Kroemer G. Antiapoptotic activity of argon and xenon // *Cell Cycle*. 2013 Aug 15;12(16):2636-42
314. Stahn AC, Werner A, Opatz O, Maggioni MA, Steinach M, von Ahlefeldt VW, Moore A, Crucian BE, Smith SM, Zwart SR, Schlabs T, Mendt S, Trippel T, Koralewski E, Koch J, Choukèr A, Reitz G, Shang P, Röcker L, Kirsch KA, Gunga HC. Increased core body

- temperature in astronauts during long-duration space missions // *Sci Rep*. 2017 Nov 23;7(1):16180.
- Staphylococcus aureus* cutaneous infection in a saturation diving facility. // *Undersea Hyperb Med*. 2003;30:277–84.
315. Steensberg A, Fischer CP, Keller C, Møller K, Pedersen BK IL-6 enhances plasma IL-1ra, IL-10, and cortisol in humans. // *Am J Endocrinol Metab* (2003) 285:433–437
 316. Stowe R, Mehta S, Uchakin P, Quiriarte H, Pierson D, Sams C. Immune system dysregulation occurs during short duration spaceflight on board the space shuttle.// *J Clin Immunol*. 2013 Feb;33(2):456-65.
 317. Stowe RP, Mehta SK, Ferrando AA, Feedback DL, Pierson DL Immune responses and latent herpesvirus reactivation in spaceflight. // *Aviat Space Environ Med* 2001 72(10):884–891
 318. Stowe RP, Sams CF, Mehta SK, Kaur I, Jones ML, Feedback DL et al Leukocyte subsets and neutrophil function after short-term spaceflight. // *J Leukoc Biol* 1999 65(2):179–186
 319. Stowe RP, Sams CF, Pierson DL Effects of mission duration on neuroimmune responses in astronauts.// *Aviat Space Environ Med* 2003 74(12):1281–1284
 320. Stowe RP, Yetman DL, Storm WF, Sams CF, Pierson DL Neuroendocrine and immune responses to 16-day bed rest with realistic launch and landing G profiles. // *Aviat Space Environ Med* 2008 79:117–122
 321. Strewe C, Moser D, Buchheim JI, Gunga HC, Stahn A, Crucian BE, Fiedel B, Bauer H, Gössmann-Lang P, Thieme D, Kohlberg E, Choukèr A, Feurecker M. Sex differences in stress and immune responses during confinement in Antarctica // *Biol Sex Differ*. 2019 Apr 16;10(1):20.
 322. Strewe C, Muckenthaler F, Feurecker M, Yi B, Rykova M, Kaufmann I, Nichiporuk I, Vassilieva G, Hörl M, Matzel S, Schelling G, Thiel M, Morukov B, Choukèr A. Functional changes in neutrophils and psychoneuroendocrine responses during 105 days of confinement. // *J Appl Physiol* 2015 118:1122–1127.
 323. Sun Y, Huang T, Hammarström L, Zhao Y. The Immunoglobulins: New Insights, Implications, and Applications // *Annu Rev Anim Biosci*. 2020 Feb 15;8:145-169.
 324. Sundaresan A, Risin D, Pellis NR Loss of signal transduction and inhibition of lymphocyte locomotion in a ground-based model of microgravity. // *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2002 38:118–122
 325. Sureda A, Batle J , Capó X , Martorell M , Córdova A, Tur J , Pons A. Scuba diving induces nitric oxide synthesis and the expression of inflammatory and regulatory genes of the immune response in neutrophils// *Physiol Genomics*.2014;46:647–54.

326. Suzui M, Kawai T, Kimura H, Takeda K, Yagita H, Okumura K, Shek PN, Shephard RJ. Natural killer cell lytic activity and CD56(dim) and CD56(bright) cell distributions during and after intensive training. // *J. Appl Physiol* (1985). 2004 Jun;96(6):2167-73.
327. Swirski F., Nahrendorf M. Cardioimmunology: the immune system in cardiac homeostasis and disease // *Nat Rev Immunol* . 2018 Dec;18(12):733-744.
328. Tabony J, Rigotti N, Glade N, Cortès S. Effect of weightlessness on colloidal particle transport and segregation in self-organising microtubule preparations. // *Biophys Chem* 2007;127:172–180
329. Takeda K, Akira S. // Toll-like receptors. *Curr Protoc Immunol*. 2015 Apr 1;109:14.12.1-14.12.10. doi: 10.1002/0471142735.im1412s109.
330. Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol*. 2003;21:335–76.
331. Talas, M., Batkai, L., Stoger, L., Nagy L., Hiros L., Konstantinova I., Rykova M., Mozgovaya I., Guseva O., Kozharinov V. Results of space experiment program “Interferon.” I. Production of interferon in vitro by human lymphocytes aboard space laboratory Solyut-6 (“Interferon I”) and influence of space flight on lymphocyte functions of cosmonauts (“Interferon III”) // *Acta Microbiol. Hung.* - 1983. - V. 30. - P. 53-61.
332. Tamura T, Iida K, Saito M, Shiota S, Nakayama H, Yoshida S. Effect of hyperbaric oxygen on *Vibrio vulnificus* and murine infection caused by it. *Microbiol Immunol*. 2012;56:673–9.
333. Tamura Y, Torigoe T, Kukita K, Saito K, Okuya K, Kutomi G, Hirata K, Sato N. Heat-shock proteins as endogenous ligands building a bridge between innate and adaptive immunity // *Immunotherapy*. 2012 Aug;4(8):841-52.
334. Tan X, Luo M, Liu AP. Clathrin-mediated endocytosis regulates fMLP-mediated neutrophil polarization // *Heliyon*. 2018 Sep 24;4(9):e00819.
335. Tanaka K, Nishimura N, Kawai Y. Adaptation to microgravity, deconditioning, and countermeasures // *J Physiol Sci*. 2017 Mar;67(2):271-281
336. Tauber S, Hauschild S, Paulsen K, Gutewort A, Raig C, Hürlimann E, Biskup J, Philpot C, Lier H, Engelmann F, Pantaleo A, Cogoli A, Pippia P, Layer L, Thiel C, Ullrich O Signal transduction in primary human T lymphocytes in altered gravity during parabolic flight and clinostat experiments. // *Cell Physiol Biochem* 2015 35(3):1034–1051
337. Tauber S, Lauber B, Paulsen K et al Cytoskeletal stability and metabolic alterations in primary human macrophages in long-term microgravity. // 2017 *PLoS One* 12:e0175599.
338. Taylor C.T., Colgan S.P. Regulation of immunity and inflammation by hypoxia in immunological niches. *Nat Rev Immunol*. 2017;17(12):774–785. DOI: 10.1038/nri.2017.103.

339. Taylor GR, Janney RP In vivo testing confirms a blunting of the human cell-mediated immune mechanism during space flight. // J Leukoc Biol 1992 51(2):129–132
340. Taylor GR, Neale LS, Dardano JR (1986) Immunological analyses of U.S. space shuttle crewmembers. // Aviat Space Environ Med 1999 57(3):213–217
341. Thiam HR, Vargas P, Carpi N, Crespo CL, Raab M, Terriac E, King MC, Jacobelli J, Alberts AS, Stradal T, Lennon-Dumenil AM, Piel M. Perinuclear Arp2/3-driven actin polymerization enables nuclear deformation to facilitate cell migration through complex environments. // Nat Commun 2016 7:10997
342. Thibodeaux K, Speyrer M, Raza A, Yaakov R, Serena TE. Hyperbaric oxygen therapy in preventing mechanical ventilation in COVID-19 patients: a retrospective case series// J Wound Care. 2020 May 1;29(Sup5a):S4-S8.
343. Thiel C.S., Hüge A., Hauschild S., Tauber S., Lauber B.A., Polzer J., Paulsen K., Lier H., Engelmann F., Schmitz B., Schütte A., Layer L.E., Ullrich O. Stability of gene expression in human T cells in different gravity environments is clustered in chromosomal region 11p15.4 // NPJ microgravity. – 2017.
344. Thiel CS, Tauber S, Lauber B, Polzer J, Seebacher C, Uhl R, Neelam S, Zhang Y, Levine H, Ullrich O. Rapid morphological and cytoskeletal response to microgravity in human primary macrophages // Int J Mol Sci. 2019 May 15;20(10):2402.
345. Thom SR, Milovanova TN, Yang M, Bhople VM, Sorokina EM, Uzun G, et al. Vasculogenic stem cell mobilization and wound recruitment in diabetic patients: increased cell number and intracellular regulatory protein content associated with hyperbaric oxygen therapy.// Wound Repair Regen. 2011;19:149–61.
346. Tillmans F, Sharghi R, Noy T, Kähler W, Klapa S, Sartisohn S, Sebels S, Koch A. Effect of hyperoxia on the immune status of oxygen divers and endurance athletes // Free Radic Res. 2019 May;53(5):522-534.
347. Tomiyama C, Watanabe M, Honma T, Inada A, Hayakawa T, Ryufuku M, Abo T. The effect of repetitive mild hyperthermia on body temperature, the autonomic nervous system, and innate and adaptive immunity // Biomed Res. 2015;36(2):135-42.
348. Torina A, Guggino G, La Manna MP, Sireci G. The Janus Face of NKT Cell Function in Autoimmunity and Infectious Diseases // Int J Mol Sci. 2018 Feb 1;19(2):440
349. Torti SR, et al. Risk of decompression illness among 230 divers in relation to the presence and size of patent foramen ovale. // Eur Heart J. 2004;25:1014–20.
350. Trzpis K., Kasprzycka E., Skotnicka B. Expression of Toll-like receptors on peripheral

351. Tsuchiya Y, Shimizu T, Tazawa T, Nakamura K, Yamamoto M Effects of hot deep seawater bathing on the immune cell distribution in peripheral blood from healthy young men // *Environ Health Prev Med*. 2003 Nov;8(5):161-5
352. Ulbrich F, Goebel U The Molecular Pathway of Argon-Mediated Neuroprotection *Int J Mol Sci*. 2016 Oct 31;17(11):1816.
353. Ulbrich F, Kaufmann K, Roesslein M, Wellner F, Auwärter V, Kempf J. Argon mediates anti-apoptotic signaling and neuroprotection via inhibition of toll-like receptor 2 and 4. *PLoS One*. 2015;10
354. Ulbrich F, Lerach T, Biermann J, Kaufmann KB, Lagreze WA, Buerkle H, et al. Argon mediates protection by interleukin-8 suppression via a TLR2/TLR4/STAT3/NF- κ B pathway in a model of apoptosis in neuroblastoma cells in vitro and following ischemia-reperfusion injury in rat retina in vivo. *J Neurochem*. 2016;138:859–73
355. Ullberg M, Jondal M Recycling and target binding capacity of human natural killer cells. // *J Exp Med* 1981;153:615–628
356. Vabulas RM. // Proteasome function and protein biosynthesis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2007 Jan;10(1):24-31. doi: 10.1097/MCO.0b013e328011645b.
357. Vargas P, Barbier L, Sáez PJ, Piel M. Mechanisms for fast cell migration in complex environments. // 2017 *Curr Opin Cell Biol* 48:72–78
358. Vargas-Hernández A, Forbes LR. The Impact of Immunodeficiency on NK Cell Maturation and Function // *Curr Allergy Asthma Rep*. 2019 Jan 19;19(1):2.
359. Velmurugan R, Ramakrishnan S, Kim M, Ober RJ, Ward ES. Phagocytosis of antibody-opsonized tumor cells leads to the formation of a discrete vacuolar compartment in macrophages // *Traffic*. 2018 Apr;19(4):273-284.
360. Vinh A., Drummond G., Sobe C. Immunity and hypertension: New targets to lighten the pressure *Br J Pharmacol*. 2019 Jun;176(12):1813-1817
361. Vorselen D, Roos WH, MacKintosh FC, Wuite GJ, van Loon JJ. The role of the cytoskeleton in sensing changes in gravity by nonspecialized cells // *FASEB J*. 2014 Feb;28(2):536-47.
362. Wallis ZK, Williams KC. Monocytes in HIV and SIV Infection and Aging: Implications for Inflamm-Aging and Accelerated Aging // *Viruses*. 2022 Feb 17;14(2):409.
363. Walsh MC, Takegahara N, Kim H, Choi Y. Updating osteoimmunology: regulation of bone cells by innate and adaptive immunity. *Nat Rev Rheumatol* (2018) 14(3):146–56.
364. Walsh C. P., Bovbjerg D. H., Marsland A. L. Glucocorticoid resistance and β 2-adrenergic receptor signaling pathways promote peripheral pro-inflammatory conditions

- associated with chronic psychological stress: A systematic review across species // Neuroscience and Biobehavioral Reviews. 2021. (128). C. 117–135.
365. Wang J, Barth S, Richardson M, Corson K, Mader J. An outbreak of methicillin-resistant
 366. Wang XX, Kitada Y, Matsui K, Ohkawa S, Sugiyama T, Kohno H, Shimizu S, Lai JE, Matsuno H, Yamaguchi M and Yamaguchi N Variation of cell populations taking charge of immunity in human peripheral blood following hot spring bathing. –Quantitative discussion. *J Jpn Soc Balneol Climatol Phys Med* 1999 **62**, 129–134.
 367. Wang Y., Xie J., Wang N., Li Y. et al. Lactobacillus casei Zhang modulate cytokine and Toll-like receptor expression and beneficially regulate poly I: C-induced immune responses in RAW264.7 macrophages // *Microbiol. Immunol.* 2013. Vol. 57. N 1. P. 54–62.
 368. Ward C, Rettig TA, Hlavacek S, Bye BA, Pecaut MJ, Chapes SK Effects of spaceflight on the immunoglobulin repertoire of unimmunized C57BL/6 mice. 2018 // *Life Sci Space Res* 16:63–75.
 369. Webber T, Ronacher K, Conradie-Smit M, Kleynhans L Interplay Between the Immune and Endocrine Systems in the Lung: Implications for TB Susceptibility // *Front Immunol.* 2022 Feb 22;13:829355.
 370. West EE, Afzali B, Kemper C. Unexpected Roles for Intracellular Complement in the Regulation of Th1 Responses // *Adv Immunol.* 2018;138:35-70.
 371. West EE, Kunz N, Kemper C. Complement and human T cell metabolism: Location, location, location// *Immunol Rev.* 2020 May;295(1):68-81.
 372. Whiteside TL, Herberman RB. The role of natural killer cells in human disease. // 1989 *Clin Immunol Immunopathol* 53:227–228
 373. Widowati W, Jasaputra DK, Sumitro SB, Widodo MA, Mozef T, Rizal R, Kusuma HSW, Laksmiawati DR, Murti H, Bachtiar I, Faried A. Effect of interleukins (IL-2, IL-15, IL-18) on receptors activation and cytotoxic activity of natural killer cells in breast cancer cell // *Afr Health Sci.* 2020 Jun; 20(2): 822–832.
 374. Wieduwild E, Girard-Madoux MJ, Quatrini L, Laprie C, Chasson L, Rossignol R, Bernat C, Guia S, Ugolini S β 2-adrenergic signals downregulate the innate immune response and reduce host resistance to viral infection // *J Exp Med.* 2020 Apr 6;217(4)
 375. Williams RL. Hyperbaric oxygen therapy and the diabetic foot.// *J Am Podiatr Med Assoc.* 1997;87:279–92.
 376. Wingelaar TT, van Ooij PA, van Hulst RA. Otitis externa in military divers: more frequent and less harmful than reported. // *Diving Hyperb Med.* 2017;47:4–8.

377. Wirsching E., Fauler M, Fois G P2 Purinergic Signaling in the Distal Lung in Health and Disease // *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21(14), 4973
378. Wolf AJ, Underhill DM. Peptidoglycan recognition by the innate immune system // *Nat Rev Immunol.* 2018 Apr;18(4):243-254.
379. Wong LM, Jiang G. NF- κ B sub-pathways and HIV cure: A revisit *EBioMedicine.* 2021 Jan;63:103159. doi: 10.1016/j.ebiom.2020.103159. Epub 2020 Dec 16.
380. Woolhouse ME, Webster JP, Domingo E, Charlesworth B, Levin BR. Biological and biomedical implications of the co-evolution of pathogens and their hosts. *Nat Genet.* 2002;32(4):569–77.
381. Wu T, Jiang Q, Wu D, Hu Y, Chen S, Ding T, Ye X, Liu D, Chen J. What is new in lysozyme research and its application in food industry? A review// *Food Chem.* 2019 Feb 15;274:698-709.
382. Xu X, Tan C, Li P, Zhang S, Pang X, Liu H, Li L, Sun X, Zhang Y, Wu H, Chen X, Ge Q. Changes of cytokines during a spaceflight analog--a 45-day head-down bed rest.// *PLoS One.* 2013 Oct 15;8(10)
383. Xue B, Zhang Y, Johnson AK. Interactions of the Brain Renin-Angiotensin-System (RAS) and Inflammation in the Sensitization of Hypertension // *Front. Neurosci.* - 2020 –Vol. 14 Art. 650.
384. Yang X., Lu D., Zhuo J. The Gut-liver Axis in Immune Remodeling: New insight into Liver Diseases // *Int J Biol Sci.* 2020 Jun 23;16(13):2357-2366
385. Yang X, Lin G, Han Z, Chai J. Structural Biology of NOD-Like Receptors// *Adv Exp Med Biol.* 2019;1172:119-141.
386. Yawata N, Yawata M. Assessing the Response of Human NK Cell Subsets to Infection by Clinically Isolated Virus Strains // *Methods Mol Biol.* 2022;2463:205-220.
387. Yi B, Matzel S, Feurecker M, Hörl M, Ladinig C, Abeln V, Choukèr A, Schneider S. The impact of chronic stress burden of 520-d isolation and confinement on the physiological response to subsequent acute stress challenge. // *Behav Brain Res* 2015 281:111–115.
388. Yi B, Rykova M, Feurecker M, Jäger B, Ladinig C, Basner M, Hörl M, Matzel S, Kaufmann I, Strewe C, Nichiporuk I, Vassilieva G, Rinas K, Baatout S, Schelling G, Thiel M, Dinges DF, Morukov B, Choukèr A. 520-d Isolation and confinement simulating a flight to Mars reveals heightened immune responses and alterations of leukocyte phenotype.// *Brain Behav Immun.* 2014 Aug;40:203-10
389. Yu L, Li Y, Du C, Zhao W, Zhang H, Yang Y, Sun A, Song X, Feng Z. Pattern Recognition Receptor-Mediated Chronic Inflammation in the Development and Progression of Obesity-Related Metabolic Diseases // *Mediators Inflamm.* 2019 Sep 8;2019:5271295

390. Zhang X., Li J., Hu F., Gao S., Pu X., Yong S. Decreased number and immune activity of splenic T lymphocytes in mice exposed to hypoxia at high altitude. *Chinese J Cell Mol Immunol.* 2017;33(2):164–7. PMID: 29762003
391. Zhang Y, Liang X, Bao X, Xiao W, Chen G. Toll-like receptor 4 (TLR4) inhibitors: Current research and prospective. // *Eur J Med Chem.* 2022 Mar 15;235:114291.
392. Zhang Y, Zhang Y, Gu W, Sun B. // TH1/TH2 cell differentiation and molecular signals. *Adv Exp Med Biol.* 2014;841:15-44. doi: 10.1007/978-94-017-9487-9_2.
393. Zhao H, Xu L, Bombardi R, Nargi R, Deng Z, Errico JM, Nelson CA, Dowd KA, Pierson TC, Crowe JE, Diamond MS, Fremont DH. Mechanism of differential Zika and dengue virus neutralization by a public antibody lineage targeting the DIII lateral ridge // *J Exp Med.* 2020 Feb 3;217(2):e20191792
394. Zhuang L., Yang T., Zhao H., Fidalgo A.R., Vizcaychipi M.P., Sanders R.D., Yu B., Takata M., Johnson M.R., Ma D. The protective profile of argon, helium, and xenon in a model of neonatal asphyxia in rats. *Crit. Care Med.* 2012;40:1724–1730.
395. Zou Y, Huang Y, Liu S, Yang J, Zheng W, Deng Y, Zhang M, Yan Z, Xie H. Periodontopathic Microbiota and Atherosclerosis: Roles of TLR-Mediated Inflammation
396. Zwart SR, Mehta SK, Ploutz-Snyder R, Bourbeau Y, Locke JP, Pierson DL, Smith SM Response to vitamin D supplementation during Antarctic winter is related to BMI, and supplementation can mitigate Epstein-Barr Virus Reactivation. // *J Nutr* 2011 141(4):692–697.
397. Берендеева Т.А., Пономарев С.А., Антропова Е.Н., Рыкова М.П. Toll-подобные рецепторы клеток периферической крови космонавтов после длительных космических полетов на международной космической станции // *Авиакосмическая и экологическая медицина.* 2015. Т. 49. № 6. С. 49-54.
398. Берендеева Т.А., Рыкова М.П., Антропова Е.Н., Ларина И.М., Моруков Б.В. Состояние системы иммунитета человека в условиях 7-суточной «сухой» иммерсии // *Авиакосмическая и экологическая медицина.* 2009. Т. 43. №5. С. 36-42.
399. Буравкова Л.Б., Григорьева О.В., Константинова Н.А., Гершович Ю.Г., Гершович П.М. Межклеточные взаимодействия в условиях микрогравитации: эксперименты in vitro // *Авиакосмическая и экологическая медицина.*- 2013.- Т. 47.- №1.- С. 68-72.
400. Буравкова Л.Б., Григорьева О.В., Рыкова М.П. Взаимодействие культуры лимфоцитов человека и перевиваемой суспензионной культурой опухолевых миелобластов К-562 в условиях микрогравитации // *Международная космическая станция. Российский сегмент.* /А.И.Григорьев, ред. М., 2011.- Т.2. - С. 367-383.

401. Газенко О.Г., Григорьев А.И., Егоров А.Д. Реакции организма человека на условия космического полета // Физиологические проблемы космических полетов / Под ред. О.Г. Газенко и И.И. Касьяна. М.: Медицина, 1990. С. 155-160.
402. Гурфинкель Ю.И., Васин А.Л., Матвеева Т.А., Сасонко М.Л. Оценка влияния гипоманнитных условий на капиллярный кровоток, артериальное давление и частоту сердечных сокращений // Авиакосмическая и экологическая медицина. – 2014. - Т.48. №2. С.24–30.
403. Ильин В.К., Воложин А.И., Виха Г.В. Колонизационная резистентность организма в измененной среде обитания. М.Наука. 2005. 275 с.
404. Колмаков В.М. Реакция эукариотических и прокариотических клеток на гипогеомагнитное воздействие : автореф. диссертации к-та мед. наук / В. М. Колмаков. – Новосибирск, 2002. – 97 с
405. Константинова, И.В. Система иммунитета в экстремальных условиях. Космическая иммунология. М.: Наука. 1988. 289 с.
406. Козловская И.Б. Фундаментальные и прикладные задачи иммерсионных исследований // Авиакосмическая и экологическая медицина. 2008. Т.42. № 5. С. 3-7.
407. Куликов В. Ю., Козяева Е. А.. Реакция системы крови в условиях электромагнитной депривации. // Journal of Siberian Medical Sciences, 2009 (4), 6.
408. Лебедева С.А., Швед Д.М., Гущин В.И. Предварительные результаты изучения функционального состояния человека-оператора методом анализа акустических характеристик речи в условиях воздействия моделируемых факторов космического полёта. Авиакосмическая и экологическая медицина 2019. Т. 53 №2 С 50-56. DOI: 10.21687/0233-528X-2019-53-2-50-56
409. Лусс Л.В., Мартынов-Радужинский А.А. Вторичная иммунная недостаточность. Всегда ли нужны иммуномодуляторы?// Медицинский совет. 2014. №2. С. 40-45.
410. Моруков Б. В., Рыкова М. П., Антропова Е. Н., Берендеева Т.А., Моруков И.Б., Пономарев С.А. Иммунологические аспекты пилотируемого марсианского полёта //Физиология человека, 2013.-N 2.-С.19-30
411. Новиков В.В., Яблокова Е.В., Шаев И.А., Фесенко ЕЕ Влияние слабого постоянного магнитного поля в диапазоне величин от «нулевого» поля (0,01 мкТл) до 100 мкТл на продукцию активных форм кислорода в неактивированных нейтрофилах. // Биофизика. 2020; 65(3): 524-529
412. Орлов О.И., Колотева М.И. Центрифуга короткого радиуса как новое средство профилактики неблагоприятных эффектов невесомости и перспективные планы по разработке проблемы искусственной силы тяжести применительно к межпланетным

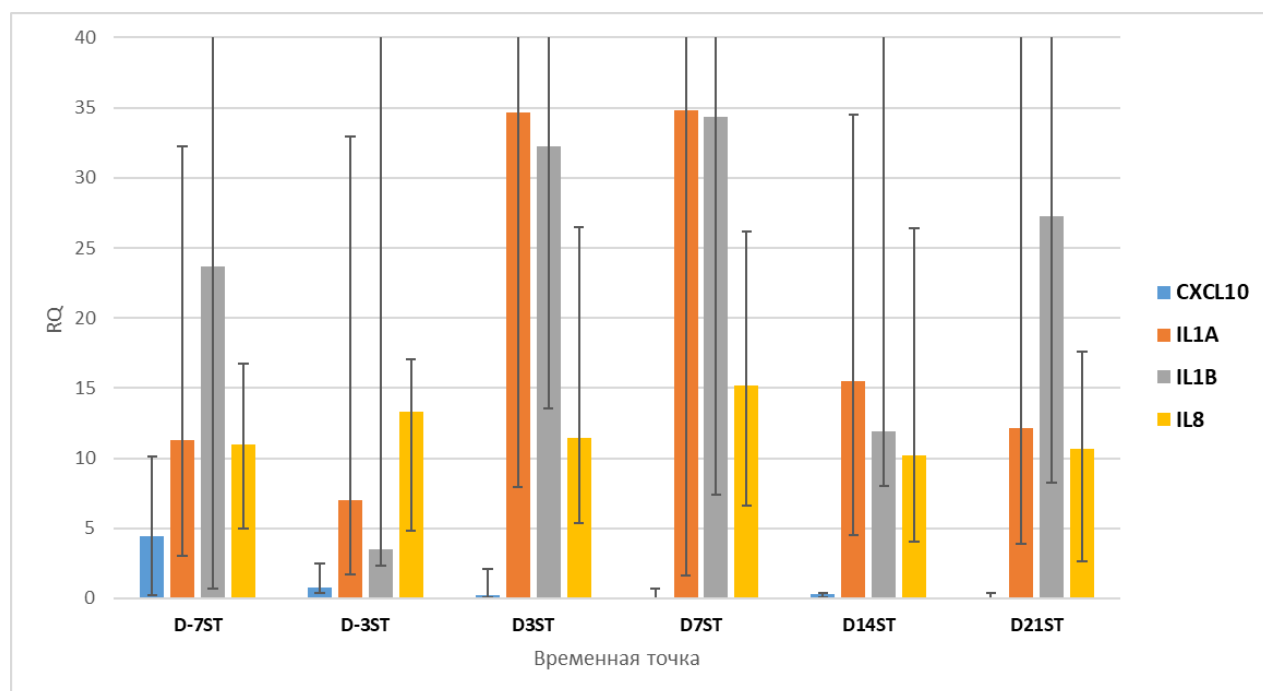
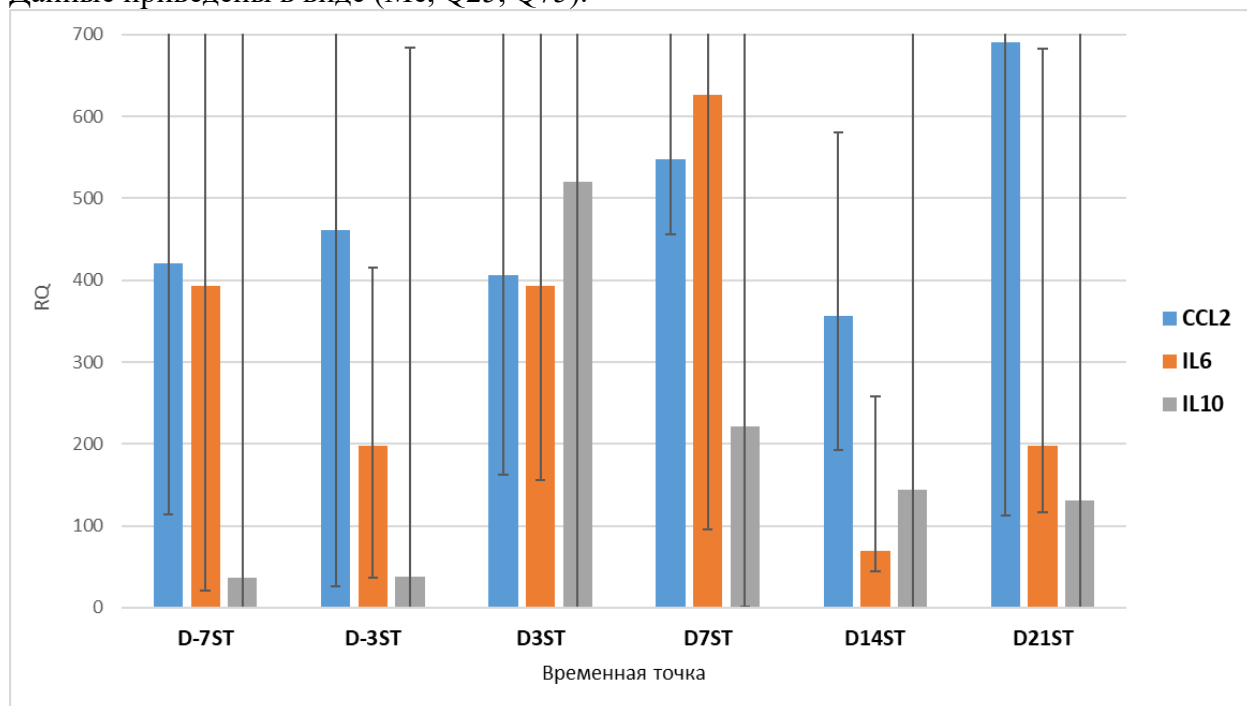
- полетам. Авиакосмическая и экологическая медицина. 2017; 51 (7): 11-18. DOI: 10.21687/0233-528X-2017-51-7-11-18
413. Пономарев С. А., Рыкова М. П., Антропова Е. Н. Цитокиновый профиль испытателей-добровольцев в 21-суточной "сухой" иммерсии// Физиология человека. 2020 г., Т. 46, 2, стр. 76-83.
414. Пономарёв С.А., Берендеева Т.А., Калинин С.А., Муранова А.В. Состояние системы сигнальных образ-распознающих рецепторов моноцитов и гранулоцитов периферической крови космонавтов до и после длительных полётов на международную космическую станцию // Авиакосмическая и экологическая медицина. 2016. Т. 50. № 5. С. 18-23.
415. Пономарёв С.А., Муранова А.В., Калинин С.А., Антропова Е.Н., Рыкова М.П., Колотева М.И., Орлов О.И. Показатели клеточного иммунитета у членов экипажа проекта «Луна-2015». Авиакосмическая и экологическая медицина. 2017; 51 (2): 13-19. DOI: <https://doi.org/10.21687/0233-528X-2017-51-2-13-19>
416. Пономарёв С.А., Рыкова М.П., Антропова Е.Н., Берендеева Т.А., Моруков Б.В. Состояние системы врождённого иммунитета в условиях 5-суточной “сухой” иммерсии // Авиакосмическая и экологическая медицина. 2011. №3. С. 17-23.
417. Пономарёв С.А., Шульгина С.М., Калинин С.А., Антропова Е.Н., Рыкова М.П., Орлова К.Д., Кутько О.В., Шмаров В.А., Власова Д.Д., Садова А.А. Состояние клеточного звена врожденного иммунитета человека во время 120-суточной изоляции в гермообъекте // Авиакосмическая и экологическая медицина 2021. Т. 55. № 2. С. 35–42.
418. Пономарёв С.А., Муранова А.В., Калинин С.А., Антропова Е.Н., Рыкова М.П., Салтыкова М.М., Орлов О.И. Влияние трехминутной холодовой экспозиции в криосауне при температуре -70 °с на состояние клеточного звена иммунной системы организма человека // Авиакосмическая и экологическая медицина. 2017. Т. 51. № 3. С. 54-59.
419. Рыкова М.П. Иммунная система у российских космонавтов после орбитальных полетов // Физиология человека. 2013. Т. 39. № 5. С. 126 – 136.
420. Рыкова М.П., Антропова Е.Н., Берендеева Т.А., Попова Ю.А., Ларина И.М., Моруков Б.В. Показатели системы иммунитета здорового человека в эксперименте с изоляцией в гермообъекте в гипербарической кислородно-азотно-аргоновой среде. Авиакосмическая и экологическая медицина, 2009, том 43, №3. С. 28-33
421. Рыкова М.П., Антропова Е.Н., Берендеева Т.А., Попова Ю., Ларина И.М., Моруков Б.В. Показатели системы иммунитета здорового человека в эксперименте с изоляцией в гермообъекте в гипербарической кислородно-азотно-аргоновой среде. Авиакосмическая и экологическая медицина. 2009;43(3). PMID: 19711859.

422. Симбирцев А.С. Toll-белки: специфические рецепторы неспецифического иммунитета // Иммунология. 2005. № 6. С. 386.
423. Солонин Ю. Г., Бойко Е. Р. Медико-физиологические аспекты жизнедеятельности в Арктике // Арктика: экология и экономика. 2015. № 1 (17), с. 70-75.
424. Томиловская Е.С., Рукавишников И.В., Амирова Л.Е., Шигуева Т.А., , Савеко А.А., Китов В.В., Васильева Г.Ю., Пономарев С.А., Смирнова Т.А., Козловская И.Б., Орлов О.И. 21-суточная "сухая" иммерсия: особенности проведения и основные итоги // Авиакосмическая и экологическая медицина 2020, Т.54., №4
425. Тюрин В.И. Пожары в водолазных и лечебных барокамерах и их профилактика. Спб. 1998.
426. Хайдуков С.В., Зурочка А.В. Цитометрический анализ субпопуляций Т-хелперов (Th1, Th2, Treg, Th17, Т-хелперы активированные) // Медицинская иммунология. 2011. Т. 13. № 1. С. 7-16.
427. Шмарина Г.В., Ершова Е.С., Вейко Н.Н., Пономарев С.А., Кутько О.В., Садова А.А., Беккер А.А., Умрюхин П.Е., Костюк С.В. Активность ДНКазы I крови, концентрация внеклеточной ДНК и уровень 8-оксо-дезоксигуанозина в геномной ДНК как маркеры стресса при гиподинамии и депривации сна // Авиакосмическая и экологическая медицина Том: 53 Номер: 2 Год: 2019

Приложения

Приложение 1. Экспрессия генов, стимулированных коктейлем лигандов TLR моноцитарных культур

Данные приведены в виде (Me, Q25, Q75).



Приложение 2. Синтез цитокинов в стимулированных лигандами TLRs в 24-часовых культурах моноцитов.

Моноциты получены от десяти добровольцев-испытателей в эксперименте с 21-суточной “сухой” иммерсией без средств профилактики. Концентрация выражена в пг/мл и приведена в виде медиан.

Спонтанный синтез								
Цитокин		-7 с	-2 с	3с	7 с	14 с	21 с	+7 с
TNF - alpha	медиана	180,14	33,25	19,06*	71,58	44,53 *	38,31 *	17,69 *
	Q25	43,38	16,82	14,10	15,19	3,87	22,83	9,76
	Q75	472,89	141,22	64,73	81,53	103,82	69,83	34,93
IL1-beta	медиана	37,00	5,23 *	17,37	7,39*	13,82	4,58 *	4,13 *
	Q25	15,24	4,16	8,49	6,22	4,74	3,91	3,12
	Q75	109,39	11,70	24,23	8,42	14,04	6,97	7,45
IL6	медиана	404,09	75,18 *	22,17	45,71*	74,75	9,06 *	5,94 *
	Q25	304,53	13,86	3,90	6,94	8,31	8,34	5,10
	Q75	882,14	153,36	170,05	142,95	330,48	88,22	16,22
IL8	медиана	5170,00	910,57*	562,59 *	1046,00	683,53	1704,00	1104,0
	Q25	1142,32	455,22	428,15	400,00	469,94	610,21	400,00
	Q75	9340,50	7063,00	3551,00	4026,50	5332,58	3570,00	288,00
IL10	медиана	6,56	2,72	3,08	2,64	6,86	4,22	2,69
	Q25	3,15	2,18	2,74	2,49	3,5	2,9	2,47
	Q75	9,32	5,3	6,45	3,65	26,15	4,97	3,24
IFN- gamma	медиана	7,54	6,39	5,63	5,25	6,21	6,01	5,63
	Q25	2,85	3,04	2,83	2,71	4,96	2,99	3,12
	Q75	8,86	9,01	6,86	9,1	9,93	6,78	6,39
IFN- alpha	медиана	34,12	31,69	31,69	28,31*	30,01	30,01	31,69
	Q25	11,46	4,15	4,28	3,70	11,16	4,71	3,34
	Q75	42,29	36,45	34,94	32,43	38,4	34,94	33,33
IL-12	медиана	5,49	4,56	4,33	4,10	3,94 *	4,25	4,41
	Q25	1,53	1,53	1,69	1,51	3,64	1,42	1,42
	Q75	10,26	5,34	4,52	4,95	5,49	4,51	4,56
GM-CSF	медиана	7,01	6,09	4,33	3,74*	3,16	3,94	3,87
	Q25	3,48	3,30	2,61	3,40	3,10	2,81	2,48
	Q75	9,90	8,07	5,24	4,07	8,85	5,28	4,72

Рецептор: TLR1								
Лиганд: Pam3CSK4								
Цитокин		-7 с	-2 с	3с	7 с	14 с	21 с	+7 с
TNF - alpha	медиана	560,80	194,10	400,00	322,20	301,06	232,34	155,42
	Q25	422,40	88,56	74,51	224,95	132,83	182,82	119,13
	Q75	996,50	421,10	614,80	397,28	536,33	332,16	499,73
IL1-beta	медиана	51,90	8,31	54,02	32,75*	26,69*	36,42	15,17
	Q25	25,65	3,03	27,68	17,58	10,93	19,86	12,65
	Q75	83,96	51,45	88,80	58,69	99,39	43,35	27,12
IL6	медиана	1295,79	481,64	842,52*	896,44	847,85*	800,31	400,00
	Q25	517,14	110,54	210,09	609,70	479,52	466,79	261,78
	Q75	5761,00	740,10	2085,00	2067,51	1261,40	3288,50	1705,65
IL8	медиана	5217,00	2141,00	1691,00	4218,00	3470,04*	4685,00	2141,00
	Q25	546,12	543,14	557,30	615,42	657,16	600,33	571,08
	Q75	9903,00	9903,00	8483,50	9903,00	8988,00	8996,00	6334,50
IL10	медиана	31,72	6,46	55,39	31,68	20,7805	54,02	13,38 *
	Q25	19,53	3,21	4,70	19,65	9,92	12,80	7,27
	Q75	101,00	14,22	97,34	60,70	138,05	80,93	35,91
IFN- gamma	медиана	8,86	8,67	9,61	9,61	7,38	8,00	8,28
	Q25	4,86	2,79	2,95	5,09	6,22	4,12	3,32
	Q75	9,99	10,98	11,79	13,40	9,04	9,70	9,89
IFN- alpha	медиана	47,14	17,07	29,16	28,31*	45,13	30,01	31,69
	Q25	28,31	2,78	5,40	4,40	13,43	5,44	4,69
	Q75	55,61	36,83	51,08	46,72	55,26	49,285	46,395
IL-12	медиана	5,49	3,94	5,80	6,11	4,87	5,80	5,72
	Q25	2,52	0,62	1,84	2,70	4,25	1,96	2,525
	Q75	7,16	5,80	6,73	6,652	6,73	6,73	7,12
GM-CSF	медиана	16,96	8,67	30,65	20,08	16,18	56,29	24,97
	Q25	12,67	2,97	8,02	13,83	8,67	18,617	8,95
	Q75	113,40	19,30	82,81	70,65	45,42	71,52	88,20

Рецептор: TLR2								
Лиганд: HKLM								
Цитокин		-7 с	-2 с	3с	7 с	14 с	21 с	+7 с
TNF - alpha	медиана	388,09	134,61 *	310,07	400,00	429,91	425,90	148,35 *
	Q25	301,54	51,01	156,33	131,07	178,29	296,75	124,34
	Q75	4909,00	1433,94	562,50	451,22	582,09	742,92	312,14
IL1-beta	медиана	97,10	10,22 *	63,10	32,48	32,18	63,31	21,42 *
	Q25	23,16	5,79	26,75	18,07	19,082	41,20	11,89
	Q75	307,18	61,65	118,85	50,80	138,44	96,25	36,81
IL6	медиана	802,15	258,53 *	400,00	400,00	646,04	752,23	400,00 *
	Q25	278,38	55,91	117,63	154,35	366,30	399,16	232,95
	Q75	5046,00	2088,79	639,47	669,00	1243,02	1471,50	568,48
IL8	медиана	8817,00	2502,00	709,01	3288,00	4441,50	8472,00	4486,00
	Q25	567,73	509,42	478,85	558,93	1044,56	576,75	559,16
	Q75	9903,00	9212,50	9903,00	8703,50	8897,50	9434,00	9312,00
IL10	медиана	57,62	6,96 *	33,39	14,23	62,93	90,65	17,90*
	Q25	23,20	1,49	9,53	9,53	53,24	34,84	10,40
	Q75	320,96	94,64	110,94	35,98	179,04	135,84	26,23
IFN-gamma	медиана	12,28	8,67 *	8,67	6,78	7,09	9,14	7,16 *
	Q25	4,36	3,45	3,53	3,56	5,36	3,92	3,66
	Q75	13,15	11,59	11,54	12,12	9,47	10,17	9,04
IFN-alpha	медиана	44,20	34,95	33,33	30,01	35,51	38,12	40,44
	Q25	4,79	2,99	4,71	4,69	11,21	5,61	4,29
	Q75	52,06	45,96	47,85	41,31	44,93	48,58	44,92
IL-12	медиана	6,89	4,715 *	5,49	5,33	4,72 *	6,11	5,18 *
	Q25	1,63	1,50	3,46	3,475	1,43	3,03	0,68
	Q75	61,43	13,36	7,08	6,03	6,49	6,96	6,19
GM-CSF	медиана	166,16	69,64 *	70,84	67,49	88,2	93,255	72,73 *
	Q25	24,82	15,73	21,73	34,71	46,25	41,48	22,30
	Q75	341,98	186,17	105,92	97,21	146,22	126,4	88,10

Рецептор: TLR3								
Лиганд: HKLM								
Цитокин		-7 с	-2 с	3 с	7 с	14 с	21 с	+7 с
TNF - alpha	медиана	65,20	64,85	131,59	97,12	32,72	32,41	39,72 *
	Q25	57,92	25,65	32,30	38,24	27,05	25,03	34,07
	Q75	96,30	139,50	141,24	251,06	74,09	100,29	54,63
IL1-beta	медиана	9,26	8,51 *	27,38	15,68	6,84	10,18	7,50
	Q25	6,52	3,58	12,21	8,80	5,10	7,57	6,83
	Q75	28,07	11,58	42,87	18,89	22,07	11,09	9,79
IL6	медиана	284,73	112,60	166,09	119,63	30,42	38,89	61,67 *
	Q25	64,41	51,49	84,86	71,36	15,17	27,51	30,45
	Q75	676,25	322,34	423,95	202,66	173,06	154,59	89,87
IL8	медиана	2291,44	1181,93	2867,00	1145,00*	1991,81	2925,00	1485,00
	Q25	477,72	459,46	524,14	496,76	501,90	430,81	429,51
	Q75	8395,25	7065,25	4956,50	7678,00	5320,00	4638,00	5165,50
IL10	медиана	4,66	3,10	5,95	5,60	3,64	5,52	3,85
	Q25	3,40	1,39	3,07	4,48	3,13	3,58	3,61
	Q75	5,69	4,76	12,60	7,04	7,07	9,42	5,38
IFN- gamma	медиана	6,78	8,20	7,16	6,20	6,53	6,39	7,92
	Q25	2,18	2,45	3,39	2,02	5,22	3,42	3,93
	Q75	9,43	10,64	9,61	8,95	7,35	7,92	9,98
IFN- alpha	медиана	20,55	18,60	33,33	31,69	30,82	34,95	34,95
	Q25	3,11	3,08	7,00	3,87	11,46	4,38	5,27
	Q75	34,95	38,09	36,93	31,69	36,92	38,08	36,94
IL-12	медиана	6,20	16,19	7,04	4,25	5,18	5,80	6,11
	Q25	2,02	0,97	2,52	2,43	5,16	3,66	2,47
	Q75	26,03	27,87	21,28	24,58	5,18	18,14	10,83
GM-CSF	медиана	53,83	55,06	58,66	50,08	53,83	64,52	62,27
	Q25	2,12	1,37	16,32	21,79	42,32	18,13	16,32
	Q75	70,46	86,04	82,02	63,95	56,29	72,74	67,57

Рецептор: TLR4								
Лиганд: LPS-EK								
Цитокин		-7 с	-2 с	3 с	7 с	14 с	21 с	+7 с
TNF - alpha	медиана	963,42	180,34	516,50*	2399,00	1356,98	5507,00	1162,00
	Q25	400,00	169,18	454,00	631,31	592,05	741,41	678,48
	Q75	6491,00	3479,00	6832,00	7988,50	3750,50	5838,00	2824,00
IL1-beta	медиана	710,91	63,13	593,32	895,90	260,83	1306,00	355,38
	Q25	360,39	12,82	251,67	223,89	195,99	554,20	87,39
	Q75	2064,00	675,49	1765,97	2015,00	379,04	3253,00	408,25
IL6	медиана	995,23	704,88	813,90	2103,00	2186,41	4583,00	904,20
	Q25	400,00	212,03	362,80	692,84	659,71	625,49	608,95
	Q75	5238,00	4717,00	6464,50	6755,50	5174,00	6109,00	3506,50
IL8	медиана	685,54	640,09	2766,00	8686,00	4141,00	8049,00	5704,00
	Q25	400,00	278,37	561,03	2600,20	567,92	583,94	673,92
	Q75	9903,00	8138,00	9903,00	9903,00	8895,00	9717,00	9903,00
IL10	медиана	70,06	4,53	209,65	102,97	269,74	708,76	57,93
	Q25	67,99	3,08	27,51	55,41	86,12	112,86	34,06
	Q75	274,95	295,91	324,53	1199,70	547,65	890,35	348,37
IFN-gamma	медиана	11,67	13,15	9,42	11,43	10,42	9,71	9,42
	Q25	0,86	0,60	4,98	4,53	6,72	5,26	5,12
	Q75	17,14	13,71	9,85	12,88	12,58	13,43	11,17
IFN-alpha	медиана	7,06	3,87	40,44	47,14	42,49	47,87	38,12
	Q25	2,46	3,18	4,26	4,70	14,15	5,20	5,76
	Q75	56,30	59,68	54,58	56,30	61,23	60,94	50,65
IL-12	медиана	3,81	7,86	6,42	10,80	7,98	11,75	6,58
	Q25	0,48	0,48	2,83	1,34	5,65	3,45	4,04
	Q75	176,84	20,48	11,59	13,81	14,92	15,01	9,63
GM-CSF	медиана	190,89	16,18	66,90	35,45	58,85	126,12	45,60
	Q25	27,61	5,41	14,18	24,75	30,88	72,65	20,20
	Q75	248,98	50,98	201,67	153,91	61,68	187,12	82,47

Рецептор: TLR5								
Лиганд: FLA-ST								
Цитокин		-7 с	-2 с	3с	7 с	14 с	21 с	+7 с
TNF - alpha	медиана	957,68	467,00	873,03	3930,00	3293,00	5697,00	1322,00
	Q25	355,59	264,16	275,53	686,91	736,32	691,57	694,44
	Q75	6571,00	4041,00	7606,50	7366,50	5731,75	6995,50	4835,50
IL1-beta	медиана	243,03	62,77	756,80	657,65	340,28	558,84	110,22
	Q25	68,50	27,81	187,27	177,95	143,41	296,10	46,56
	Q75	2363,00	631,20	854,93	904,17	431,68	1733,50	437,50
IL6	медиана	849,14	830,05	876,67	3987,00	5994,00	4607,00	1987,00
	Q25	400,00	400,00	302,89	637,05	1443,00	630,07	683,30
	Q75	5501,00	6847,00	6246,00	6384,50	6806,00	6139,50	4173,50
IL8	медиана	671,76	681,82	2255,00	9333,00	7741,00	8049,00	6657,00
	Q25	400,00	400,00	667,59	596,05	1962,56	593,07	633,31
	Q75	9903,00	9903,00	9599,00	9903,00	9903,00	9205,00	9524,00
IL10	медиана	47,69	15,20	257,83	183,85	431,90	705,48	72,30
	Q25	33,86	6,92	32,17	56,41	155,99	93,06	51,55
	Q75	306,11	290,37	641,47	1269,50	946,20	1003,09	385,61
IFN-gamma	медиана	10,86	13,15	8,10	10,92	9,89	12,78	9,80
	Q25	0,91	0,95	2,51	5,31	8,07	5,87	4,52
	Q75	15,00	18,57	10,27	11,69	11,62	13,52	11,49
IFN-alpha	медиана	6,46	7,39	34,95	47,14	50,44	47,14	41,20
	Q25	3,18	6,76	4,94	4,20	15,60	5,58	5,67
	Q75	59,01	60,35	58,33	55,25	61,68	64,21	51,33
IL-12	медиана	3,63	3,79	6,73	8,30	7,55	7,55	5,28
	Q25	1,19	1,41	2,99	2,44	7,34	5,62	4,98
	Q75	15,20	24,59	18,19	13,61	9,07	14,09	7,46
GM-CSF	медиана	145,94	38,52	128,61	99,79	84,53	122,59	51,18
	Q25	9,36	17,82	14,99	39,94	46,34	66,41	22,40
	Q75	323,06	85,10	222,36	147,64	154,54	170,11	151,23

Рецептор: TLR6								
Лиганд: FSL-1								
Цитокин		-7 с	-2 с	3с	7 с	14 с	21 с	+7 с
TNF - alpha	медиана	644,95	308,40	190,89	303,91	140,34	169,37	224,43
	Q25	92,24	86,61	74,38	60,20	103,43	165,63	118,52
	Q75	1644,00	2053,39	436,65	800,22	223,78	276,97	418,24
IL1-beta	медиана	60,42	18,41 *	43,75	46,87	26,12	39,01	26,41
	Q25	9,95	9,19	34,65	17,41	20,78	23,36	17,28
	Q75	106,81	63,97	57,32	75,47	79,80	49,19	39,18
IL6	медиана	782,33	346,51	555,85	661,56	622,56	817,87	631,46 *
	Q25	526,57	149,48	285,31	415,63	436,71	400,00	315,57
	Q75	4087,50	4097,00	1057,89	2589,00	805,37	1794,00	1094,8 3
IL8	медиана	9903,00	5975,00	2443,00*	6634,00	5066,00	9041,00	5965,0 0
	Q25	528,24	562,33	554,14	634,43	1303,15	400,00	638,71
	Q75	9903,00	9903,00	9588,00	9903,00	9033,25	9260,00	9631,0 0
IL10	медиана	8,98	9,41	32,32	17,37	35,08	38,61	7,39
	Q25	5,16	2,97	3,09	6,94	22,78	23,13	5,09
	Q75	55,18	81,53	43,45	56,52	44,33	66,47	13,24
IFN- gamma	медиана	9,42	10,00	8,29	9,05	9,24	9,61	8,67
	Q25	3,75	3,56	3,74	4,45	6,96	0,71	3,52
	Q75	15,68	11,11	11,58	10,92	10,16	11,11	9,00
IFN- alpha	медиана	38,90	36,55	33,33	42,71	37,95	43,46	41,20
	Q25	3,85	4,01	4,12	4,22	11,08	5,52	4,13
	Q75	50,99	50,65	44,17	48,49	48,57	54,23	45,67
IL-12	медиана	4,65	4,44	4,34	5,07	4,34	5,69	4,44
	Q25	1,47	0,72	2,35	1,58	1,71	1,38	0,91
	Q75	6,62	6,73	5,33	5,36	5,57	5,69	5,38
GM-CSF	медиана	11,21	15,37	8,59	10,37	8,33	13,05	11,09
	Q25	4,73	6,10	4,85	7,26	6,29	11,61	4,98
	Q75	28,43	44,22	20,51	31,89	12,26	15,19	16,50

Рецептор: TLR8								
Лиганд: ssRNA40								
Цитокин		-7 с	-2 с	3с	7 с	14 с	21 с	+7 с
TNF - alpha	медиана	215,06	199,08	337,88	218,87	309,40	400,00	167,01
	Q25	142,73	90,37	226,53	125,86	148,31	235,94	111,01
	Q75	7776,50	3267,00	511,70	3718,60	379,01	1261,21	781,50
IL1-beta	медиана	99,28	94,04	200,40	131,86	162,36	155,14	112,56
	Q25	28,22	34,01	39,33	49,60	101,96	126,62	31,03
	Q75	3493,50	1331,65	434,57	1485,08	294,70	572,68	208,82
IL6	медиана	741,22	385,53	400,00	374,14	490,40	742,64	400,00
	Q25	251,83	82,26	150,20	277,25	303,10	475,14	105,57
	Q75	6266,50	3934,00	642,61	3094,05	602,44	1925,61	825,64
IL8	медиана	5217,00	2141,00	1691,00	4218,00	3470,05	4685,00	2141,00
	Q25	546,13	543,14	557,30	615,42	657,17	600,34	571,09
	Q75	9903,00	9903,00	8483,50	9903,00	8988,00	8996,00	6334,50
IL10	медиана	9,50	4,36 *	8,83	19,85	19,45	27,91	7,84
	Q25	5,71	2,93	4,49	12,20	9,02	13,87	3,72
	Q75	213,28	101,13	32,10	635,27	150,83	80,43	24,32
IFN- gamma	медиана	12,41	8,85	8,67	8,67	7,73	8,10	7,73
	Q25	4,15	2,18	3,48	4,28	6,01	4,33	3,08
	Q75	14,99	11,30	12,02	13,31	9,57	12,57	10,74
IFN- alpha	медиана	34,95	33,33 *	32,51	39,67	34,94	42,71	30,01
	Q25	5,39	3,85	3,78	4,04	13,35	4,41	4,88
	Q75	56,30	51,43	46,37	51,33	46,65	49,96	44,90
IL-12	медиана	6,62	5,27	4,86	4,97	4,37	5,38	4,86
	Q25	2,80	1,66	2,15	2,52	3,70	2,89	2,99
	Q75	7,94	7,16	6,62	6,37	5,22	6,52	6,00
GM-CSF	медиана	16,30	14,95	11,30	10,04	13,48	17,80	5,67
	Q25	4,01	3,36	5,88	6,87	7,54	15,23	4,90
	Q75	56,42	53,57	13,83	229,90	13,83	21,14	13,37

Рецептор: TLR9								
Лиганд: ODN2006								
Цитокин		-7 с	-2 с	3с	7 с	14 с	21 с	+7 с
TNF - alpha	медиана	87,90	37,93 *	86,96	18,92	64,64	43,09 *	27,05 *
	Q25	56,70	19,75	24,66	8,36	14,34	20,74	22,06
	Q75	128,46	66,71	178,23	115,11	138,25	87,82	38,36
IL1-beta	медиана	11,34	4,93 *	21,62	10,66	9,95	9,40	4,36 *
	Q25	7,69	3,96	5,82	3,07	1,96	4,19	3,46
	Q75	41,15	5,74	45,17	15,80	27,28	16,97	4,85
IL6	медиана	323,04	38,58*	208,62	50,82*	42,65*	51,70	41,92 *
	Q25	118,21	15,49	5,82	3,17	1,96	19,10	13,46
	Q75	491,83	79,26	530,37	170,49	308,66	418,46	57,29
IL8	медиана	1996,74	854,50	3442,00	701,22 *	1383,00	3361,00	1224,00
	Q25	488,62	400,00	400,00	482,41	592,88	583,01	487,82
	Q75	8237,00	3901,00	6402,00	5773,50	1823,00	4978,50	3788,50
IL10	медиана	4,74	2,85	3,85	4,30	4,08	4,65	3,79
	Q25	3,25	1,81	3,64	2,99	3,39	3,12	2,97
	Q75	6,97	3,83	5,95	6,35	17,82	9,31	4,66
IFN- gamma	медиана	6,21	6,01	5,25	6,78	6,01	6,78	6,01
	Q25	2,04	2,16	0,64	2,89	6,01	3,32	2,73
	Q75	7,70	8,66	6,78	11,34	9,99	8,49	6,97
IFN- alpha	медиана	17,33	18,92	18,84	31,69	31,69	33,33	28,31
	Q25	4,31	3,11	3,07	3,17	28,31	5,21	3,70
	Q75	32,52	32,92	35,34	38,77	33,33	35,73	35,34
IL-12	медиана	3,81	3,81	3,18	3,92	3,60	3,81	3,39
	Q25	1,11	0,62	0,83	1,21	3,39	0,97	1,16
	Q75	3,92	4,23	4,44	5,07	4,23	4,08	4,00
GM-CSF	медиана	4,39	4,39	4,79	4,53	4,26	5,24	3,87
	Q25	3,61	3,36	3,61	3,45	3,61	4,92	2,12
	Q75	4,62	4,39	6,48	6,42	6,29	5,73	4,26

* -достоверное различие с первым фоном (-7 сутки) и спонтанным синтезом цитокинов, $p < 0,05$