

Пономарёв Сергей Алексеевич

**«МОЛЕКУЛЯРНО-КЛЕТОЧНЫЕ ОСНОВЫ ИММУННОГО ГОМЕОСТАЗА
ЧЕЛОВЕКА ПРИ КОСМИЧЕСКОМ ПОЛЁТЕ И ДРУГИХ ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ
ВОЗДЕЙСТВИЯХ»**

Специальность: 3.3.7 - Авиационная, космическая и морская медицина

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

Москва – 2023

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Государственном научном центре Российской Федерации – Институте медико-биологических проблем Российской академии наук (ГНЦ РФ – ИМБП РАН).

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

Официальные оппоненты: Юшков Борис Германович, доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, главный научный сотрудник, зав. лабораторией иммунофизиологии и иммунофармакологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института иммунологии и физиологии Уральского отделения Российской академии наук

Козлов Иван Генрихович, доктор медицинских наук, профессор, профессор кафедры организации и управления в сфере обращения лекарственных средств института последипломного образования Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования Первого Московского государственного медицинского университета имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет)

Атякшин Дмитрий Андреевич, доктор медицинских наук, доцент, директор Научно-образовательного ресурсного центра инновационных технологий иммуно-фенотипирования цифрового пространственного профилирования и ультразвукового анализа (молекулярной морфологии) Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования "Российского университета дружбы народов имени Патриса Лумумбы".

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт медицины труда имени академика Н.Ф. Измерова».

Защита диссертации состоится « ____ » _____ 2023 г. в ____ часов на заседании диссертационного совета 24.1.023.01 в ГНЦ РФ – ИМБП РАН по адресу: 123007, г. Москва, Хорошевское шоссе, д. 76а.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГНЦ РФ – ИМБП РАН и на сайте <http://www.imbp.ru/WebPages/win1251/ScienceN/DisserSov/Ponomarev2023/Ponomarev.html>

Автореферат разослан « ____ » _____ 2023 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,

кандидат биологических наук

С.В. Поддубко

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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 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 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, 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.

Являясь важным интегративным звеном, иммунная система одной из первых физиологических систем реагирует на изменение гомеостаза организма человека (Crucian 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 et al., 2014), изменение газового состава (Рыкова и др., 2009), вызываемый напряжёнными условиями психологический стресс (Breen M., 2016), изменение гравитационного градиента (Mann et al., 2019), давление (Brenner et al., 1999), радиация (Fernandez-Gonzalo, 2017), которые не приводят к развитию классического иммунного ответа, однако способствуют изменению иммунного гомеостаза и, как следствие, изменению степени выраженности иммунного ответа (Buchheim 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, взаимодействия 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

На сегодняшний день хорошо известно, 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 et al 2009). Ning и др. *in vitro* и *in vivo* на мышинной модели продемонстрировали, что аргон уменьшает время заживления ран (Ning et al., 2019). Эксперимент с девятисуточным пребыванием человека в гермокамере в условиях гипербарической нормоксической и гипоксической кислородно-азотно-аргоновой среды выявил усиление индуцированной продукции цитокинов клетками моноцитарно-макрофагального ряда и снижение синтеза про и противовоспалительных цитокинов лимфоцитами периферической крови (Рыкова и др., 2009). Tillmans и др., показали, что у глубоководных ныряльщиков сдвигается баланс в сторону провоспалительного иммунного ответа по сравнению с контрольной группой (Tillmans 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 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 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 2002, Morukov et al., 2011, Stowe et al., 2013, Рыкова, 2013), а также изменения в системе естественной резистентности (Пономарёв и др., 2011).

Изменения в иммунной системе возникают и 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, повышении синтеза провоспалительных цитокинов и снижении клеток системы естественной резистентности, экспрессирующих TLRs с внутриклеточной и поверхностной локализацией (Crucian et al 2014, Yi et al 2014, Моруков и др., 2013).

В экспериментах с антиортогостатической гипокинезией, было показано достоверное снижение продукции провоспалительных цитокинов активированными Т- и В-клетками,

снижение содержания Т-хелперов, увеличение количества регуляторных Т-клеток (Hoff, 2015 Navasiolava et al., 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 et al., 2011), изменения сывороточной концентрации про-и противовоспалительных цитокинов, а также цитокинов, синтезируемых мононуклеарными клетками в культурах *in vitro* (Берендеева и др., 2009), выявлены разнонаправленные изменения со стороны системы TLRs (Пономарёв и др., 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, 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 проведенном 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 тематики 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 образраспознающих рецепторов семейства toll-like при моделировании некоторых факторов КП”), гранта Российского фонда фундаментальных исследований (РФФИ “мол_a” 14-04-31446 “Исследование изменений в системе сигнальных образраспознающих рецепторов клеток врождённого иммунитета человека под воздействием факторов длительного космического полёта”, гранта 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 персонафицированных 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 Конференцию молодых ученых, специалистов и студентов, посвященную дню космонавтики Москва, 2012, 40 международную ассамблею COSPAR, Москва, 2014, XIV Конференцию молодых ученых, специалистов и студентов, посвященную 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 Конференцию по космической биологии и авиакосмической медицине с международным участием, Москва-2018, Международную научную конференцию “Человек в космосе” (HIS-2019), Дубай, 2019, Международную научную конференцию “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 наземных 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 247 страницах машинописного текста, содержат 47 таблиц и 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.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Основные направления и объём проводимых исследований представлены в таблице 1.

Таблица 1. Объём и структура исследований

№	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 гермообъёме с искусственной средой обитания				
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 ⁰ С)	3 минуты	6	0	27-34
2.4.	Эксперимент с пребыванием в гипомагнитных 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), генерируемой при помощи ЦКР	1	15	5	22-40

Все проведенные эксперименты проходили с участием испытателей-добровольцев, женщин и мужчин, подписавших форму добровольного информированного согласия на участие в исследовании в соответствии с Хельсинской декларацией. Научная программа каждого из

проведённых и рассмотренных в настоящей работе экспериментов, утверждалась на заседании Учёного Совета ГНЦ РФ-ИМБП РАН или его секцией, с последующим одобрением Комиссией по биомедицинской этике ГНЦ РФ-ИМБП РАН. Всего в экспериментальных исследованиях приняло участие 114 условно здоровых мужчин и 15 условно здоровых женщин.

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.

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.

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-глутамин (Gibco, США), 1% пенициллина/стрептомицина (Gibco, США), 5% инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone, США)) до концентрации $5 \cdot 10^5$ 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 НКЛМ, 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, Nycult Biotech, Нидерланды), TLR5 (TLR5-PE, Invitrogen, США), TLR6 (TLR6-PE, Nycult 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 довели 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 мононуклеарные лейкоциты. После чего из клеточной суспензии выделяли популяции CD14⁺-клеток и CD3⁺-клеток методом иммуномагнитной сепарации с использованием технологии MACS (Miltenyi Biotech, Германия) согласно инструкции производителя. Монокультуры CD3⁺-Т-лимфоцитов культивировали в стерильных пластиковых пробирках объемом 5 см³ (Falcon, BD) (в концентрации 10⁶ кл/мл) в питательной среде RPMI-1640 (Gibco, США), содержащей 2 мМ L-глутамин (Gibco, США), 1% пенициллина/стрептомицина (Gibco, США), 5% инактивированной 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-глутамин, 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 °С до тестирования.

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 4°C, 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 -80°C.

Для определения содержания цитокинов в супернатантах клеточных культур надосадочную жидкость отбирали, центрифугировали в течение 15 минут при 10000g при 4°C. Затем образцы аликвотировали и хранили при температуре -80°C.

Подготовка и анализ биоматериала осуществлялись согласно инструкции производителя.

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 1мкл 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 ДТТ, 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 (ТВР, GAPDH) и разводили до оптимальной концентрации, затем алиquotы 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 (ТВР) 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 образцах.

Исучаемые 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- κ B 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, I κ Bальфа/mad3, I κ Bбета, NFKBIE, NFKBIL1, NFKBIL2, NFRKB, REL, 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.

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 Dickenson, 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".

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние искусственной силы тяжести, генерируемой посредством центрифуги короткого радиуса на состояние иммунной системы человека.

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 искусственная гравитация 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 (рисунок 1). До вращений (фоновое обследование), а также после завершения каждого из трёх режимов вращений на центрифуге, в периферической крови испытуемых-добровольцев анализировалось 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).

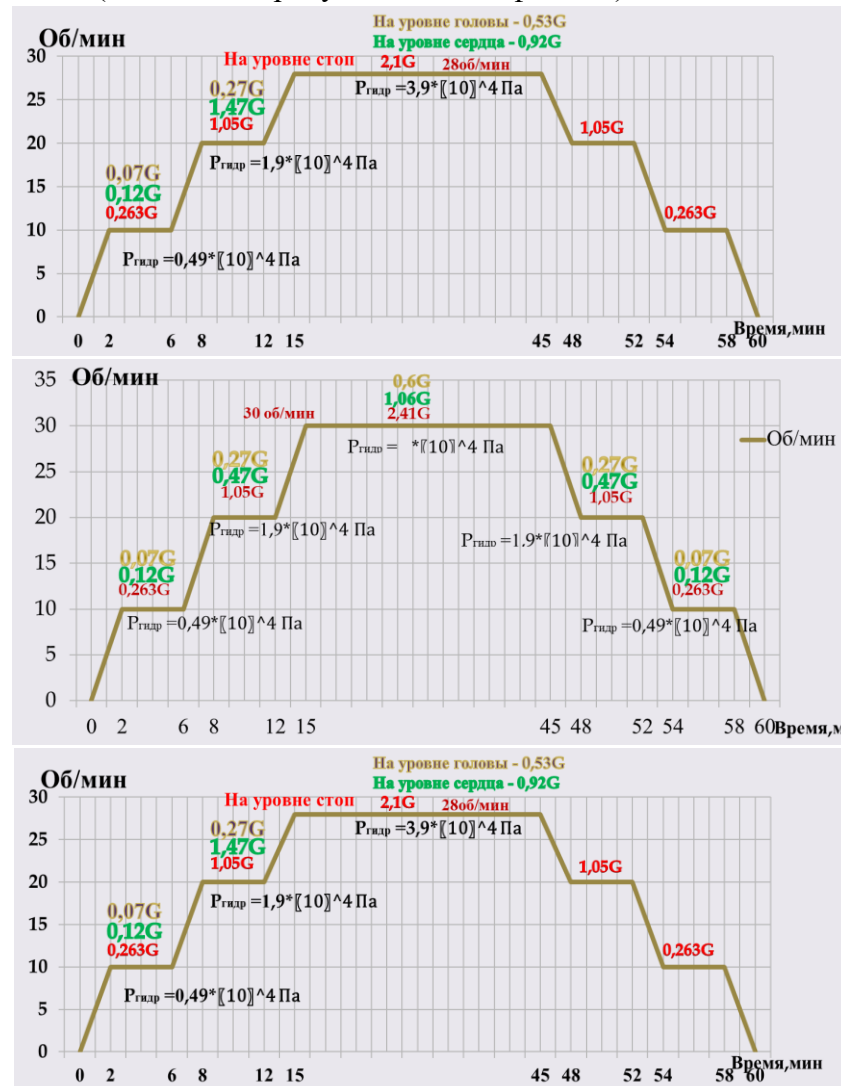


Рисунок 1. Профили вращения на ЦКР (по данным М.И. Колотевой)

В результате проведённых исследований было установлено, что вращение в режимах 1 и 3 не оказывало существенного воздействия на содержание субпопуляций моноцитов (таблица 2).

Таблица 2. 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)

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

Таблица 3. 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).

Таблица 4. 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).

Однако после завершения вращения испытуемых-добровольцев в режиме 2 наблюдалось значимое снижение числа моноцитов, экспрессирующих на своей мембране TLR6 и TLR2⁺ - гранулоцитов. Остальные исследуемые показатели моноцитов и гранулоцитов достоверно не изменялись (таблица 2, 3).

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⁺), при этом не наблюдалось существенных изменений содержания в периферической крови В-лимфоцитов (CD19⁺ -клеток) и двух основных субпопуляций Т-лимфоцитов (CD3⁺CD4⁺ - и CD3⁺CD8⁺-клеток). Вращение на ЦКР в режимах 2 и 3 не вызывало достоверных изменений ни одной из анализируемых популяций клеток адаптивного звена иммунитета (таблица 4)

Для более детального изучения влияния ИСТ на иммунную систему человека был проведён эксперимент с участием шести здоровых испытуемых-добровольцев, лиц мужского пола. В целях минимизации влияния психологического фактора, связанного со страхом

вращения на ЦКР, как и в проведённых ранее экспериментах, перед основным воздействием проводилось ознакомительное вращение, по характеристикам не отличающееся от экспериментального, что способствовало снижению уровня тревожности испытуемых.

Основное (экспериментальное) вращение на ЦКР осуществлялось в течение часа по заданной схеме (рисунок 2)

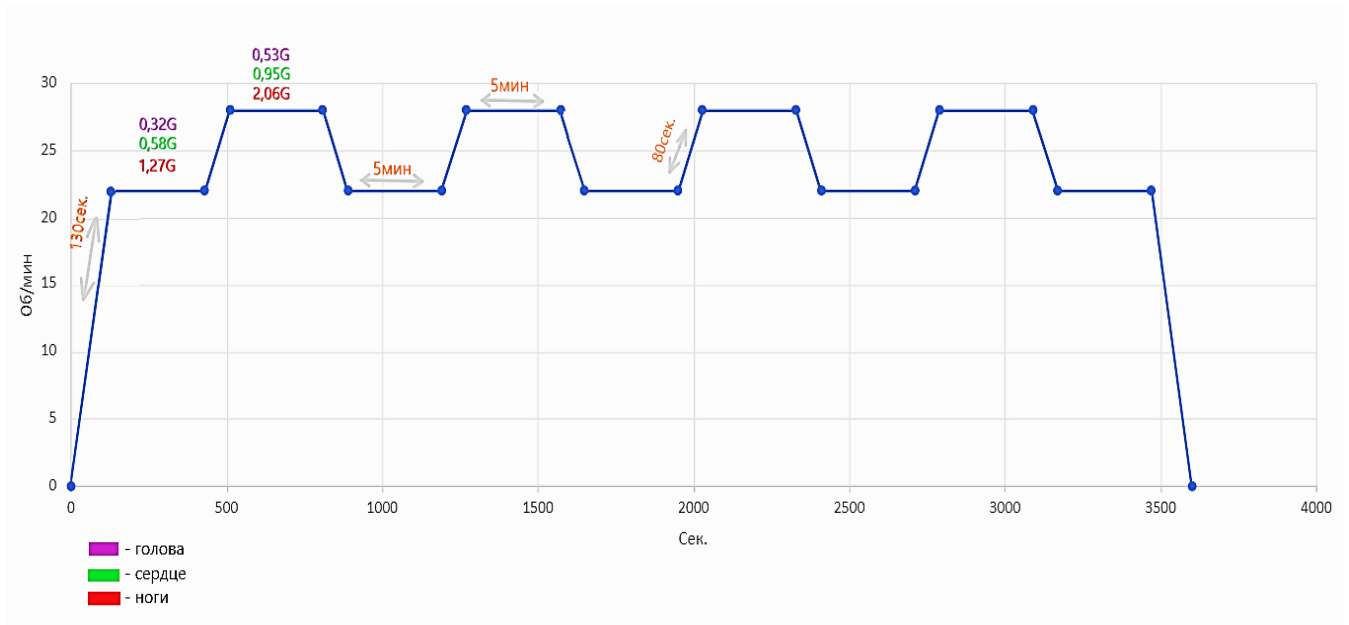
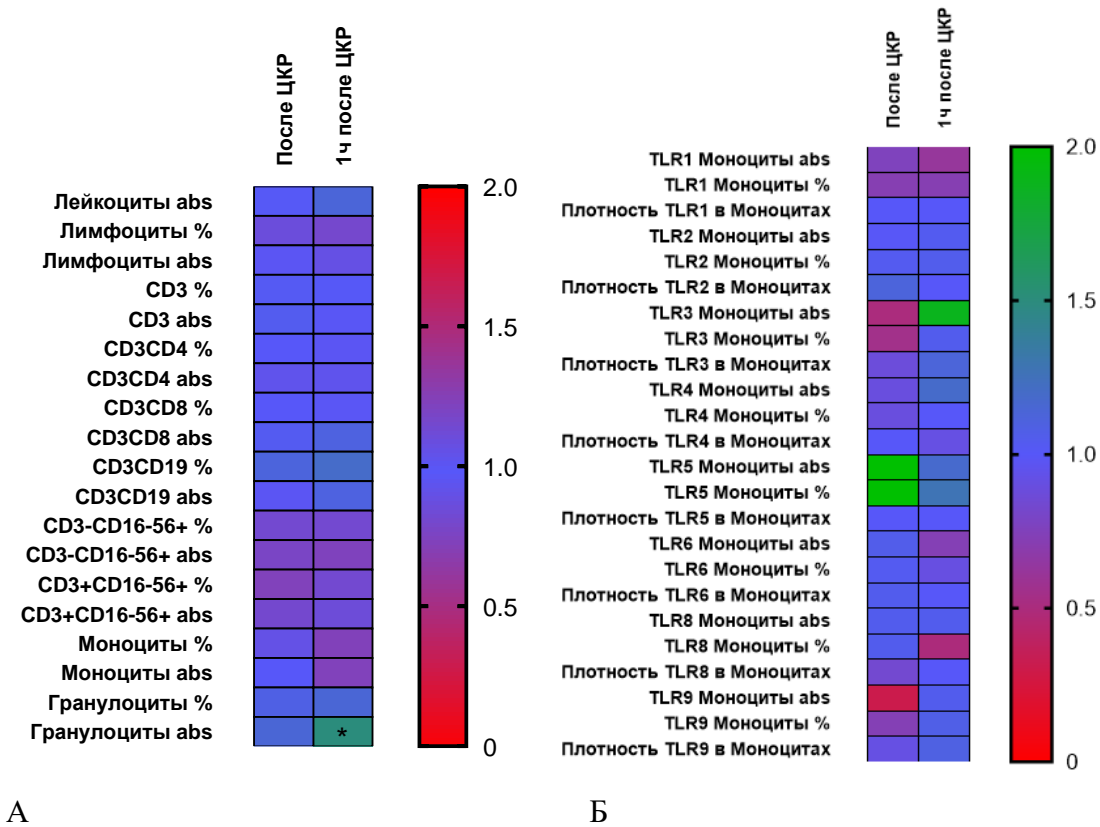


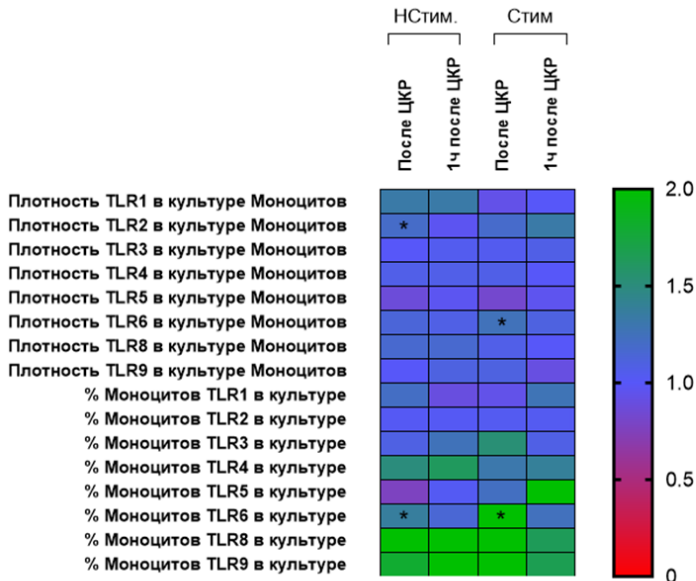
Рисунок 2. Профиль перегрузок во время 60-минутного вращения на ЦКР (по данным М.И. Колотевой)

В проведённом эксперименте был изучен ряд показателей, характеризующих состояние клеточного звена адаптивного иммунитета (общее и процентное содержание в периферической крови В-лимфоцитов, всей популяции Т-лимфоцитов (CD3), цитотоксических лимфоцитов (CD3+CD8+), Т-хелперов (CD3+CD4+), НКТ-клеток (CD3+CD16+CD56+), а также врождённого иммунитета (содержание НК-клеток (CD3-CD16+CD56+) (Рисунок 3А), моноцитов, экспрессирующих TLRs с поверхностной (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6) и внутриклеточной (TLR3, TLR8, TLR9) локализацией) (Рисунок 3Б). 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 (Рисунок 3В). Кроме того, был изучен каскад генов (всего более 80, подробный перечень изученных генов приведён в разделе “материалы и методы”) проводящих путей TLRs моноцитов периферической крови и стимулированных соответствующими лигандами в 24-часовых культурах (Рисунок 4).



А

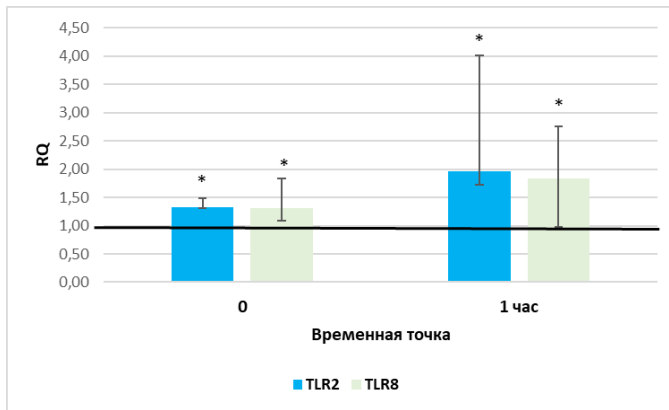
Б



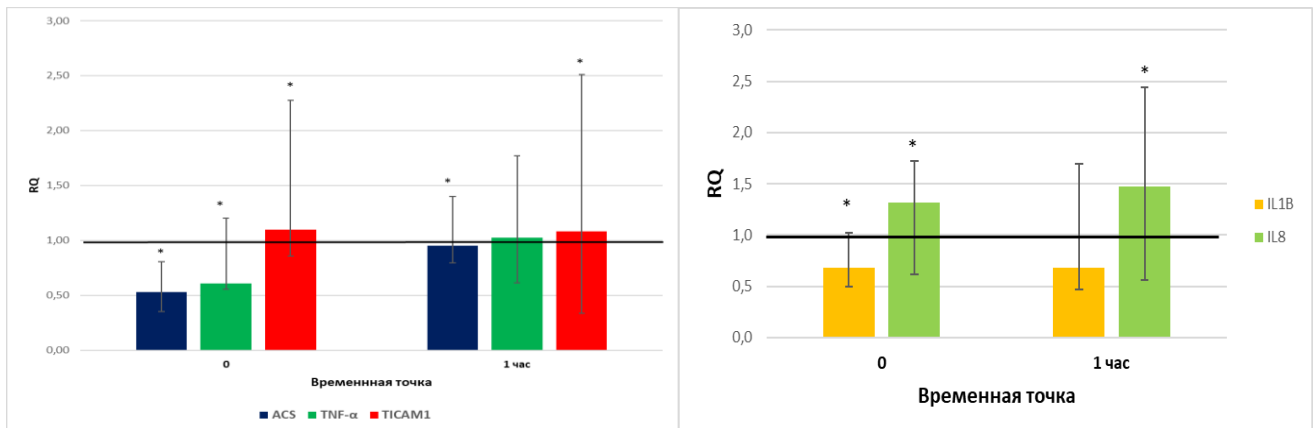
В

Рисунок 3. Показатели субпопуляционного состава лимфоцитов (А), содержания в периферической крови моноцитов, экспрессирующих на своей мембране TLRs, уровень экспрессии TLRs (Б), а также относительное содержание и плотность рецепторов в 24-часовых культурах моноцитов периферической крови испыателей-добровольцев до и после вращения на ЦКР (В).

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



А



Б

Рисунок 4. Динамика экспрессии генов TLRs (А) и цитокинов (Б) моноцитов периферической крови испытуемых-добровольцев, ассоциированных с сигнальным каскадом TLRs до и после вращения на ЦКР. Данные представлены в виде Me (q25-q75)
*-достоверное различие с фоном ($p < 0,05$)

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

Иммунный статус после 16-часовой экспозиции в гипомагнитных условиях (эксперимент «АРФА»)

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 et al., 2010, Гурфинкель 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 испыталелей-добровольцев оценить, может ли пребывание в ГМУ (снижение до 500 раз) в течение нескольких часов оказать воздействие на систему иммунитета.

Исследование влияния факторов пребывания в экспериментальных условиях на фенотип клеточных факторов системы сигнальных образспознающих рецепторов 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 изменялось (таблицы 5, 6). Однако при этом присутствовали выраженные индивидуальные флуктуации, как в сторону увеличения, так и в сторону снижения относительного содержания моноцитов и гранулоцитов, экспрессирующих TLR1, TLR4 и TLR6.

При изучении количественных характеристик NK-лимфоцитов с фенотипом CD3⁺CD16⁺CD56⁺, В- и Т-лимфоцитов, а также двух основных субпопуляций Т-лимфоцитов – цитотоксических (CD3⁺CD8⁺- клеток и хелперных (CD3⁺CD4⁺-клеток), как в серии “плацебо”, так и в серии в условиях ГМУ, не было выявлено статистически достоверных изменений (таблица 7).

Таблица 5. Содержание CD14⁺ моноцитов, экспрессирующих TLRs, и средняя интенсивность экспрессии (СИФ) TLRs на CD14⁺ моноцитах в периферической крови испыталелей-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
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 6 Содержание гранулоцитов, экспрессирующих TLRs, и средняя интенсивность экспрессии (СИФ) TLRs на гранулоцитах в периферической крови испыталелей-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
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

Таблица 7. Лимфоцитарный профиль периферической крови испытуемых-добровольцев, участников эксперимента “Арфа 20” (Me; 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

Изменение в экспрессии генов проводящих путей, ассоциированных с сигналингом TLRs моноцитов периферической крови как в серии с плацебо, так и с ГМУ также не имело практически никаких достоверных различий с фоновыми значениями (Рисунок 5А, Б)

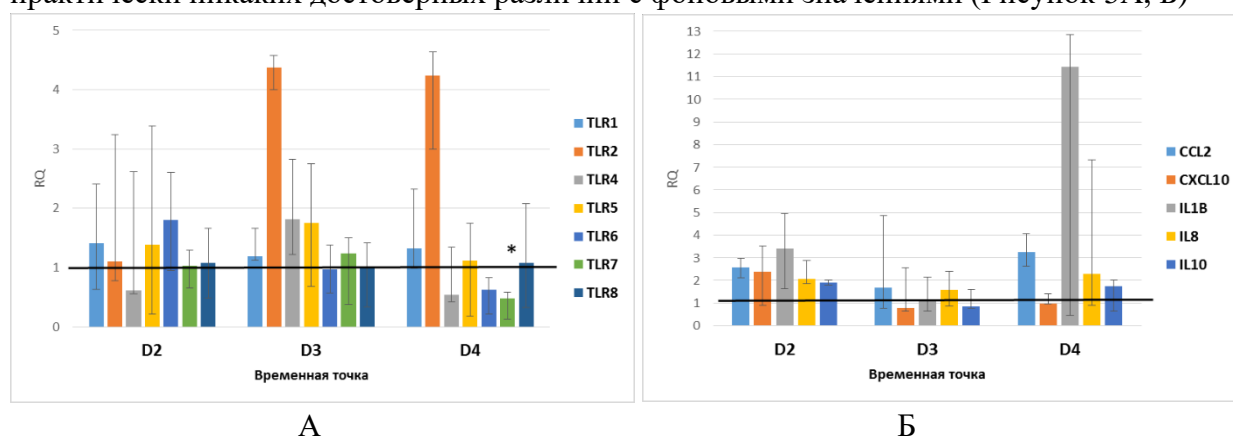


Рисунок 5. А- Экспрессия генов TLR моноцитов периферической крови испытуемых-добровольцев, участников эксперимента “Арфа 20” D2-значения после серии плацебо, D3-фоновые значения перед серией с ГМУ, D4-значение после экспозиции в ГМУ. Б- Экспрессия генов интерлейкинов и хемокинов моноцитов периферической крови испытуемых-добровольцев, участников эксперимента “Арфа 20” D2-значения после серии плацебо, D3-фоновые значения перед серией с ГМУ, D4-значения после экспозиции в ГМУ. Данные представлены в виде Me (q25-q75)

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

Таким образом, проведенные эксперименты показали, что кратковременное воздействие моделируемого фактора гипомангнитной среды (снижение магнитного поля около 500 раз) не приводит к кардинальной перенастройке иммунного гомеостаза.

Особенности функционирования иммунитета человека при кратковременном воздействии низких температур

Сверхнизкие температуры оказывают существенное влияние на различные физиологические системы организма человека, включая и систему иммунитета (Lubkowska et

al., 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 холодное воздействие приводит к нарушению в работе иммунитета человека (Brazaitis et al., 2014, Lubkowska et al., 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 холодного 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 6 и 7, наблюдаемые изменения охватывают относительное и абсолютное содержание различных типов иммунокомпетентных клеток.

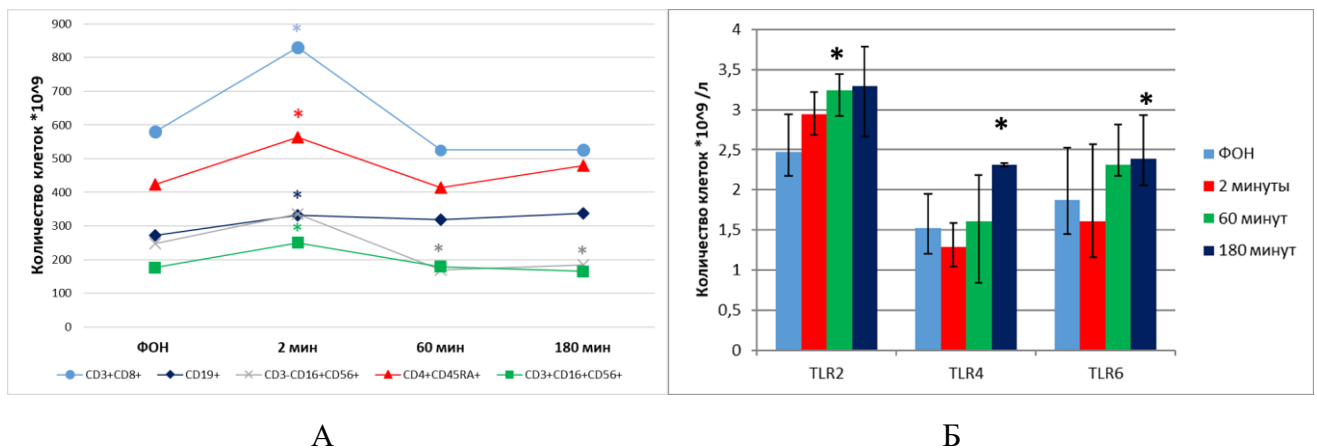


Рисунок 6. Динамика изменений абсолютного содержания лимфоцитов (А) и гранулоцитов (Б), экспрессирующих TLR в периферической крови испытуемых-добровольцев, принимавших участие в эксперименте с трёхминутной экспозицией в воздушной криосауне при -70°C . Данные представлены в виде Me(A) и Me (q25-q75) (Б)
*-достоверное различие с фоном ($p < 0,05$)

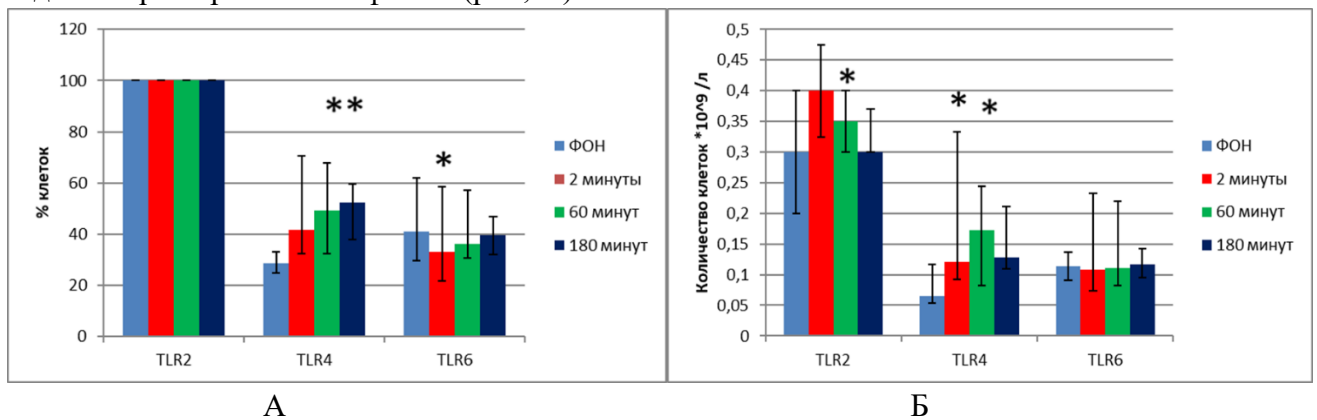


Рисунок 7. Динамика изменений относительного (А) и абсолютного (Б) содержания моноцитов, экспрессирующих на своей мембране TLR2, TLR4 и TLR6 в периферической крови испытуемых-добровольцев, принимавших участие в эксперименте с трёхминутной экспозицией в воздушной криосауне при -70°C . Данные представлены в виде Me (q25-q75)
*-достоверное различие с фоном ($p < 0,05$)

Так, трёхминутное пребывание при температуре -70°C , в подавляющем большинстве случаев, приводит к увеличению содержания в периферической крови различных субпопуляций лимфоцитов и моноцитов 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 холодовое 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 холодовом воздействии достигается за счёт непрерывного взаимодействия со всеми возможными эндогенными и экзогенными факторами, что находит своё отражение в постоянном изменении иммунологических параметров.

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 изоляционных экспериментов 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.

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

В проведённом эксперименте происходило комплексное рассмотрение клеточных показателей системы иммунитета человека при действии в течение 17 суток изоляционных факторов, моделируемых в семнадцатисуточном пребывании в гермообъекте с искусственной средой обитания. Помимо перечисленных ранее традиционных факторов, ассоциированных с

изоляции, в данном эксперименте была проведена депривация сна с четырнадцатых на пятнадцатые сутки эксперимента.

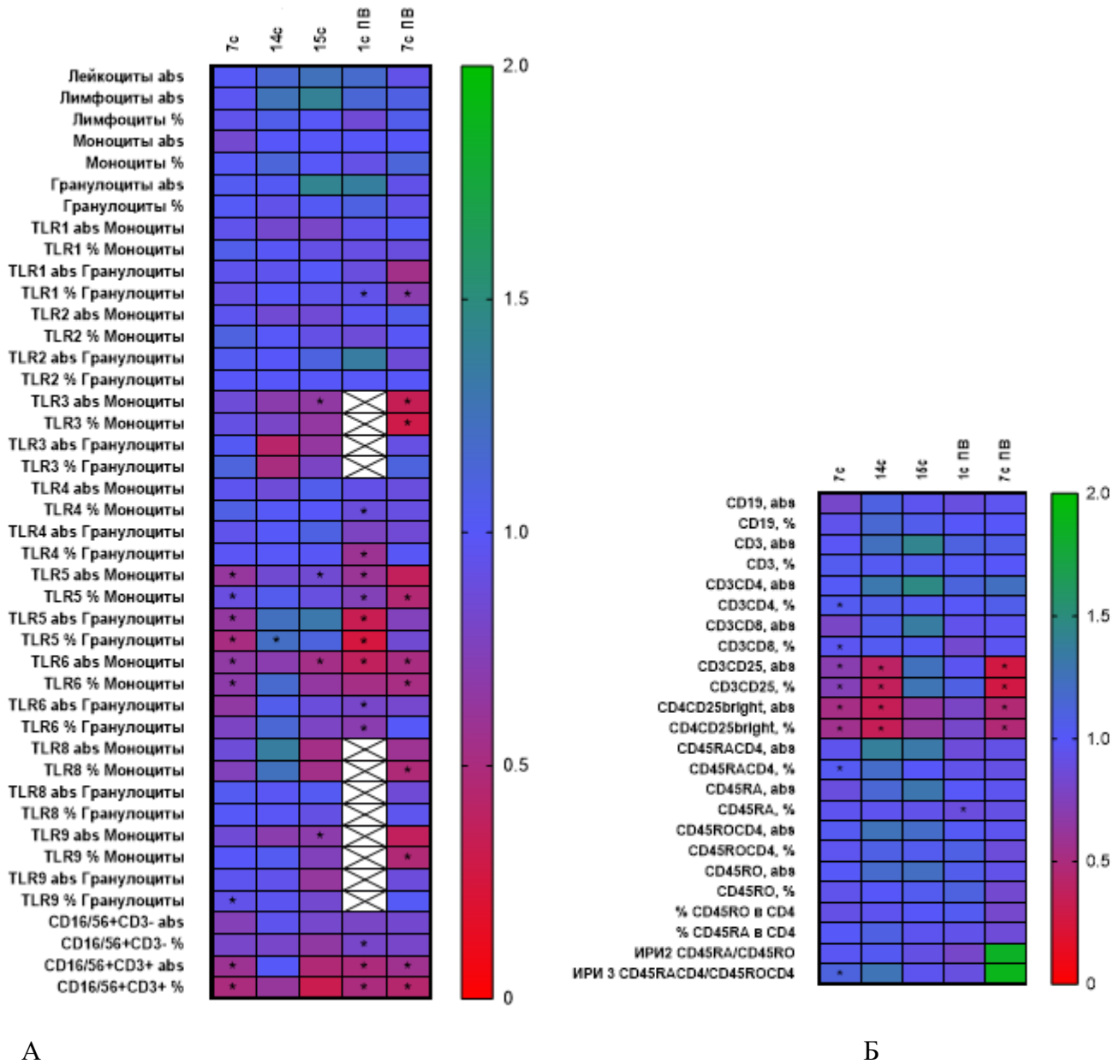


Рисунок 8. Состояние врождённого (А) и адаптивного (Б) иммунитета испыателей-добровольцев в 17-суточной изоляции в гермообъекте с искусственной средой обитания.

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

Проведенные в рамках 17-суточной изоляции исследования иммунной системы позволили установить, что процесс перестройки системы иммунитета к комплексу моделируемых факторов кратковременного космического полёта реализуется через изменения системы Toll-like рецепторов врождённого иммунитета и естественной цитотоксичности, а также снижение содержания в периферической крови активированных Т-лимфоцитов с фенотипом $CD3^+CD25^+$, $CD4^+CD25^+$. Как и в предыдущем исследовании, иммунная система одного и того же испыателя в разные моменты времени по-разному отвечала на оказываемое воздействие. Кроме того, как видно из рисунка 8 (А, Б), даже внутри одного семейства рецепторов, в одни и те же сутки изоляции может наблюдаться разная динамика.

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 иммунную систему человека. 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 количества 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 (рисунок 9А). К сожалению, на данном этапе не представляется возможным дать ответ на вопрос, с чем связаны данные изменения, вероятно, рассматривая данный процесс в рамках векторно-стохастической модели (см. заключение) можно сделать вывод о том, что имел место какой-то процесс, связанный с экзогенной или эндогенной стимуляцией заданных рецепторов.

В ходе эксперимента было показано снижение содержания CD4⁺-Т-клеток с Treg-ассоциированными фенотипами в системе *in vitro* на фоне общего увеличения содержания Т и В-лимфоцитов. Важной особенностью можно считать увеличение базальной продукции цитокинов Т-лимфоцитами периферической крови с одновременным снижением продукции цитокинов в ответ на стимуляцию TCR-CD3 комплекса (рисунок 9Б, рисунок 10Б).

Индукцированный синтез цитокинов моноцитами периферической крови снижался на первые сутки эксперимента для подавляющего большинства цитокинов с последующим увеличением к 7 суткам изоляции с сохранением динамики вплоть до 7 суток после завершения воздействия (рисунок 10А).

Содержание цитокинов в сыворотке крови практически не изменялось на протяжении всего экспериментального периода. Достоверным было только повышение уровня IL-8 на 14 сутки изоляционного воздействия (рисунок 10В). Следует отметить, что содержание цитокинов в сыворотке периферической крови является не только следствием функциональной активности иммунной системы, но и ряда других физиологических систем, включая опорно-двигательную, нервную систему и эндотелиальные клетки (Kenneth et al., 2017). Таким образом, оценивая содержание уровня цитокинов в сыворотке крови, нельзя говорить только о функциональном состоянии системы иммунитета. Это некий интегральный показатель, характеризующий состояние сразу нескольких физиологических систем, изменения в котором позволяют предположить нарушение в любом из перечисленном выше компонентов. При этом важно понимать, что система иммунитета является важной регуляторной системой, способной воздействовать на другие физиологические системы организма человека и меняться под действием других систем. Ярким примером может служить вовлечённость иммунной системы в регуляцию процессов остеорезорбции и остеогенеза через систему цитокинов OPG-RANKL (Новиков и др., 2017). Выявленные изменения говорят о процессе перестройки адаптивного и врождённого иммунитета в условиях 14-суточной изоляции в гермообъекте.

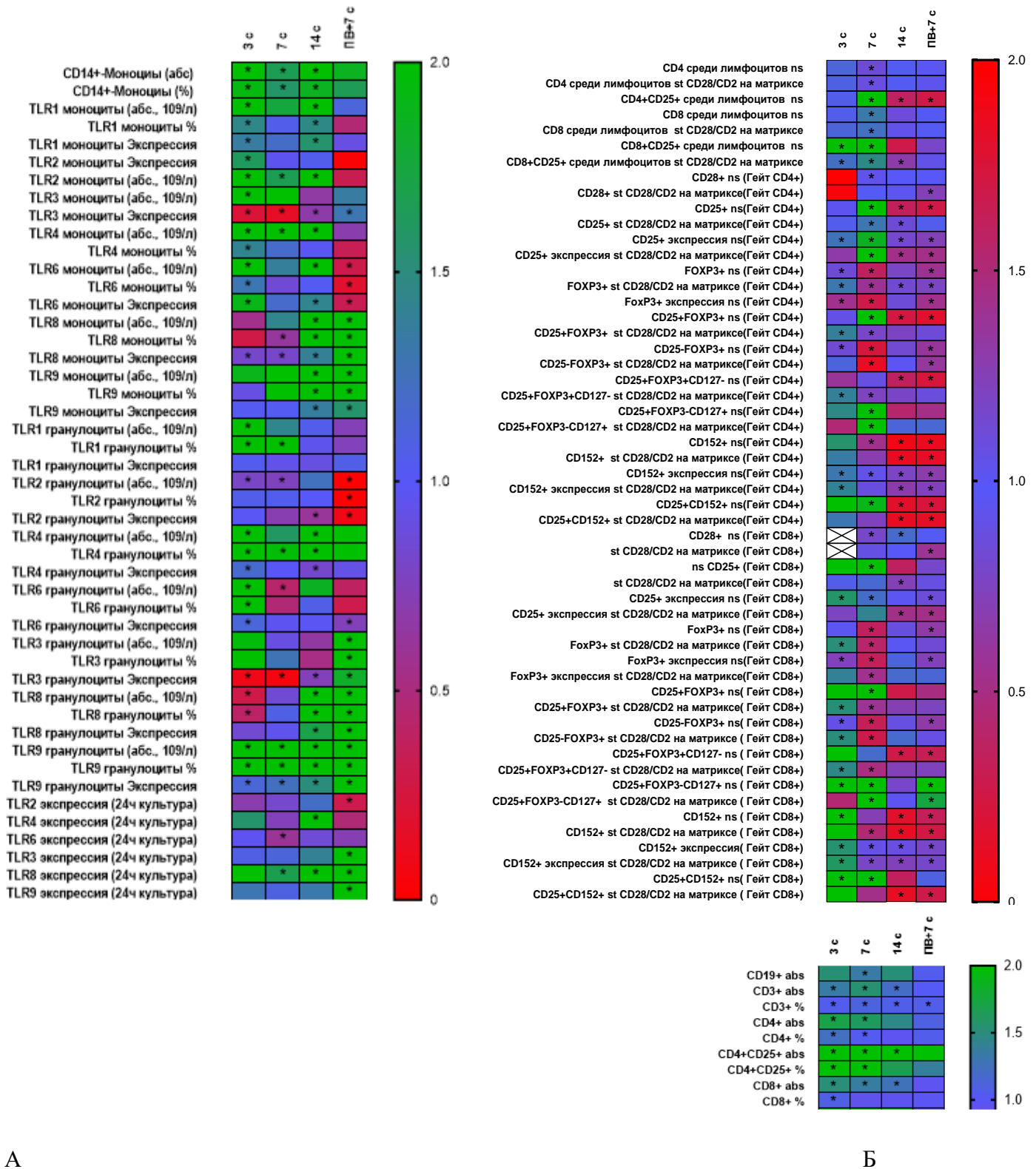


Рисунок 9. Изменение показателей клеточного компонента врождённого (А) и адаптивного (Б) иммунитета испытаелей-добровольцев в 14-суточной изоляции в гермообъекте с искусственной средой обитания.

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

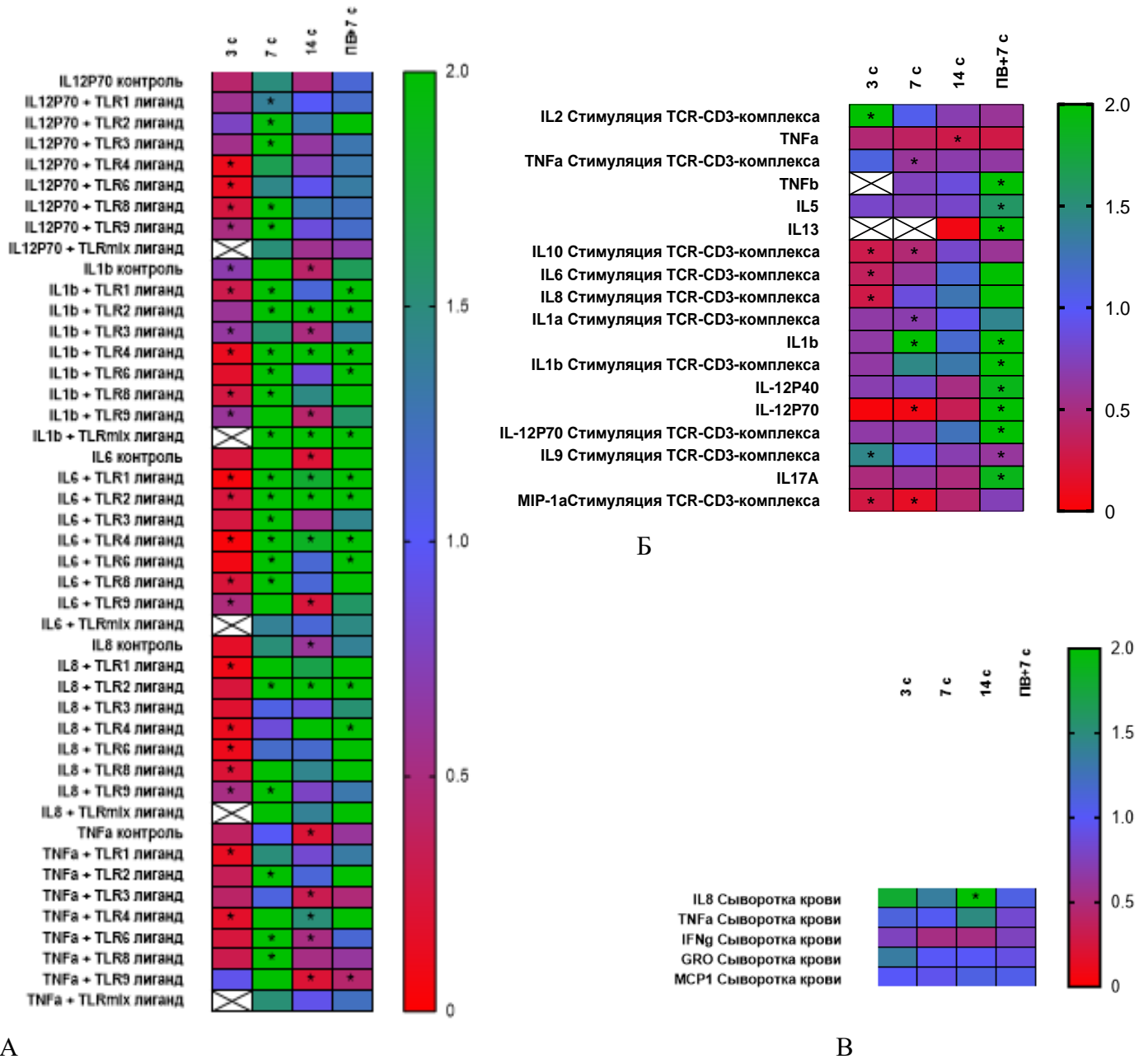


Рисунок 10. Цитокин продуцирующая способность клеток врождённого (А) и адаптивного (Б) иммунитета, а также содержание цитокинов в сыворотке периферической крови (В) испыталей-добровольцев в 14-суточной изоляции в гермообъекте с искусственной средой обитания.

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

Данные перестройки затрагивают и внутриклеточный сигналинг TLRs моноцитов периферической крови. Из изученных генов, ассоциированных с процессом передачи сигнала TLRs, на все сутки воздействия показаны достоверные изменения в экспрессии 11 генов (рисунок 11).

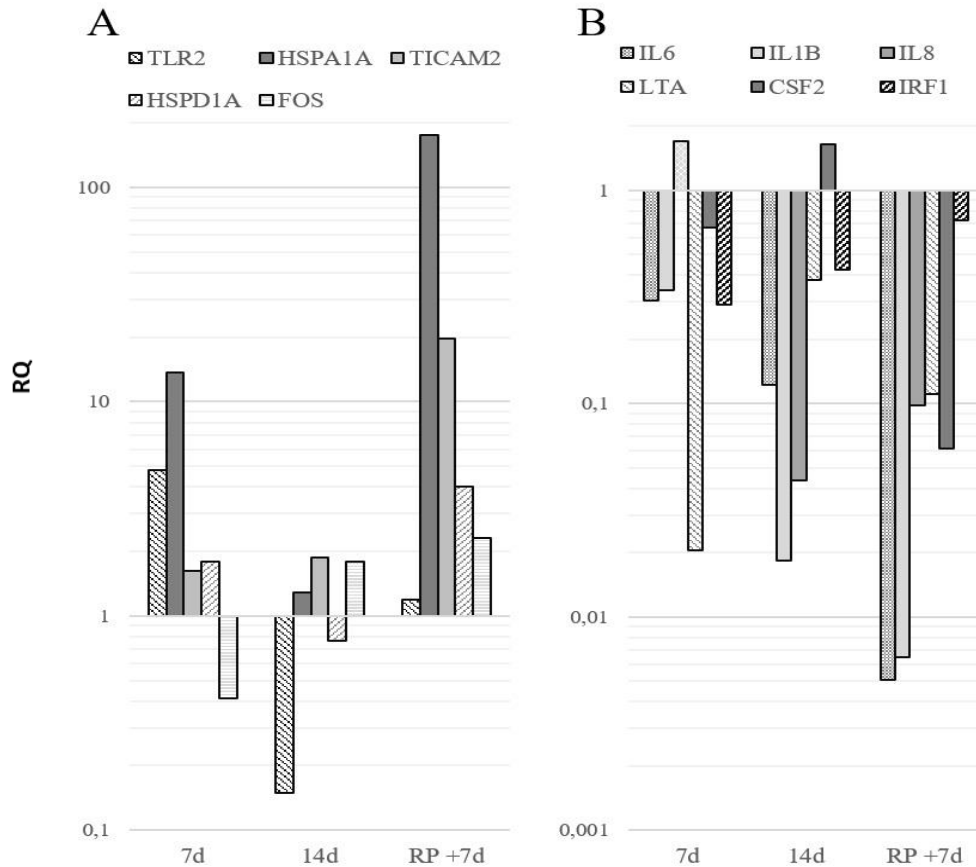


Рисунок 11. Изменение экспрессии генов проводящих путей TLRs моноцитов периферической крови в 14-суточной изоляции в гермообъекте с искусственной средой обитания.

Обобщая полученные в ходе реализации эксперимента результаты можно сказать о том, что описанные выше изменения отражают сложный процесс, происходящий в иммунной системе человека в ранний период адаптации к условиям нахождения в герметично замкнутом пространстве с искусственной средой обитания. В разные периоды времени иммунная система одного и того же испытуемого - добровольца отвечает на изоляционный фактор по-разному. Вероятно, это зависит напрямую от состояния иммунитета, а точнее баланса между всеми компонентами иммунной системы с другими физиологическими системами, а также эндогенной и экзогенной микрофлорой в конкретный временной интервал.

Эксперимент со 120-суточной изоляцией в гермообъекте (проект "SIRIUS")

С целью исследования влияния длительной изоляции на иммунную систему человека был проведён четырёхмесячный изоляционный эксперимент. В ходе эксперимента, также, как и в краткосрочных изоляционных экспериментах оценивалось состояние клеточного звена адаптивного и врождённого иммунитета. Исследование влияния факторов длительной изоляции на систему сигнальных образраспознающих рецепторов семейства Toll-like клеток врождённого иммунитета здоровых испытуемых-добровольцев показало, что у всех обследованных, независимо от их гендерной принадлежности, наблюдались изменения

содержания в периферической крови моноцитов и гранулоцитов, экспрессирующих поверхностные и внутриклеточные TLRs, преимущественно связанные с увеличением их абсолютного и относительного значения (рисунок 12).

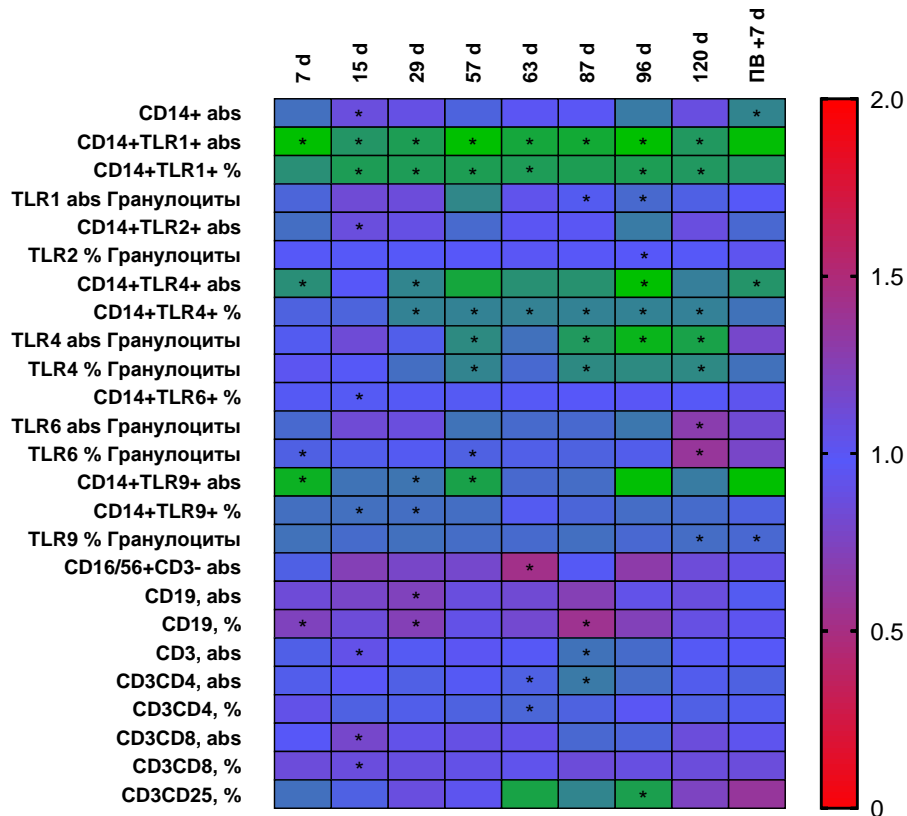


Рисунок 12. Клеточные показатели врождённого и адаптивного иммунитета испытуемых-добровольцев в 120-суточной изоляции в гермообъекте с искусственной средой обитания.

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

Содержание Т и В-лимфоцитов, а также НКТ-клеток-наоборот, имело тенденцию к снижению на протяжении всей изоляции (рисунок 12). Индуцированный синтез цитокинов Т-клетками периферической крови также менялся в течение эксперимента (таблица 8).

Таблица 8. Индуцированная анти-CD3/CD28 антителами продукция цитокинов CD3⁺-лимфоцитами периферической крови испытуемых-добровольцев в эксперименте с 120-суточной изоляцией в замкнутом гермообъекте с искусственной средой обитания (Ме; q75-q25)

Цитокины	Сутки пребывания в гермообъекте				
	-7-е	7-е	63-е	120-е	+7-е
IL-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
TNF 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
TNF 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
IL-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
IL-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
IL-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
IL-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

Интересно, что концентрация противовоспалительных цитокинов на протяжении эксперимента достоверно снижалась на 7-е сутки для IL-4 и IL-10 и на 120-е для IL-10, в то время как провоспалительных цитокинов-наоборот, увеличивалась по сравнению с фоновыми значениями.

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.

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

Одной из основных моделей, воспроизводящих эффекты реального КП, является СИ. С целью установления влияния гиподинамии, условий безопорности, 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. Как видно из рисунка 13, пребывание в условиях СИ сопровождается многочисленными перестройками в системе иммунитета человека.

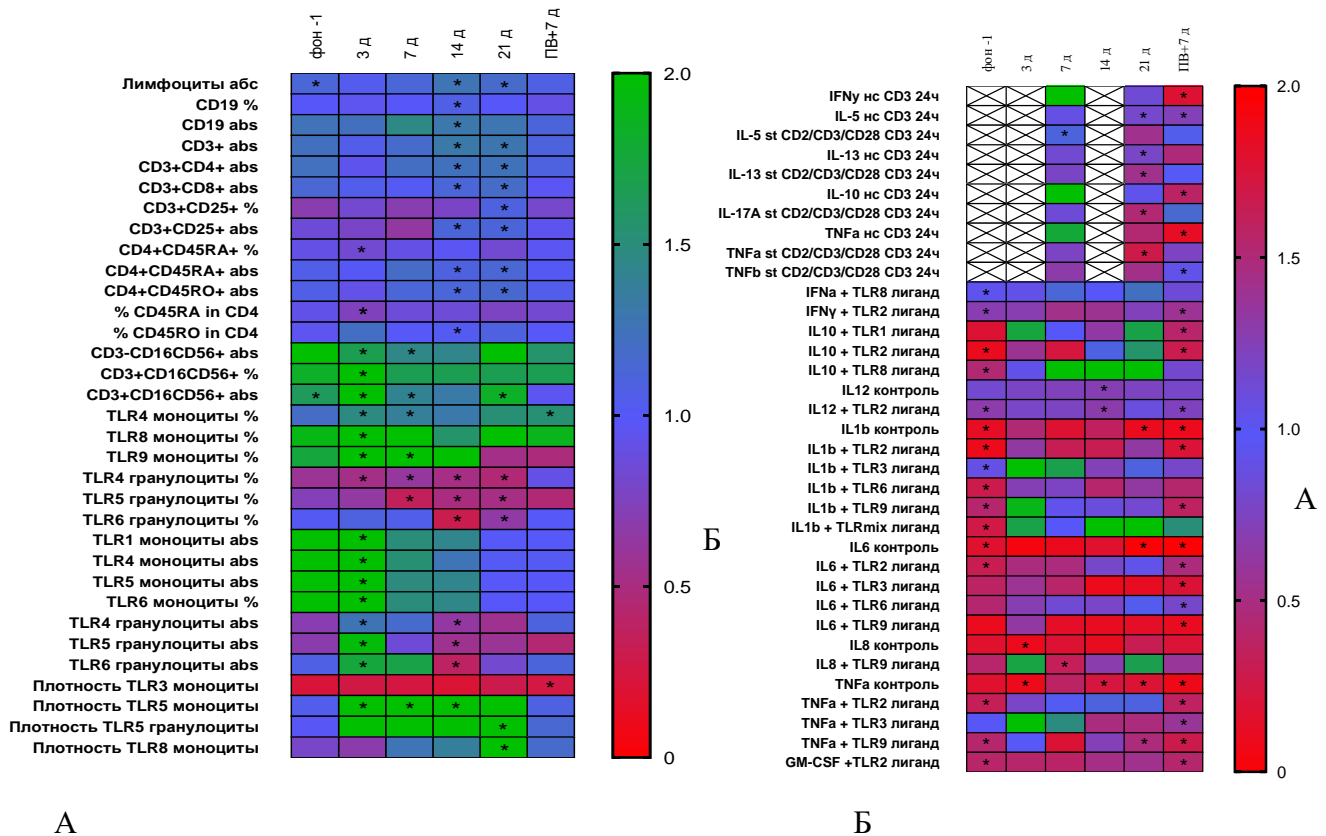


Рисунок 13. Состояние клеточного звена (А) и функциональная активность Т-лимфоцитов и моноцитов (Б) периферической крови испытуемых-добровольцев в условиях 21-суточной СИ. *-достоверное различие с фоном ($p < 0,05$)

Было показано, что пребывание в СИ сопровождается увеличением содержания в периферической крови Т и В-лимфоцитов, естественных киллеров, моноцитов, экспрессирующих TLR4, TLR8, TLR9. Содержание гранулоцитов, экспрессирующих TLRs с внутриклеточной и поверхностной локализацией, в целом, наоборот, значительно снижалась на протяжении эксперимента за исключением TLR6⁺-гранулоцитов, количество которых сначала

повышалось, а затем достоверно снижалось. Экспрессия TLRs на моноцитах и гранулоцитах носила разнонаправленный характер (рисунок 13А). Говоря о функциональной активности лимфоцитов и моноцитов периферической крови, можно сделать вывод о том, что, в целом, она снижается на протяжении эксперимента (рисунок 13Б).

Пребывание в условиях 21-суточной СИ сопровождается также многочисленными перестройками в генах сигнальных путей TLRs (рисунок 14 А, Б, В, Г)

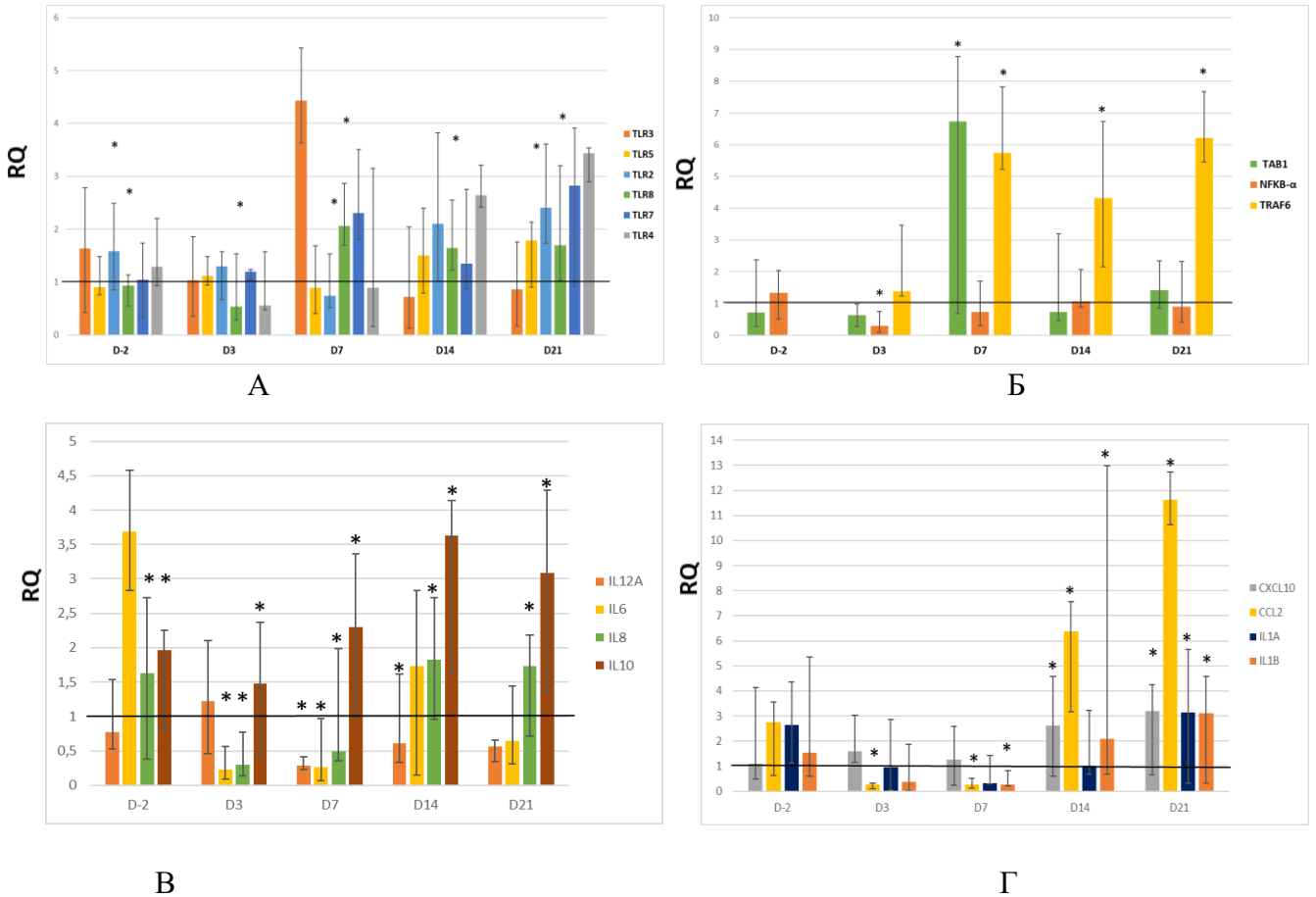


Рисунок 14. Экспрессия генов сигнального каскада TLRs во время 21-суточной СИ. А-экспрессия транскриптов TLRs, Б-регуляторных протеинов и ядерных факторов, В и Г-цитоклинов.

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

Таким образом, 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 варибельности результатов. Кроме того, у одного и того же испытуемого 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.

Реакция системы иммунитета на длительные космические экспедиции на МКС

В настоящее время существует значительное 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 et al., 2021, Kuzichkin et al., 2022). 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 космонавтов 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 TLRs. В ходе выполнения работ было показано, что условия КП оказывают влияние экспрессии генов молекул, вовлеченных в TLR-опосредованную передачу сигнала образраспознающих рецепторов (таблица 9).

Таблица 9. 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 ($p < 0,05$).

Изменения в других группах генов не были статистически значимыми. 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 (таблица 10). Экспрессия рецепторов TLRs 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 10), а также TLR2 и TLR5 гранулоцитов (таблица 11). При этом экспрессия TLR8 гранулоцитами на 1 сутки после завершения КП значимо снижалась (таблица 11).

Таблица 10. Экспрессия TLR с внутриклеточной и поверхностной локализацией моноцитами периферической крови космонавтов до и после длительных КП на МКС, Me (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)

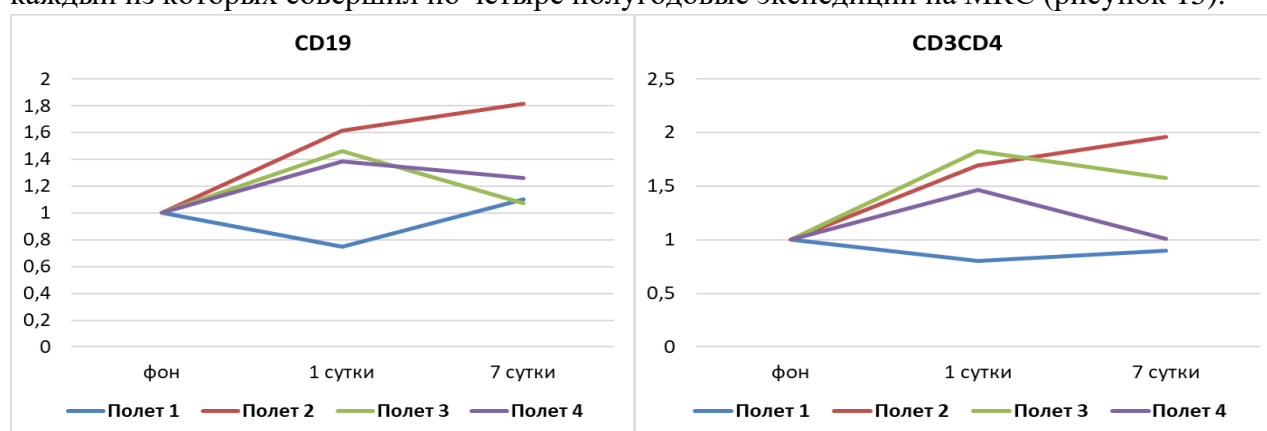
*-достоверное различие с фоном ($p<0,05$).

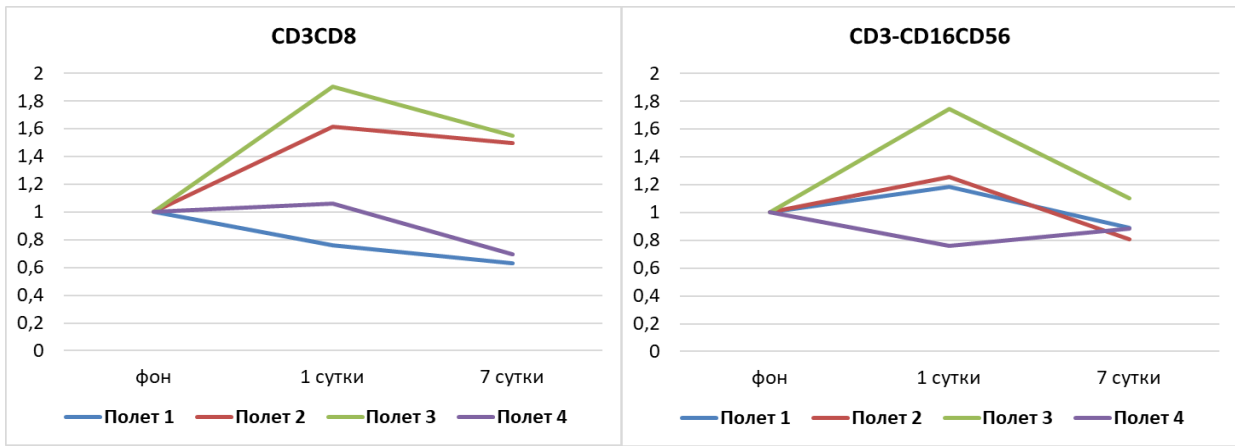
Таблица 11. Экспрессия TLR с внутриклеточной и поверхностной локализацией гранулоцитами периферической крови космонавтов до и после длительных КП на МКС, Me (Q25, Q75), n=28.

	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)
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)

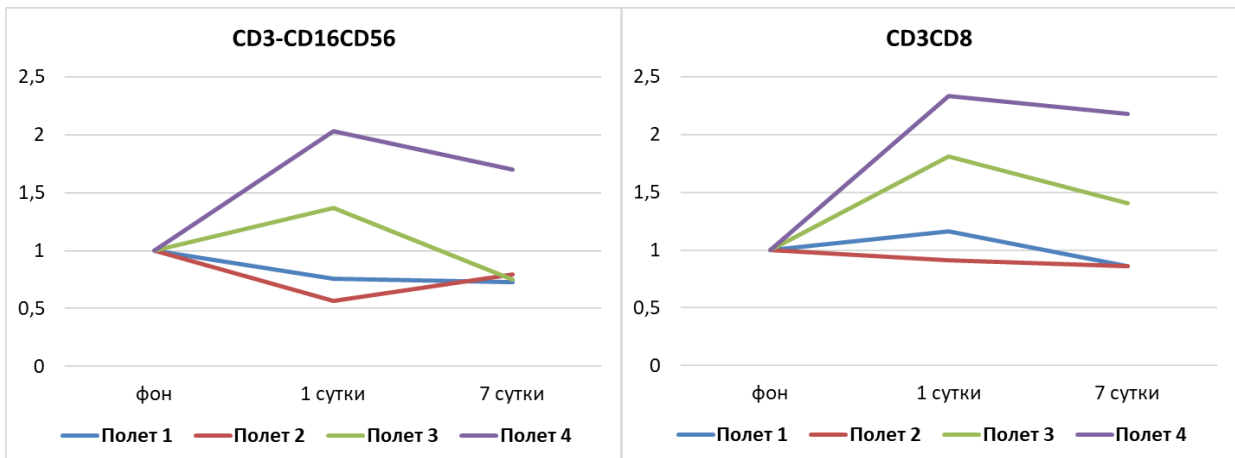
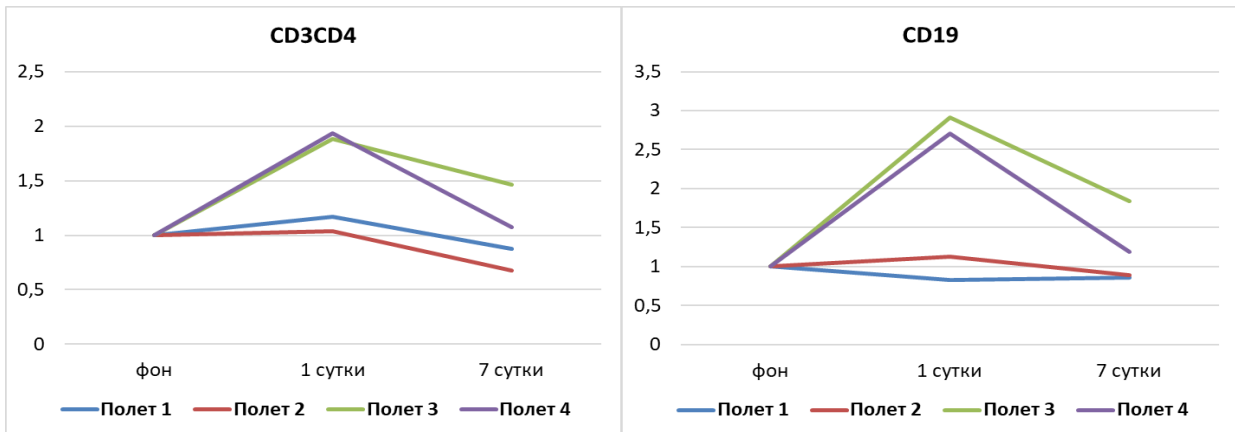
*-достоверное различие с фоном ($p<0,05$).

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 15).





Космонавт 1.



Космонавт 2

Рисунок 15. 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 16А) и гранулоцитами (рисунок 16 Б) TLRs с внутриклеточной и поверхностной локализацией после завершения двух КП на МКС.

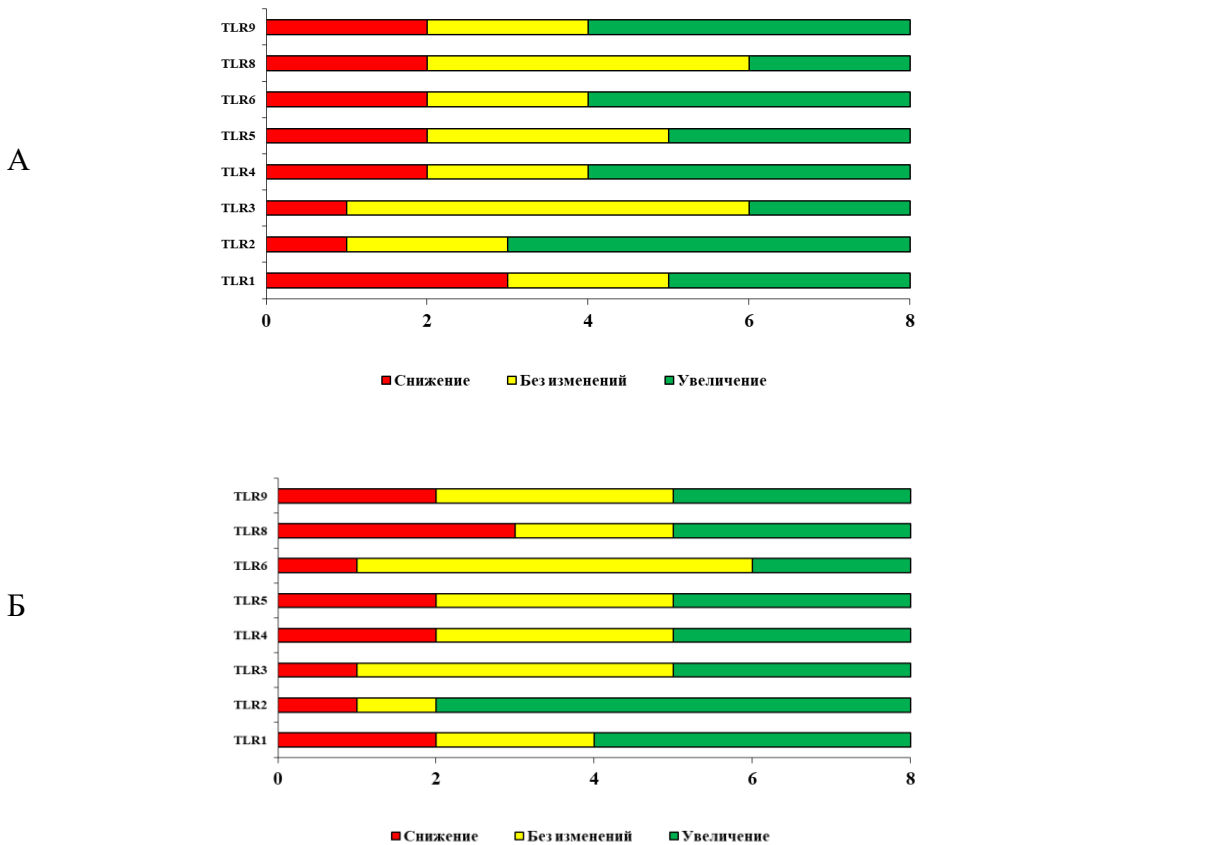


Рисунок 16. Динамика изменения экспрессии TLRs моноцитами (А) и гранулоцитами (Б) периферической крови космонавтов после двух КП на МКС.

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, в то время как адаптивный, в случае первичного контакта с антигеном, включается в работу уже после запуска каскада реакций системы естественной резистентности.

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 (рисунок 17).

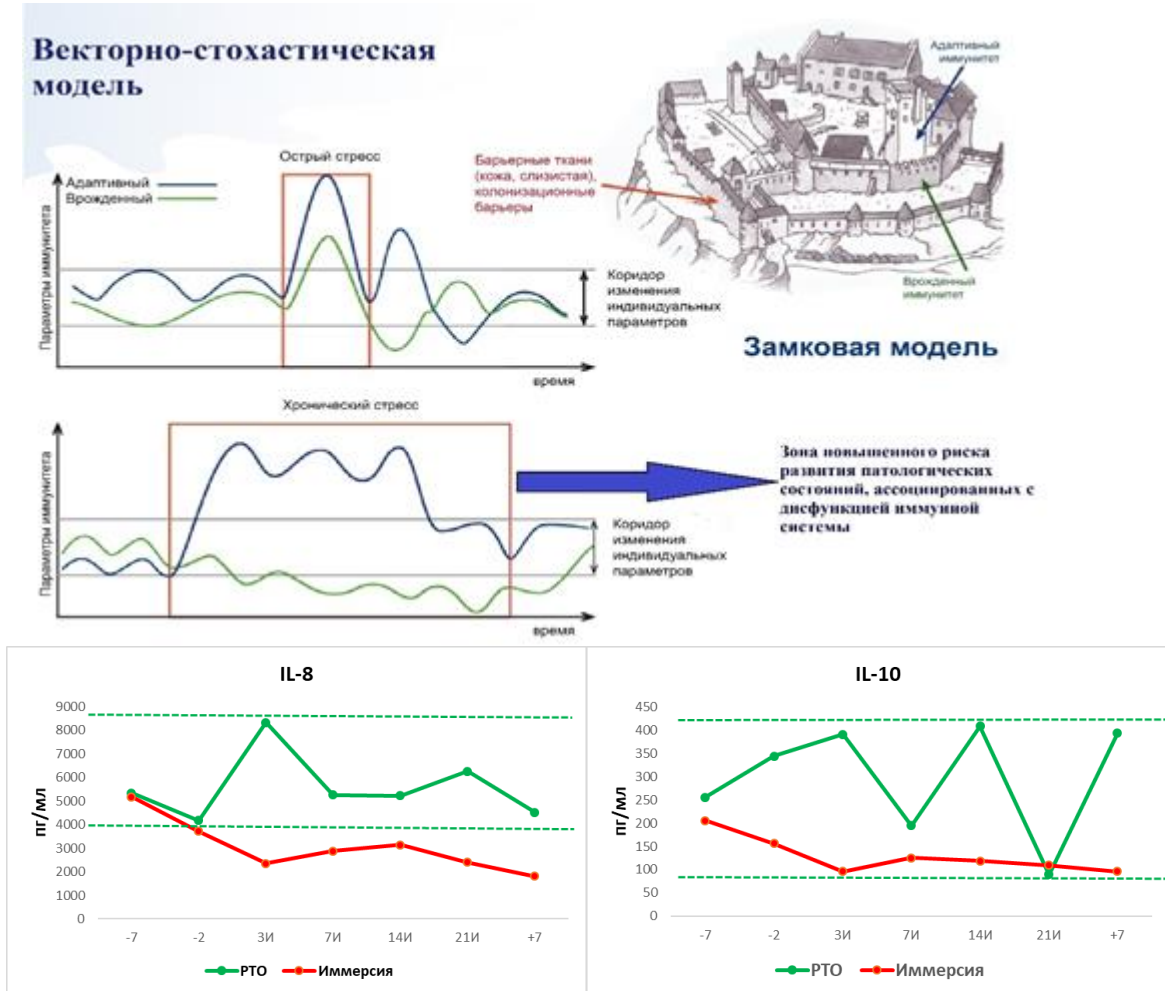


Рисунок 17. Принципиальная схема работы иммунной системы и данные о спонтанном синтезе цитокинов в 24-часовых культурах моноцитов периферической крови в 21-суточной СИ и повседневном режиме труда и отдыха (РТО), индивидуальные данные.

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 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 17). 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 реализуются 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 et al., 2019, Ludka et al., 2021), а также гипербарические воздействия (Matsuo 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 et al., 2017), из-за изменения ферментативной активности во время инициации каскада реакций проведения сигнала внутри клетки (Dhar et al., 2021), и даже мембраны клеточного ядра (Selezneva et al., 2022). В случае гипербарических воздействий действие физического фактора может быть связано с повреждениями мембраны (Shinomiya et al., 1994), а также с изменениями в экспрессии генов, опосредованными активными формами кислорода и азота (Kendall 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 векторно-стохастической 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 корригирующих мероприятий и средств, направленных на поддержание иммунного гомеостаза.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых научных журналах

- 1) Моруков Б.В., Рыкова М.П., Антропова Е.Н., Берендеева Т.А., Моруков И.Б., Пономарев С.А. Иммунологические аспекты пилотируемого марсианского полета // Физиология человека. 2013. Т. 39. № 2. С. 19.
- 2) Yi B., Feuerecker M., Hörl M., Matzel S., Choukèr A., Rykova M., Ponomarev S., Vassilieva G., Nichiporuk I., Jäger G. Influences of large sets of environmental exposures on immune responses in healthy adult men //Scientific Reports. 2015. Т. 5. С. 13367.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) 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. Т. 51. № 2. С. 13-19.
- 7) Ничипорук И.А., Рыкова М.П., Антропова Е.Н., Пономарев С.А., Журавлева Т.В., Чистоходова С.А. Взаимосвязь уровня тревожности с динамикой иммунного статуса у российских космонавтов - участников космического эксперимента "ИММУНО" // Авиакосмическая и экологическая медицина 2017. Т. 51. № 6. С. 24-31.
- 8) Фомина Е.В., Уськов К.В., Рыкова М.П., Антропова Е.Н., Пономарев С.А., Калинин С.А., Берендеева Т.А., Смолеевский А.Е. Адаптивный иммунитет как показатель оптимальной физической нагрузки в условиях 520-суточной изоляции //Физиология человека. 2017. Т. 43. № 3. С. 74-86.
- 9) Crucian B.E., Smith S.M., Mark Ott C., Pierson D.L., Sams C., Choukèr A., Buchheim J.I., Simpson R.J., Mehta S., Makedonas G., Marshall G., Zwart S.R., Heer M., Baecker N., Ponomarev S., Whitmire A., Krieger S.S., Frippiat J.P., Douglas G., Lorenzi H, Ginsburg G.S Immune system dysregulation during spaceflight: potential countermeasures for deep space exploration missions // Frontiers in Immunology. 2018. Т. 9. № JUN. С. 1437.
- 10) Buchheim J.-I., Matzel S., Hörl M., Moser D., Biere K., Feuerecker M., Schelling G., Kaufmann I., Choukèr A., Rykova M., Vassilieva G., Ponomarev S., Nichiporuk I., Thieme D., Thiel M. Stress related shift toward inflammaging in cosmonauts after long-duration space flight // Frontiers in Physiology. 2019. Т. 10. № FEB. С. 85.
- 11) Кутько О.В., Рыкова М.П., Антропова Е.Н., Калинин С.А., Шульгина С.М., Садова А.А., Орлова К.Д., Киселёва Д.Д., Шмаров В.А., Васильева Г.Ю., Пономарёв С.А. Влияние 21-суточной "сухой" иммерсии на продукцию Т-лимфоцитами цитокинов, вовлеченных в регуляцию метаболизма костной ткани // Авиакосмическая и экологическая медицина. 2019. Т. 53. № 6. С. 42-46.
- 12) Makedonas G., Mehta S., Choukèr A., Buchheim J.-I., Simpson R.J., Marshall G., Orange J.S., Aunon-Chancellor S., Smith S.M., Douglas G.L., Ott C.M., Pierson D., Sams C., Crucian B., Zwart S.R., Stowe R.P., Heer M., Baecker N., Ponomarev S., Whitmire A. Specific immunologic

countermeasure protocol for deep-space exploration missions // *Frontiers in Immunology*. 2019. Т. 10. № JAN. С. 2407.

13) Пономарев С.А., Шульгина С.М., Калинин С.А., Антропова Е.Н., Рыкова М.П., Орлова К.Д., Кутько О.В., Садова А.А. Состояние системы сигнальных образраспознающих рецепторов семейства toll-like-моноцитов и гранулоцитов человека во время 21-суточной "сухой" иммерсии без средств профилактики // *Авиакосмическая и экологическая медицина*. 2019. Т. 53. № 2. С. 36-42.

14) Afshinneko E., Scott R.T., MacKay M.J., Pariset E., Cekanaviciute E., Barker R., Gilroy S., Hassane D., Smith S.M., Zwart S.R., Nelman-Gonzalez M., Crucian B.E., Ponomarev S.A., Orlov O.I., Shiba D., Muratani M., Yamamoto M., Richards S.E., Vaishampayan P.A., Meydan C., Foux J., Myrrhe J., Istasse E., Singh N., Venkateswaran K., Keune J.A., Ray H.E., Basner M., Miller J., Vitaterna M.H., Taylor D.M., Wallace D., Rubins K., Bailey S.M., Grabham P., Costes S.V., Mason C.E., Beheshti A. Fundamental biological features of spaceflight: advancing the field to enable deep-space exploration // *Cell*. 2020. Т. 183. С. 1162.

15) Пастушкова Л.Х., Гончарова А.Г., Орлова К.Д., Каширина Д.Н., Захарова Н.Б., Кононихин А.С., Бржозовский А.Г., Пономарёв С.А., Ларина И.М. Изменения регуляции Toll-подобных рецепторов моноцитов периферической крови участников 17-суточной изоляции как отражение реакции врожденной иммунной системы // *Технологии живых систем*. 2020. Т. 17. № 1. С. 44-54.

16) Пономарёв С.А., Рыкова М.П., Антропова Е.Н., Кутько О.В., Калинин С.А., Шульгина С.М., Садова А.А., Орлова К.Д., Шмаров В.А., Киселёва Д.Д. Цитокиновый профиль испыателей-добровольцев в 21-суточной "сухой" иммерсии // *Физиология человека*. 2020. Т. 46. № 2. С. 76-83.

17) Ponomarev S., Kutko O., Rykova M., Kalinin S., Antropova E., Sadova A., Orlova K., Shulgina S. Changes in the cellular component of the human innate immunity system in short-term isolation // *Acta Astronautica*. 2020. Т. 166. С. 89-92.

18) Ильин В.К., Орлов О.И., Рыкова М.П., Комиссарова Д.В., Усанова Н.А., Антропова Е.Н., Кутько О.В., Калинин С.А., Пономарев С.А., Шеф К.А., Сахарова А.В. Состав микрофлоры и состояние системы сигнальных образраспознающих рецепторов семейства toll-подобных клеточных факторов врожденного иммунитета во время 120-суточной изоляции в гермообъекте с искусственной средой обитания // *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2021. Т. 98. № 1. С. 36-45.

19) 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.

20) Ponomarev S., Kalinin S., Sadova A., Rykova M., Orlova K., Crucian B. Immunological aspects of isolation and confinement // *Frontiers in Immunology*, 2021, 12, 697435

21) Buchheim J.-I., Matzel S., Choukér A., Ghislin S., Ouzren N., Frippiat J.-P., Albuissou E., Vanet A., Ponomarev S., Rykova M. Plasticity of the human IgM repertoire in response to long-term spaceflight // *FASEB Journal*, 2021, 34(12), стр. 16144–16162

22) Захарова Н.Б., Пастушкова Л.Х., Гончарова А.Г., Орлова К.Д., Каширина Д.Н., Гончаров И.Н., Бржозовский А.Г., Пономарев С.А., Морозова О.Л., Ларина И.М. Хромато-масс-спектрометрический анализ белков мочи, сопряженных с функциями toll-рецепторов у здорового человека в условиях 17-суточной изоляции // *Клиническая лабораторная диагностика*. 2020. Т. 65. № 8. С. 469-473.

- 23) Ponomarev S.A., Sadova A.A., Rykova M.P., Orlova K.D., Vlasova D.D., Shulgina S.M., Antropova E.N., Kutko O.V., Germanov N.S., Galina V.S., Shmarov V.A. The impact of short-term confinement on human innate immunity // Scientific reports, 2022 T. 12. № 1.
- 24) Лысенко Е.А., Шмаров В.А., Рыкова М.П., Антропова Е.Н., Кутько О.В., Шульгина С.М., Орлова К.Д., Жирова Э.А., Садова А.А., Власова Д.Д., Пономарев С.А. Влияние дыхательных гипоксических газовых смесей (кислородно-азотной и кислородно-азотно-аргоновой) в условиях барокамеры на показатели клеточного иммунитета человека // Иммунология. 2022. Т. 43. № 6. С. 643-653.
- 25) Пономарев С.А., Журавлева О.А., Рыкова М.П., Антропова Е.Н., Кутько О.В., Шмаров В.А., Маркин А.А. Взаимосвязи биохимических и иммунологических показателей у испытуемых-добровольцев в условиях 21-суточной "сухой" иммерсии // Физиология человека. 2022. Т. 48. № 6. С. 109-118.
- 26) Шмаров В.А., Рыкова М.П., Антропова Е.Н., Кутько О.В., Шульгина С.М., Орлова К.Д., Жирова Э.А., Садова А.А., Власова Д.Д., Лысенко Е.А., Кудлай Д.А., Пономарев С.А. Показатели клеточного иммунитета человека в условиях создания искусственной гравитации с помощью центрифуги короткого радиуса // Иммунология, 2022 Т.43 №2 стр. 149-156
- 27) Власова Д.Д., Садова А.А., Галина В.С., Германов Н.С., Рыкова М.П., Антропова Е.Н., Кутько О.В., Шульгина С.М., Орлова К.Д., Шмаров В.А., Лысенко Е.А., Пономарев С.А. Влияние 21-суточной "сухой" иммерсии на экспрессию генов врожденного иммунитета, ассоциированных с сигнальными путями Toll-подобных рецепторов // Авиакосмическая и экологическая медицина. 2022. Т. 56. № 2. С. 11-19.
- 28) D. S. Kuzichkin., I.A. Nichiporuk, O. A. Zhuravleva, A. A. Markin, M. P. Rykova, T. V. Zhuravleva, A. A. Sadova, O. V. Kutko, V. A. Shmarov, S.A. Ponomarev Endothelial dysfunction markers and immune response indices in cosmonauts' blood after long-duration space flights //npj Microgravity, 2022 T 8 № 46
- 29) S.A. Ponomarev., A. A. Sadova, M. P. Rykova, K. D. Orlova, D. D. Vlasova, S. M. Shulgina, E. N. Antropova, O. V. Kutko, E. A. Lysenko., V. A. Shmarov Cytokines Production in Test-Volunteers During 120-day Confinement in a Hermetically Sealed Chamber // Advances in Systems Science and Applications 2022 T. 22 No 4 с 224-232
- 30) Власова Д.Д., Садова А.А., Германов Н.С., Галина В.С., Шмаров В.А., Кутько О.В., Рыкова М.П., Антропова Е.Н., Колотева М.И., Лысенко Е.А., Орлова К.Д., Пономарев С.А. Влияние искусственной силы тяжести, моделируемой с помощью центрифуги короткого радиуса, на экспрессию генов врожденного иммунитета, ассоциированных с сигнальными путями toll-подобных рецепторов // Авиакосмическая и экологическая медицина. 2023. Т58 №2 С. 20-26

Работы, опубликованные в материалах конференций

- 1) Пономарёв С.А. Состояние системы врожденного иммунитета у космонавтов до и после длительных космических экспедиций на МКС // XI Конференции молодых ученых, специалистов и студентов, посвященная дню космонавтики Москва, 2012.
- 2) Ponomarev S., Berendeeva T, Rykova M, Antropova E, Morukov B. Changes in cosmonauts' innate immunity after the long-term space flights // 40th international assembly COSPAR, Moscow, 2014
- 3) Пономарёв С.А. Изменения в системе сигнальных-образраспознающих рецепторов моноцитов и гранулоцитов периферической крови человека под воздействием факторов длительного космического полета // XIV Конференция молодых ученых, специалистов и студентов, посвященная 65-летию со дня рождения врача-космонавта Б.В.Морукова, Москва, 2015

- 4) Ponomarev S.A., Berendeeva T.A. The influence of the long-term space flight factors on some components of the innate immunity system // 66th International Astronautical Congress (IAC-2015), Jerusalem, 2015
- 5) Ponomarev S.A., Muranova A.V., Kalinin S.A. The influence of the short-term isolation factors on some components of the human immune system // International symposium for gravitational physiology (ISGP), Toulouse, 2016.
- 6) Ponomarev S., Rykova M, Kalinin S., Muranova A., Kurko O., Antropova E. The influence of the long-term space flight factors on the human regulatory T-cells // 68th International Astronautical Congress (IAC-2017), Adelaide, Australia, 2017
- 7) Пономарёв С.А., Рыкова М.П., Антропова Е.Н., Кутько О.В., Каюнова С.М., Калинин С.А. Некоторые аспекты адаптации иммунной системы человеческого организма к факторам длительного космического полёта //XIV Королёвские чтения, Королёв-2017
- 8) Ponomarev S., Kalinin S., Kutko O., Antropova E., Sadova A., Kayunova S., Orova K., Rykova M Condition of signaling pattern-recognition receptors system from the toll-like family of the cells of the innate human immunity during 17 day isolation // XVII Конференция по космической биологии и авиакосмической медицине с международным участием, Москва-2018
- 9) Ponomarev S, Kalinin S., Kutko O., Antropova E., Sadova A., Shulgina S., Orova K., Rykova M. Influence of rotation in different modes on the short radius centrifuge on the human immunity // International congress “Human in Space (HIS-2019)”, Dubai, 2019.
- 10) Ponomarev S, Kalinin S., Kutko O., Antropova E., Sadova A., Shulgina S., Orova K., Rykova M. Condition of the human innate immunity system in the 21-day “dry” immersion// International congress “Human in Space (HIS-2019)”, Dubai, 2019.
- 11) Kutko O., Orlova K., Vlasova D., Kalinin S., Antropova E., Sadova A., Shulgina S., Rykova M., Ponomarev S First Results of Human innate Immunity Research during 21-day “dry” Immersion (DI) with an artificial Gravity used as a Countermeasure// International congress “Human in Space (HIS-2021)”, Moscow, 2021.
- 12) Ponomarev S.A. Influence of the 120-day confinement on cytokines production in healthy test-subjects // International working symposium in the field of space biology and medicine (IWS-2023), Galveston-2023

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

BTK - Bruton tyrosine kinase
 CCL2 - C-C motif ligand 2
 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
 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
 I κ B – 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
 MyD88 - myeloid differentiation primary response gene 88
 NFKBIA – NFKB inhibitor alpha
 NF- κ B – nuclear factor- κ B
 NK-natural killer cell
 NKT-natural killer t cell
 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- κ B subunit (v-rel avian reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A)
 RT-PCR- real time polymerase chain reaction
 TANK - TRAF family member-associated NF- κ B activator
 TBK1 - TANK binding kinase 1
 TIRAP/Mal – TIR domain-containing adaptor protein / MyD88-adapte-like

TLR – Toll-like receptor

TNFRSF1A – TNF receptor superfamily member 1A

TNF-tumor necrosis factor

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

ИСТ-искусственная сила тяжести

КП – космический полёт

ЛПС – липополисахарид

МКС – Международная космическая станция

НЭК-наземный экспериментальный комплекс

ПЦР-полимеразная цепная реакция

СИ – «сухая» иммерсия

ФГА – фитогемагглютинин

ЦКР-центрифуга короткого радиуса

ЭДТА- этилендиаминтетрауксусная кислота