

**БЫЧКОВА
НАТАЛИЯ ВЛАДИМИРОВНА**

**ПРОТОЧНАЯ ЦИТОМЕТРИЯ В ОЦЕНКЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ
АКТИВНОСТИ КЛЕТОК ИММУННОЙ СИСТЕМЫ В НОРМЕ
И ПРИ ИММУНОЗАВИСИМЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ
(КЛИНИКО-ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)**

3.3.8. Клиническая лабораторная диагностика

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России

Научный консультант:

доктор медицинских наук профессор

Калинина Наталия Михайловна

Официальные оппоненты:

Серебряная Наталья Борисовна – доктор медицинских наук, профессор, федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт экспериментальной медицины» Российской академии наук, отдел иммунологии, лаборатория общей иммунологии, заведующая.

Семенов Александр Владимирович – доктор биологических наук, федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Екатеринбургский научно-исследовательский институт вирусных инфекций, руководитель.

Малышев Михаил Евгеньевич – доктор биологических наук, Государственное бюджетное учреждение «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт скорой помощи имени И.И.Джанелидзе» Комитета по здравоохранению Правительства Санкт-Петербурга, городская лаборатория иммуногенетики и серодиагностики, заведующий.

Ведущая организация: федеральное государственное бюджетное военное образовательное учреждение высшего образования «Военно-медицинская академия имени С.М.Кирова» Министерства обороны Российской Федерации

Защита диссертации состоится «22» декабря 2022 г. в 11:30 часов на заседании диссертационного совета 04.1.001.01 на базе ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России по адресу: 194044, Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, д. 4/2.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России по адресу: 197345, Санкт-Петербург, ул. Оптиков, дом 54 и на сайте <https://www.nrcerm.ru>.

Автореферат разослан «___» _____ 2022 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета

кандидат медицинских наук доцент

Санников Максим Валерьевич

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Лабораторная оценка иммуносупрессии и/или гиперактивации иммунной системы с помощью количественных и функциональных тестов применяется в комплексной оценке состояния здоровья пациентов и назначения корректной терапии (Козлов В.А. и др., 2020), но проводится в минимальном объеме. Используемые в большинстве лабораторий ЛПУ иммунологические тесты не обеспечивают надлежащий уровень обследования пациентов с разнообразной патологией. Не вызывает сомнений ведущая роль иммунной системы в патогенезе большинства заболеваний – аутоиммунных, онкологических, аллергических, инфекционных (Хаитов Р.М., Гариб Ф.Ю., 2020, Козлов В.А. и др., 2022) ввиду того, что она является одной из трех регуляторных систем организма человека.

Согласно номенклатуре медицинских услуг, утвержденной Приказом Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации №804н от 13.10.2017г. в редакции от 05.03.2020г. №148н, исследования в области аллергологии и иммунологии по коду В003.002 относятся к сложным диагностическим услугам и включают оценку иммунного статуса при иммунодефицитах и выявление аллергенов для подтверждения аллергии. Тесты, отражающие функциональные особенности клеток, востребованы в экспериментальных исследованиях (Cossarizza A. et al, 2020), но в рутинной лабораторной практике большинства клинических подразделений практически не применяются. Отсутствие комплексного подхода к лабораторной оценке параметров клеточного и гуморального звеньев иммунитета для определения тактики лечения большинства заболеваний можно объяснить недостаточно разработанной на данный момент методологической базой для проведения иммунологического обследования, особенно это касается тестов, отражающих функциональный потенциал клеток. В связи с этим актуальность разработки и внедрения в практику эффективной лабораторной оценки состояния иммунной системы в норме и патологии не вызывает сомнений.

Лабораторная диагностика иммунозависимых заболеваний с использованием клинически и диагностически значимых тестов, несмотря на зачастую высокую стоимость обследования, будет экономически оправдана, потому что корректная диагностика обусловит верный диагноз, что приведет к сокращению расходов на лечение и пребывание пациента в стационаре (Jain K.K., 2002).

Одними из множества клеток врожденного иммунитета являются базофилы. Среди главных функций этих клеток выделяют участие в поддержании воспаления, преимущественно аллергической природы (Агоск М., 2002, 2022, He X. et al., 2021). Т- и В-лимфоциты обеспечивают эффективность приобретенного иммунитета. Исследование субпопуляционного состава лимфоцитов с оценкой основных и малых популяций является базовым для анализа иммунного статуса (Хайдуков С.В. и др. 2015), но предоставляет информацию только о количестве клеток в каждой из субпопуляций лимфоцитов. В отличие от количественных, функциональные тесты, в том числе с использованием метода проточной цитометрии, позволяют охарактеризовать качественные изменения клеточного состава организма при протекании иммунного ответа, как в норме, так и при заболеваниях.

Для понимания механизмов иммунного ответа и оценки влияния различных физических и химических факторов на иммунокомпетентные клетки разрабатываются модели *in vitro* (Лысюк Е.Ю. и др., 2017, Ужвиюк С.В. и др., 2021, Moon S. et al., 2021), что позволяет оценить специфический пролиферативный, секреторный или цитотоксический потенциал клеток иммунной системы в ответ на различные стимулы.

Очевидна необходимость и перспективность исследований, направленных на предоставление доказательной базы использования тестов функционального состояния клеток в рутинной практике обследования пациентов. Обоснованное применение клинически значимых лабораторных методов обследования будет способствовать улучшению диагностики заболеваний и, как следствие, повышению качества лечения пациентов на основе принципов персонализированной медицины.

Степень разработанности темы исследования

Для осуществления полноценного иммунного ответа требуется функциональная сохранность клеток иммунной системы, а именно способность к активации, пролиферации клеток и секреции ими цитокинов (Хаитов Р.М., 2018, 2019, Козлов В.А., 2022). В задачи лабораторной диагностики входит корректная оценка состояния клеток врожденного и приобретенного иммунитета. Лучшим методом для этого является проточная цитометрия – современный, точный и быстрый метод исследования поверхностных и внутриклеточных структур, а также функционального состояния клеток. Достоверность результатов лабораторной диагностики при различных заболеваниях позволяет оптимизировать и персонализировать терапию.

В современных иммунологических лабораториях получили распространение методики, оценивающие, в основном, количественные изменения субпопуляционного состава лимфоцитов (Хайдуков С.В., Байдун Л.В., 2015). Существующие мировые рекомендательные документы, включающие, помимо количественных, и функциональные методы с использованием проточной цитометрии, регламентируют их проведение, главным образом, в научных целях (Cossarizza A. et al, 2020). Многие функциональные тесты, например, оценка пролиферативной и секреторной функций лимфоцитов, а также активации базофильных гранулоцитов, являются тестами, имеющими клиническое значение, что диктует их внедрение в практику.

Ответ лимфоцитов на Т- (фитогемагглютинин, ФГА) и В- (митоген лаконоса, PWM) клеточные митогены дает возможность оценить супрессию либо гиперактивацию клеток иммунной системы при первичных иммунодефицитах (Marits P. et al., 2014) и вторичной иммунной недостаточности (Barnettler S., 2019), в том числе в результате травмы (Chereshnev V.A. et al., 2012), в остром периоде инфекций (Lind Enoksson S. et al., 2021), при хронизации процессов (Piatek P., et al, 2019). У пациентов с органоспецифическими аутоиммунными заболеваниями возможно оценить наличие в крови аутореактивных клонов клеток, отвечающих пролиферацией на тканевые антигены (Di Blazi D. et al., 2020). Оценка активации базофилов *in vitro* при взаимодействии с аллергеном позволяет охарактеризовать причинно-значимый аллерген и способствовать назначению корректной терапии (Hoffmann H.J. et al., 2015, Alpan O. et al., 2021).

Тесты с доказанной в научных и клинических исследованиях эффективностью нуждаются в адаптации для внедрения их в диагностику в лабораториях практического профиля.

Несомненно, являются актуальными не только разработка научно обоснованных методов оценки функционального состояния клеток иммунной системы, но и утверждение методологии их проведения. Методологические аспекты включают теоретическое обоснование использования метода, алгоритмы и практические приемы их проведения, возможность интерпретации полученных результатов в контексте нормативных значений. При разработке методологической стратегии применения методов оценки функционального состояния клеток иммунной системы появится возможность ответить на ряд вопросов, а именно – каковы теоретические основы использования метода, как именно специалист лабораторной диагностики должен проводить исследования, как интерпретировать полученные результаты в контексте точности и биологической вероятности, каково клиническое значение данных, получаемых определенными методами. Разработка методологических основ определения функционального состояния клеток иммунной системы позволит внедрить эффективные методы обследования пациентов в клиническую практику.

Цель и задачи исследования

Цель работы – на основе клинко-экспериментального исследования обосновать клинко-диагностическую значимость проточной цитометрии для оценки функциональной активности клеток иммунной системы в норме и при иммунозависимых заболеваниях.

Для достижения указанной цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Разработать метод оценки пролиферативной функции лимфоцитов *in vitro* с митогенами и специфическими антигенами с помощью проточной цитометрии и валидировать его относительно стандартного радиобиологического метода.

2. Показать эффективность разработанного метода анализа функционального состояния иммунной системы в норме и у пациентов с аутоиммунным заболеванием рассеянным склерозом и вторичной иммунной недостаточностью при тяжелой сочетанной травме для прогноза течения иммунозависимых заболеваний.

3. Исследовать изменение функционального состояния клеток в ответ на химические и физические факторы в экспериментах *in vitro* с использованием оценки пролиферативной функции методом проточной цитометрии.

4. Оценить диагностическую значимость выявления сенсibilизации *in vitro* к лекарственным и ингаляционным алергенам в функциональном тесте активации базофилов в сопоставлении с нормальными значениями, данными клинической картины и результатами рутинного алергологического обследования.

5. Доказать информативность комплексной интерпретации данных функционального теста активации базофилов, включающей оценку сенсibilизации к алергенам, спонтанной и индуцированной антителами к комплексу IgE/FcεR1 активации базофилов, а также количества Т-лимфоцитов 2-го типа иммунного ответа.

6. Определить значимость применения оценки функционального состояния лимфоцитов и базофилов методом проточной цитометрии в клинко-лабораторной диагностике и определении течения иммунозависимых заболеваний.

Научная новизна

На основе клинико-экспериментального исследования обоснован комплексный подход к оценке функциональной активности клеток иммунной системы в норме и при иммунозависимых заболеваниях.

Разработан метод оценки пролиферативной активности лимфоцитов с помощью проточной ДНК-цитометрии. Метод валидирован в отношении «золотого стандарта» - определения пролиферации клеток по инкорпорации ^3H -тимидина. Обоснованы клинические и экспериментальные приложения оценки пролиферативной активности лимфоцитов, показавшие высокую эффективность их использования. Клинические методы прогноза неблагоприятного исхода тяжелой сочетанной травмы дополнены оценкой митогенстимулированной пролиферации лимфоцитов методом проточной цитометрии. Чувствительность данного метода составила 83%, специфичность 87%. Предложен дополнительный биомаркер для подтверждения обострения у пациентов с органоспецифическим аутоиммунным заболеванием - рассеянным склерозом. Им стал индекс стимуляции пролиферации лимфоцитов основным белком миелина, чувствительность предложенного метода составила 83% при специфичности 80%.

Впервые исследовано влияние химических и физических факторов (гликозид эмбинин, наноструктурированный бисиликат серебра, облучение полихроматическим светом) на функциональное состояние клеток в экспериментах *in vitro* с использованием оценки пролиферативной функции методом проточной цитометрии.

На большом клиническом материале впервые подтверждена высокая диагностическая значимость определения сенсibilизации к йодсодержащим рентгеноконтрастным препаратам и ингаляционным аллергенам пылевых клещей.

Впервые показано, что выраженное увеличение популяции Т-лимфоцитов 2-го типа иммунного ответа происходит за счет роста субпопуляции Т-цитотоксических лимфоцитов 2-го типа с фенотипом $\text{FSlowSSlowCD3}^+\text{CD8}^+\text{CD294}^+$.

Впервые предложена комплексная оценка результатов обследования пациентов с отягощенным аллергологическим анамнезом в тесте активации базофилов с целью определения сенсibilизации к причинно-значимому аллергену и характера протекающего иммунного воспаления. Доказано, что комплексный подход к оценке теста должен включать анализ ряда параметров - подтверждение наличия или отсутствия сенсibilизации к аллергену, уровень спонтанной и индуцированной антителами к комплексу $\text{IgE/Fc}\epsilon\text{R1}$ активации базофилов, а также количества Т-лимфоцитов 2-го типа иммунного ответа.

На основании нового методологического подхода с использованием технологии проточной цитометрии в многоцветном анализе на большом клиническом материале получены новые данные о функциональной активности лимфоцитов и базофилов в норме и при иммунозависимых заболеваниях. Результаты работы легли в основу нового научного направления в клинико-лабораторной диагностике и доказали необходимость включения функциональных тестов с помощью технологии проточной цитометрии в обследование пациентов с иммунозависимыми заболеваниями.

Теоретическая значимость

В работе систематизированы алгоритмы определения функциональной активности лимфоцитов и базофилов с использованием технологии проточной цитометрии при различных иммунозависимых заболеваниях.

Показана роль Т-клеток 2-го типа с фенотипом FSlowSSlowCD3⁺CD294⁺ для инициирования и пролонгирования аллергического воспаления с задействованием как гуморальных IgE-зависимых, так и клеточных механизмов при участии базофильных лейкоцитов, эозинофилов, нейтрофилов и цитотоксических Т-клеток 2-го типа в качестве эффекторов замедленных реакций гиперчувствительности IV типа, приводящих к значительному повреждению кожных покровов.

Предложено теоретическое обоснование ингибирования IgE/FcεRI-опосредованной активации базофилов при аллергическом и остром инфекционном воспалении, а также при использовании иммуносупрессивной терапии. Механизмы снижения активации клеток могут быть различны, связаны с особенностями проведения сигнала, как минимум, через ингибиторные рецепторы FcγRIIB и CD300a, обусловлены снижением экспрессии CD203c при приеме глюкокортикостероидных препаратов, а также гиперактивацией базофилов *in vivo*.

Показано, что модельные тест-системы для изучения пролиферации лимфоцитов *in vitro* с помощью проточной цитометрии позволяют на клеточном уровне оценить влияние химических и физических факторов на функциональную активность лимфоцитов, что обеспечивает предпосылки для их применения *in vivo*. В эксперименте выявлено перепрограммирование деятельности клеток-эффекторов на выполнение секреторной и киллерной функции, что подтверждено усилением их цитотоксической активности при снижении пролиферации в ответ на митоген. Обосновано отсутствие неблагоприятного воздействия наноструктурированного бисиликата серебра и облучения полихроматическим светом на нормальные лимфоциты и мезенхимальные стволовые клетки в отличие от опухолевых клеток.

Осуществлено всестороннее теоретическое обоснование возможности использования теста активации базофилов, исходя из функций этих клеток. На его основе создан алгоритм практического проведения данного теста с различными аллергенами, а также даны рекомендации по интерпретации результатов теста.

Результаты работы, включающие получение теоретических знаний о биологии клеточного ответа, позволили на клеточном уровне уточнить иммунопатогенез аутоиммунных, аллергических заболеваний и состояний вторичной иммунной недостаточности для определения типа воспаления, характера течения и прогноза иммунозависимых заболеваний.

Практическая значимость

Применение оценки функциональной активности клеток крови методом проточной цитометрии позволило оптимизировать клинко-лабораторную диагностику пациентов с вторичными иммунодефицитными состояниями, аллергическими и аутоиммунными заболеваниями с целью коррекции терапии.

С помощью разработанного метода оценки пролиферации лимфоцитов технологией проточной цитометрии определена диагностическая значимость и установлены пороговые значения уровня пролиферативной активности лимфоцитов в ответ на Т-клеточный митоген как прогностического фактора неблагоприятного исхода при тяжелой сочетанной травме.

Установлена диагностическая информативность индекса пролиферации лимфоцитов в ответ на основной белок миелина как дополнительного лабораторного фактора подтверждения обострения ремиттирующего рассеянного склероза.

Определение порогового значения показателя повысило чувствительность и специфичность предложенного метода оценки пролиферативной активности лимфоцитов с использованием разработанной модели *in vitro*.

На основании предложенного метода оценки пролиферативной активности лимфоцитов создана модельная система для определения гормонорезистентных лимфоцитов в периферической крови больных бронхиальной астмой для выявления пациентов с неудовлетворительным эффектом корректной базисной терапии препаратами глюкокортикостероидов на фоне полной комплаентности к лечению.

Выявлена высокая клиническая значимость определения сенсibilизации к йодсодержащим рентгеноконтрастным препаратам в тесте активации базофилов, который может быть рекомендован для углубленного обследования пациентов с отягощенным аллергологическим анамнезом. Доказано, что пациентам с выраженными реакциями *in vivo* на йодсодержащие рентгеноконтрастные препараты в тесте активации базофилов *in vitro* возможно подобрать альтернативный безвредный препарат, что будет способствовать безопасному проведению необходимых диагностических процедур с применением инструментальных методов исследования. Чувствительность исследования составила 94%.

Показано высокое клиническое значение подтверждения сенсibilизации к клещам домашней пыли в тесте активации базофилов *in vitro*. Использование этого метода диагностики сенсibilизации будет способствовать корректному отбору пациентов для проведения аллергенспецифической терапии, как единственному патогенетическому методу лечению аллергических заболеваний. Чувствительность исследования составила 87%.

Издано учебно-методическое пособие «Диагностика гиперчувствительности методом проточной цитометрии» (2022г.) одобренное Федерацией лабораторной медицины, регламентирующее все этапы осуществления теста активации базофилов. В нем изложен алгоритм взаимодействия специалистов лабораторного звена и врачей клинического профиля. Сравнительно охарактеризованы особенности различных тест-систем для проведения теста. Изложен алгоритм проведения теста активации базофилов, приведены протоколы цитометрического анализа. Указаны пути решения возможных методических проблем при проведении теста.

Методология и методы исследования

Для достижения цели исследования и реализации поставленных задач, обосновании выводов и положений, выносимых на защиту, были использованы анализ публикаций отечественных и зарубежных авторов, современные лабораторные методы исследования, основным был метод проточной цитометрии, проведено изучение анамнестических данных, выполнен статистический анализ.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Оценка пролиферативной активности лимфоцитов *in vitro* с помощью проточной цитометрии – объективный, достоверный и безопасный метод определения функционального состояния клеточного звена иммунитета для прогноза течения тяжелой сочетанной травмы и рассеянного склероза.

2. Анализ функциональной активности базофилов методом проточной цитометрии эффективен для обследования пациентов с отягощенным

аллергологическим анамнезом, нуждающихся в использовании йодсодержащих рентгеноконтрастных веществ, для подбора безопасных препаратов ввиду высокой чувствительности и специфичности при диагностике сенсibilизации.

3. Диагностика сенсibilизации к клещам домашней пыли с помощью клеточного теста для оценки функциональной активности базофилов ввиду высокой чувствительности и специфичности метода является корректной альтернативой кожных тестов при невозможности или отказе от их проведения.

4. Комплексный подход с анализом ряда параметров - оценки наличия сенсibilизации к аллергену, спонтанной и индуцированной активации базофилов, а также количества Т-лимфоцитов 2-го типа позволяет корректно интерпретировать результаты обследования пациентов и сделать заключение о доминирующем характере иммунного воспаления.

5. Анализ клеток иммунной системы методом проточной цитометрии с использованием функциональных тестов способствует улучшению лабораторной диагностики и уточнению прогноза течения иммунозависимых заболеваний ввиду высокой диагностической эффективности и безопасности проведения тестов.

Степень достоверности и апробация результатов диссертационной работы

Научные положения, выводы и практические рекомендации, сформулированные в работе, основаны на глубоком теоретическом анализе проблемы, их достоверность обеспечена достаточным количеством выполненных исследований с использованием современных лабораторных методов, репрезентативностью выборок, а также адекватной статистической обработкой полученных данных.

Материалы диссертации представлены и обсуждены на International Mast Cell and Basophil Meeting (г.Берлин, 2010), Всероссийском научном Форуме с международным участием имени академика В.И. Иоффе «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге» (г.Санкт-Петербург, 2009, 2015, 2017), Международном научном Конгрессе «Многопрофильная клиника XXI века» (г.Санкт-Петербург, 2011, 2016, 2017), Российской научно-практической конференции «Аллергические и иммунопатологические заболевания – проблема XXI века» (г.Санкт-Петербург, 2011, 2013, 2014, 2015, 2017, 2018, 2019), Всероссийской с международным участием школе-конференции по клинической иммунологии «Иммунология для врачей» (г.Пушкинские Горы, 2012, 2016, 2017, 2018, 2019, 2020, 2022), Всероссийской конференции с международным участием «Иммунологические чтения в г. Челябинске» (г.Челябинск, 2012, 2014, 2016, 2017, 2018, 2019, 2022), Международной научно-практической конференции «Фундаментальные и прикладные проблемы стоматологии» (г.Санкт-Петербург, 2014), Пермском научном форуме (г.Пермь, 2015), Российском Конгрессе лабораторной медицины (г.Москва, 2015), 1-м Калининградском научном иммунологическом Форуме (г.Калининград, 2016), Межрегиональном Форуме с международным участием «Клиническая иммунология и аллергология – междисциплинарные проблемы» (г.Казань, 2016), V Всероссийской научно-практической школе-конференции «Иммунология в клинической практике» (г.Красноярск, 2018), XI Российской научно-практической конференции с международным участием «Воронцовские чтения» (Санкт-Петербург,

2018), Научно-практической школе-конференции «Аллергология и клиническая иммунология» (г.Сочи, 2018, 2019, 2020, 2021, 2022), школе-семинаре «Применение проточной цитометрии в клинических иммунологических и гематологических исследованиях» (г.Минск, 2018), Объединенном иммунологическом Форуме (г.Новосибирск, 2019), I Международном Конгрессе «Лабораторная диагностика в клинической медицине: традиции и инновации» (г.Алматы, 2019), Second Moscow molecular allergology meetings (ММАМ-2019) (г.Москва, 2019), IV Российском Форуме с международным участием «Современная педиатрия. Санкт-Петербург. Белые ночи – 2019 (г.Санкт-Петербург, 2019), I Всероссийском Конгрессе с международным участием по фундаментальным проблемам лабораторной диагностики (г.Москва, 2021), III Балтийском симпозиуме по иммунологии, молекулярной и регенеративной медицине (г.Калининград, 2021).

Внедрение результатов в практику

Результаты работы внедрены и используются в учебной, научно-исследовательской и практической работе ряда учреждений – ФГБОУ ВО Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова МЗ Российской Федерации (Россия, г.Санкт-Петербург), ФГБОУ ВО Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И.Мечникова МЗ Российской Федерации (Россия, г.Санкт-Петербург), ФГБОУ ВО Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера МЗ Российской Федерации (Россия, г.Пермь), ФГБУ ВЦЭРМ им. А.М. Никифорова МЧС Российской Федерации (Россия, г.Санкт-Петербург), СПб ГБУЗ Городская больница №40 Курортного района (Россия, г.Санкт-Петербург), ООО Покровский банк стволовых клеток (Россия, г.Санкт-Петербург), ГАУ Ростовской области Областной клинко-диагностический центр (Россия, г.Ростов-на-Дону), ФГБУН Государственный научный центр Институт медико-биологических проблем РАН (Россия, г.Москва), ФГАОУ ВО Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского (Россия, г.Симферополь), медицинская компания Alfa Diagnostica SRL (Республика Молдова, г.Кишинев), КДЛ «Олимп» (Республика Казахстан, г.Нур-Султан).

В работе использованы результаты, полученные в ходе выполнения НИР «Изучение спонтанной и индуцированной аллергенами активации базофилов *in vitro*» п.6.2-13/Б согласно плану научно-технической деятельности МЧС России на 2011-2013г.г.

Личный вклад автора

Соискатель непосредственно участвовал в планировании и организации исследования, лично проводил эксперименты и основную часть лабораторного обследования, анализ, статистическую обработку, интерпретацию и обобщение результатов, а также представление полученных данных и внедрение результатов в практику работы иммунологических лабораторий.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации соответствуют паспорту научной специальности 3.3.8. Клиническая лабораторная диагностика, а конкретно пунктам 1, 2, 4, 8 области исследования паспорта специальности. Большую часть в работе

занимает приложение иммунологических методов к клинической лабораторной диагностике.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 69 печатных работ, включая 16 статей в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ, а также цитируемых в международных базах данных, для опубликования основных научных результатов диссертации по специальности 3.3.8. Клиническая лабораторная диагностика (биологические науки), получен патент «Способ прогнозирования эффективности Омализумаба при лечении бронхиальной астмы у детей», изданы монография «Анализ содержания ДНК методом проточной цитометрии. Возможности применения в клинической практике», учебно-методическое пособие «Диагностика гиперчувствительности методом проточной цитометрии», утвержденное Федерацией лабораторной медицины, выпущено практическое пособие «Проточная цитометрия».

Объем и структура диссертации

Текст диссертации изложен на 287 страницах машинописного текста и состоит из введения, глав, включающих обзор литературы, материалы и методы, результаты собственных исследований, заключения, а также выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и списка литературы. Работа иллюстрирована 76 таблицами и 31 рисунком. Список литературы включает в себя 330 источников, из которых 68 отечественных и 262 зарубежных.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Диссертационное исследование выполнено на базе отдела лабораторной диагностики и одобрено этическим комитетом ФГБУ ВЦЭРМ им. А.М. Никифорова МЧС России. Все пациенты наблюдались и обследовались в ФГБУ ВЦЭРМ им. А.М. Никифорова МЧС России амбулаторно, за исключением групп пациентов с тяжелой сочетанной травмой и рассеянным склерозом, лечение которых проходило в клиниках ВМА им. С.М.Кирова, а также пациентов детского возраста, которые наблюдались в СПбГМУ МЗ России. Лабораторные иммунологические исследования проводились в лаборатории клинической иммунологии отдела лабораторной диагностики ФГБУ ВЦЭРМ им. А.М. Никифорова МЧС России.

Диссертационное исследование состояло из клинической и экспериментальной частей.

Клинический материал. Обследование проведено 1458 пациентам, в группах сравнения было 172 условно здоровых человека. В клиническую часть исследования было включено 15 основных групп обследованных лиц. Проведено изучение историй болезни обследованных пациентов, а также осуществлен опрос лиц с отягощенным аллергологическим анамнезом после проведения обследования и последующего оперативного вмешательства с использованием йодсодержащих рентгеноконтрастных веществ (йРКВ) с целью определения наличия/отсутствия побочных реакций.

1. 184 пациента с лекарственной гиперчувствительностью (52 мужчины и 132 женщины, от 29 до 81 года, $61,9 \pm 0,8$ г.). Согласно анамнестическим данным все

пациенты были разделены на 4 группы. 1-я группа (n=79) - в анамнезе отмечались местные реакции на раствор йода, в 95% случаев состояние было классифицировано как легкая степень тяжести реакций (Хлудова Л.Г., 2019). У 2-й группы (n=59) наблюдались системные реакции на введение различных йРКВ, в 76% случаев была диагностирована средняя степень тяжести реакций (Хлудова Л.Г., 2019). У 8 пациентов реакция на введение йРКВ расценена как токсическая. В 4-й группе пациенты (n=38) предъявляли жалобы на выраженные симптомы гиперчувствительности при приеме различных лекарственных средств, не содержащих йод.

2. 315 пациентов с риноконъюнктивальными симптомами и/или патологией верхних и средних дыхательных путей (92 мужчины и 223 женщины, от 18 до 71 года, $40,9 \pm 0,7$ г.). 1-ю группу составили пациенты с бытовой сенсibilизацией (n=68), 2-ю группу - пациенты с полисенсibilизацией к бытовым, пыльцевым, пищевым, эпидермальным аллергенам в различных сочетаниях (n=180). Согласно анамнестическим данным у пациентов диагностирован легкий и средней тяжести аллергический ринит/риноконъюнктивит (n=121), бронхиальная астма легкой и средней тяжести (n=13) либо их сочетание (n=114). В ряде случаев дополнительно у пациентов верифицированы другие аллергические заболевания. У пациентов 3-ей группы (n=67) аллергический компонент не выявлен.

3. 68 пациентов (20 мужчин и 48 женщин, от 30 до 78 лет, $67,1 \pm 1,5$ г.), обследованных в связи с проявлениями лекарственной гиперчувствительности и имеющих повышенное относительное количество Т-лимфоцитов 2-го типа иммунного ответа $CD3^+CD294^+$. У 26 пациентов определено умеренное повышение (1,6-3,5%), у 42 – крайне высокое (3,6-22,3%) значение этого показателя.

4. 587 пациентов (279 мужчин и 308 женщин, от 47 до 78 лет, $63,1 \pm 1,4$ г.), которые проходили обследование с целью подтверждения сенсibilизации к различным аллергенам не менее трех раз каждый с интервалом 1-4 года.

5. 20 пациентов с поллинозом, подтвержденным на основании анамнеза и результатов кожных проб (10 мальчиков и 10 девочек, средний возраст $12 \pm 1,4$ г.) для оценки экспрессии иммуноглобулина Е (IgE) на мембране базофильных гранулоцитов.

6. Группа сравнения (n=10) для оценки уровня индуцированной анти-IgE антителами активации базофилов – пациенты в возрасте от 22 до 85 лет, $54,3 \pm 2,3$ г., 5 мужчин и 5 женщин со спокойным аллергоанамнезом на фоне острой инфекции.

7. Группа сравнения (n=34) для оценки сенсibilизации к различным аллергенам, ее составили условно здоровые люди в возрасте от 24 до 76 лет, $55,1 \pm 1,5$ г., 12 мужчин и 22 женщины. Волонтеры не имели реакций гиперчувствительности в анамнезе, онкологических заболеваний, в момент исследования отсутствовали острые и не было обострения хронических заболеваний.

8. Группа сравнения (n=10, 5 мальчиков и 5 девочек, средний возраст $14,0 \pm 1,4$ г.) для оценки экспрессии IgE на мембране базофильных гранулоцитов.

9. 20 пациентов в возрасте от 25 до 52 лет, 9 мужчин и 11 женщин, $37,1 \pm 1,5$ г., проходивших обследование в лаборатории клинической иммунологии. Периферическая кровь использована для валидации метода оценки пролиферативной активности лимфоцитов с помощью проточной цитометрии по отношению к стандартному радиобиологическому методу.

10. 25 пациентов с тяжелой сочетанной травмой, мужчины от 18 до 48 лет, $37,1 \pm 3,0$ г. В посттравматическом периоде часть пациентов (9 человек) скончались от последствий травмы. Исследование иммунологических показателей проводили трижды – на 1-3 сутки, 8-15 и 20-30 сутки после наступления травмы с целью оценки адекватности иммунного ответа в процессе восстановления организма.

11. 183 пациента с рассеянным склерозом (РС), 79 мужчин и 104 женщины, от 18 до 46 лет, $35,1 \pm 3,0$ г. У 21 человека был диагностирован прогрессивный, у 162 – ремиттирующий РС, при этом в обострении были анализированы 69 пациентов, 93 человека на момент обследования находились в состоянии ремиссии.

12. Группа сравнения ($n=120$) для оценки пролиферативной активности лимфоцитов с митогенами и основным белком миелина состояла из условно здоровых волонтеров в возрасте от 23 до 62 лет, 49 мужчин и 71 женщина, $38,6 \pm 1,6$ г. Критерии отбора соответствовали таковым в группе сравнения из п.7.

13. 46 детей с тяжелым течением бронхиальной астмы (32 мальчика и 14 девочек, от 6 до 17 лет, $14,3 \pm 1,2$ г.). У всех была подтверждена сенсibilизация к аллергенам домашней пыли по анамнезу и с помощью кожных проб. Высокие дозы ингаляционных глюкокортикостероидов (ИГКС) использовали 27 человек, средние дозы – 19. При оценке клинической эффективности проводимой терапии было определено, что у 24 пациентов лечение было достаточно эффективным, у 22 детей назначенная терапия не позволяла контролировать течение заболевания.

14. Группа сравнения ($n=8$, 5 мальчиков и 3 девочки от 8 до 17 лет, $15,6 \pm 1,2$ г.) – условно здоровые дети с отсутствием аллергических, аутоиммунных и инфекционных заболеваний на момент обследования.

15. Группа сравнения ($n=10$) - пациенты с риноконъюнктивальными симптомами и положительными результатами кожного тестирования с аллергеном *D. pteronissinus* (АО «Биомед» им.И.И.Мечникова, Россия). Среди них был 1 мужчина и 9 женщин в возрасте от 21 года до 54 лет, $35,7 \pm 3,8$ г.).

Весь клинический материал предоставлен в ходе проведения плановых процедур после подписания информированного согласия.

Экспериментальная часть. Исследование состояло из 3-ех разделов, в которых было продемонстрировано влияние химических и физических факторов на функциональное состояние клеток различного происхождения.

Помимо лимфоцитов периферической крови волонтеров в работе были использованы клеточные линии. В качестве модели опухолетрансформированных клеток были клетки миеломной линии человека RPMI 8226 (Коллекция клеточных культур Института цитологии РАН, Санкт-Петербург). В качестве клеток-мишеней для оценки цитотоксической функции НК-клеток использовали линию K-562 - клетки хронической миелогенной лейкемии человека из той же Коллекции. Методом адгезии были выделены три линии мезенхимальных стволовых клеток (МСК) человека - 2 из пунктата костного мозга (здорового донора и больного множественной миеломой), одна - из жировой ткани здорового донора. МСК выращивали в специализированной среде Mesencult (StemCellTechnologies, Канада).

Для изучения влияния модифицированной видимым светом периферической крови на жизнеспособность и пролиферацию клеток линии RPMI 8226 и лимфоцитов крови была сформирована 1-я экспериментальная группа обследованных лиц. Она включала 10 волонтеров, 2 мужчины и 8 женщин от 25 до 50 лет. Модификация

крови осуществлялась в результате транскутанного облучения небольшого участка кожи поясничной области видимым поляризованным полихроматическим светом, сочетанным с полихроматическим инфракрасным светом (ВИД+ИК), близким к естественной солнечной радиации (480-3400 нм). Облучение проводили с использованием аппарата Биоптрон (Швейцария).

Второй экспериментальный раздел включал оценку влияния коллоидного раствора наноструктурированного бисиликата серебра $Ag_6Si_2O_7$ - атомных кластеров серебра (АКС) на нормальные (МСК и лимфоциты условно здоровых волонтеров) и трансформированные (RPMI 8226) клетки. АКС с размером частиц 1-2 нм в деионизированной воде получен в ФТИ им А.Ф.Иоффе РАН.

В третьем экспериментальном разделе для оценки иммуномодулирующего эффекта флавонового гликозида эмбинина на клетки иммунной системы была использована периферическая кровь 30 условно здоровых лиц в возрасте от 23 до 53 лет, составивших 2-ю экспериментальную группу. Химически чистый эмбинин (6-(2-О-(-альфа-L-рамнопиранозил)-бета-D-глюкопиранозил)-5-гидрокси-7-метокси-2-(4-метоксифенил)-4Н-1-бензопиран-4-он) был получен методом препаративной высокоэффективной жидкостной хроматографии из надземной части *I. lactea* сотрудниками СПХФУ и Университета им. Генриха Гейне (Германия). Эмбинин использовали в виде водного раствора в концентрациях 1 (низкая доза) и 10 (высокая доза) мкг/мл.

Методы исследования. Основным методом исследования в работе была *проточная цитометрия*, с ее помощью определяли пролиферативный потенциал МСК и лимфоцитов периферической крови, поверхностную экспрессию рецепторов на лимфоцитах и базофилах, цитотоксическую функцию НК-клеток, а также оценивали результат теста активации базофильных гранулоцитов.

Для определения пролиферативной активности лимфоцитов цельную кровь, забранную в вакутейнеры с гепарином лития, разводили 1:10 и инкубировали в полной питательной среде RPMI 1640 с глутамином и 10% сывороткой эмбрионов коров (Биолот, Россия) при 37⁰С в атмосфере 5% CO₂. Для определения спонтанной пролиферации лимфоцитов клетки культивировали без добавления индукторов. Для оценки индуцированной митогенами пролиферации инкубация крови проводилась совместно с ФГА в концентрации 15 мкг/мл (Sigma, США) и PWM в концентрации 5 мкг/мл (Sigma, США) в течение 3 суток. Для оценки индуцированной аутоантигеном пролиферации инкубация крови проводилась с основным белком миелина (Sigma, США) в концентрациях 2,5 мкг/мл и 15 мкг/мл в течение 7 суток. После окончания инкубации клеточную взвесь обрабатывали 1% тритоном X-100 (ICN Biomedicals, Германия) и окрашивали 1% бромистым этидием (Sigma, США) в присутствии 1% рибонуклеазы А (Sigma, США) не менее 30 минут при 4⁰С. Протокол цитометрического анализа включал гистограммы по обоим каналам светорассеяния и 3-му каналу флуоресценции для оценки окрашенных пролиферирующих клеток (EPICS XL либо Cytomics FC 500 либо Navios, Beckman-Coulter, США). После сбора данных проводили анализ ДНК-гистограмм с использованием программы MultiCycle AV ver. 3 (Phoenix Flow Systems, США). Индекс пролиферации вычисляли как сумму клеток, находящихся в синтетической, постсинтетической фазах и в митозе и выражали в процентах. Индексы стимуляции на аутоантиген рассчитывали из соотношения показателей антиген-стимулированной и спонтанной пролиферации

лимфоцитов. При проведении исследования соблюдали правила регистрации, анализа и интерпретации ДНК-гистограмм (Shankey T.V. et al., 1993, Ormerod N.G. et al., 1998).

При параллельном исследовании пролиферативной активности лимфоцитов методом проточной цитометрии и в *радиоизотопном анализе* в планшете культивировали клетки в двойном количестве. Через 2-е суток в половину лунок вносили меченый тритием тимидин (метил-³H-тимидин, удельная радиоактивность препарата 1-2 Кю/мкмоль). Концентрация тимидина в лунке планшета была 0,5 мКю на лунку. Через сутки подсчитывали число импульсов в минуту в пробе на счетчике β-частиц. Индекс стимуляции определяли как отношение количества импульсов из митогенстимулированных проб по сравнению с контрольными.

Для выявления гормонорезистентных клеток пролиферативную активность лимфоцитов стимулировали ФГА в течение 3-ех суток и специфическим антигеном домашней пыли («Аллерген из домашней пыли», Биомед, 10000 PNU/мл, Россия) в течение 7-ми суток, дополнительно культивировали клетки с индукторами в присутствии пульмикорта (Будесонид, 0,25 мг/мл, AstraZeneca AB, Швеция). Условия культивирования клеток и проведения цитометрического анализа аналогичны описанным выше. Индекс АГ7/С7 - соотношение показателей антиген-стимулированной и спонтанной пролиферации лимфоцитов. Индекс АГ7+П/АГ7 – частное от деления количества клеток, пролиферирующих в ответ на антиген домашней пыли в присутствии пульмикорта на количество клеток, пролиферирующих в ответ на антиген домашней пыли.

Для оценки влияния АКС кинетику пролиферации МСК определяли в двух экспериментах - сразу после 24-часового воздействия АКС в концентрациях 2 и 3 мкг/мл, затем АКС убирали из среды и оценивали повторно через 24 ч культивирования. Лимфоциты периферической крови инкубировали в течение 24 ч с ФГА (контроль), а также одновременно с ФГА и АКС в нескольких концентрациях - 0,5 мкг/мл, 1 мкг/мл, 2 мкг/мл и 3 мкг/мл. После прекращения культивирования оценивали распределение клеток по фазам жизненного цикла методом проточной цитометрии в ДНК-анализе.

Эффект цитотоксичности АКС на клетки RPMI 8226 определяли в *лактатдегидрогеназном (ЛДГ)-тесте* (Pierce LDH Cytotoxicity Assay Kit, Thermo scientific, США) в соответствии с инструкцией к набору. Измерение оптической плотности растворов производили на спектрофотометре (Multilabel rider, Perkin Elmer, США) при длине волны 490 нм. Значение цитотоксичности высчитывали по формуле: % цитотоксичности = ((АКС-индуцированная ЛДГ активность–спонтанная ЛДГ активность)/(Максимальная ЛДГ активность–спонтанная ЛДГ активность)) x100.

Для оценки влияния ВИД+ИК на пролиферацию лимфоцитов волонтеров и клеток линии RPMI 8226 при культивировании клеток заменяли сыворотку эмбрионов коров на индивидуальные сыворотки добровольцев до и после облучения в течение 4-ех дней. Исследовали уровень спонтанной и индуцированной ФГА и РWM пролиферации лимфоцитов в 3-ех суточной культуре. Жизнеспособность клеток линии RPMI 8226 оценивали трижды – через 24, 48 и 96 часов культивирования с сыворотками волонтеров в *МТТ-тесте* с использованием 10% метилтетразолия (МТТ, 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide,

Sigma–Aldrich, США). Измерение оптической плотности раствора производили на спектрофотометре (Multilabel rider, Perkin Elmer, США) при длине волны 540 нм. Количество живых клеток определяли по калибровочной кривой в соответствии со значением оптической плотности окрашенного раствора в лунках и выражали в % относительно контроля.

С целью изучения влияния эмбина на функциональные характеристики лимфоцитов периферической крови методом проточной цитометрии оценивали поверхностную экспрессию активационных маркеров CD69 и CD38 (Beckman Coulter, США) на трех популяциях клеток-эффекторов после 18 часов инкубации в условиях 37⁰С и 5% CO₂ без дополнительной стимуляции, а также в присутствии низкой и высокой доз эмбина. После лизиса эритроцитов (OptiLyse С, Beckman Coulter, США) окрашенные образцы анализировали в многоцветном протоколе (Cytomics FC 500, Beckman Coulter, США). Исследовали пролиферативную активность лимфоцитов в присутствии ФГА, а также ФГА с низкой и высокой дозами эмбина после 3-х суток инкубации с использованием ДНК-анализа (Cytomics FC 500, Beckman Coulter, США). Влияние эмбина на цитотоксическую функцию НК-клеток было исследовано с использованием в качестве мишеней К-562. После окрашивания клеток (CD107a, Biolegend, США, CD3-FITC/CD(16+56), CD45, Beckman Coulter, США) в многоцветном анализе проводили оценку поверхностной экспрессии CD107a на Т-лимфоцитах, НК-клетках и НКТ-клетках после культивирования с К-562 в течение 18 часов (Navios, Beckman Coulter, США). Оценивали спонтанную и индуцированную клетками-мишенями экспрессию CD107a.

Тест активации базофилов проводили методом проточной цитометрии (Cytomics FC 500/Navios, Beckman Coulter, США) с использованием двух наборов реагентов – Allergenicity kit (Beckman Coulter, США) и BD FastImmune (Becton Dickinson, США) согласно инструкциям к наборам. В первом ките идентификацию базофилов осуществляли в многоцветном протоколе на основании данных бокового светорассеяния и коктейля моноклональных антител CD3/CD294/CD203с, а их активацию оценивали на основании возрастания экспрессии CD203с после стимуляции аллергенами *in vitro*. Во втором наборе идентификацию базофилов осуществляли в многоцветном протоколе на основании данных бокового светорассеяния и коктейля моноклональных антител CD123/HLA DR/CD63, а их активацию оценивали на основании экспрессии CD63. Проводили оценку 500 базофилов для получения статистически валидных результатов. В тесте оценивали несколько параметров - спонтанную и индуцированную аллергенами активацию базофилов, активацию клеток на позитивный контроль - на анти-IgE антитела при использовании Allergenicity kit и на fMLP в наборе BD FastImmune, а также количество Т-клеток 2-го типа при использовании Allergenicity kit. Тесты с аллергенами считали положительными при индексе активации базофилов более 1,1 (Allergenicity kit) или в том случае, если относительное количество активированных базофилов составляло 1,4% и более (BD FastImmune). В группе пациентов с гиперчувствительностью к содержащим йод препаратам в качестве стимулов использовали ультравист 300, омнипак 300, оптирей 300 в разведении 1:25. В группе пациентов с риноконъюнктивальными симптомами использовали аллергены клещей домашней пыли *D.pteronissinus* и *D.farinae* (Siemens) в том же разведении.

Для определения плотности экспрессии IgE на мембране базофилов использовали проточную цитометрию (Cytomics FC 500, Beckman Coulter, США). Клетки окрашивали моноклональными антителами к IgE (ARIGO biolaboratories, Тайвань) и CD294 (CRTH2) (Beckman Coulter, США). Уровень экспрессии IgE на мембране базофилов определяли по средней интенсивности свечения базофильных гранулоцитов по первому каналу флуоресценции и выражали в у.е.

Определение спонтанной, индуцированной ФГА (маточный раствор 1 мг/мл) продукции, а также содержания в сыворотке интерлейкина 4 и интерферона γ осуществляли в соответствии с инструкцией производителя с помощью трехстадийного «сэндвич»-варианта твердофазного *иммуноферментного анализа* («Интерлейкин-4-ИФА-БЕСТ» и «Гамма-IFN-ИФА-БЕСТ», Вектор Бест, Россия). Измерение величины оптической плотности растворов в лунках проводили на спектрофотометре вертикального сканирования Sunrise Tecan, Австрия с основным фильтром 450 нм с построением калибровочной кривой.

Определение в сыворотке крови общего IgE, специфических иммуноглобулинов E (sIgE) к аллергенам клещей домашней пыли *D.pteronissinus* и *D.farinae*, эозинофильно-катионного белка осуществляли *хемилюминесцентным методом* на анализаторах Immulite 2000, Immulite 2000 XPI (Siemens, Германия).

Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакета Statistica 12.0 (StatSoft) с определением описательных статистик (средних значений, стандартной ошибки, медианы и квартилей). Статистическую значимость различий в группах оценивали при помощи непараметрического теста U - Манна-Уитни для зависимых и независимых переменных. Для выявления и оценки тесноты связи между количественными признаками использовали непараметрический корреляционный анализ по Спирмену. Частотный анализ проводили с использованием четырехпольных таблиц сопряженности на основании критерия χ^2 Пирсона. Статистически значимыми различия сравниваемых показателей считали при $p < 0,05$. Для определения порогового значения (cut-off point) применяли ROC-анализ.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Комплексная диагностика, включающая помимо анамнеза, физикального осмотра, данных инструментальных исследований, также использование результатов лабораторных тестов, в том числе для оценки состояния иммунной системы, необходима для получения объективного представления о состоянии пациента, отражает патогенез заболевания и способствует назначению адекватной терапии.

Проведенное исследование направлено на разработку методологических основ оценки функционального состояния клеток иммунной системы методом проточной цитометрии с использованием многоцветного анализа популяций.

Разработка и валидация метода оценки пролиферативной активности лимфоцитов методом проточной цитометрии. Для того, чтобы оценить пролиферативную активность лимфоцитов в ответ на митогены и аутоантигены был разработан экологически безопасный метод анализа количества клеток в разных фазах митотического цикла с помощью проточной ДНК-цитометрии с целью внедрения его в клиническую практику. За основу разрабатываемого метода была взята методика постановки классического пролиферативного теста (Найт С., 1998).

После культивирования клеток для оценки распределения их по фазам жизненного цикла вместо радиоизотопного способа проводили измерение содержания ДНК в окрашенных ядрах лимфоцитов. Концентрация реагентов для пробоподготовки была подобрана в многочисленных предварительных экспериментах. Использование анализа ДНК с помощью проточной цитометрии для оценки стимулированной митогенами пролиферации было предложено в научных целях достаточно давно несколькими группами зарубежных коллег (Bussa S. et al, 1993, Kohler Ch., et al, 1997). В силу разных причин этот объективный и воспроизводимый метод в широкую практику различных клинико-диагностических лабораторий не вошел.

Нами разработан четкий алгоритм пробоподготовки с небольшим количеством реагентов, при этом он обеспечивает получение гистограмм высокого качества с коэффициентом вариации менее 2,5. Оценка пролиферативной активности лимфоцитов не занимает длительное время и демонстрирует экономическую целесообразность. Использование цельной крови вместо выделения мононуклеров не только позволяет получить корректные и наиболее близкие к ситуации *in vivo* результаты, но также сокращает время проведения теста, количество используемых реагентов и не требует центрифугирования образца в стерильных условиях.

Метод оценки пролиферативной активности лимфоцитов с использованием проточной цитометрии был успешно валидирован относительно «золотого стандарта», а именно радиобиологического теста. Коэффициенты корреляции результатов оценки пролиферации лимфоцитов между двумя методами составили $R=0,78$, $0,73$ и $0,84$ ($p<0,05$) по трем изученным параметрам (рис.1а, б, в). Высокие коэффициенты корреляции между результатами радиоизотопного метода и собственных методик с использованием ДНК-цитометрии приведены в ряде публикаций (Zhi-Jun Y. et al., 1997, Marits P. et al., 2014).

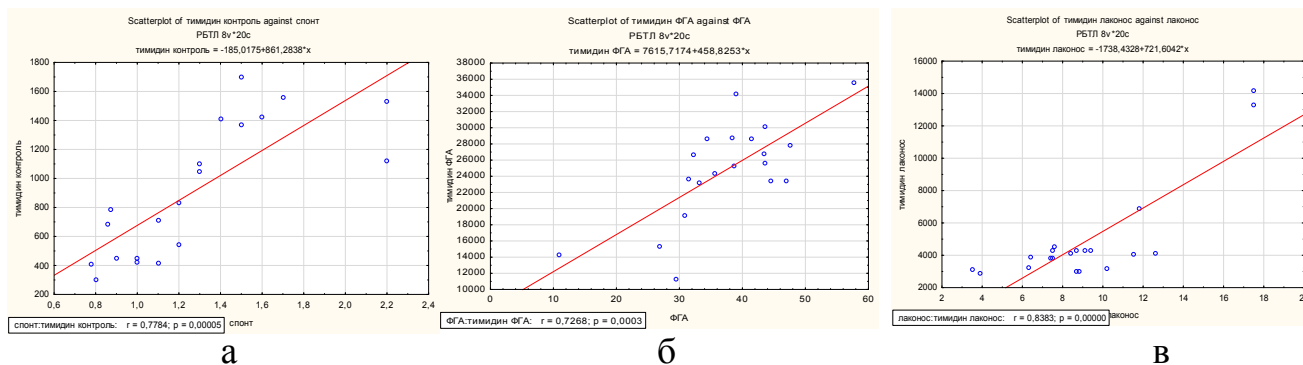


Рис.1. Сопоставление результатов оценки спонтанной (а), индуцированной ФГА (б) и PWM (в) пролиферации лимфоцитов радиоизотопным и методом проточной цитометрии. По оси абсцисс количество клеток в S-фазе и G_2/M , %, по оси ординат уровень радиоактивности, количество импульсов в минуту.

На основании обследования 120 условно здоровых волонтеров были определены референтные интервалы спонтанной и стимулированной митогенами пролиферации. Для спонтанной пролиферации лимфоцитов интервал составил 0,5-1,5%, для индуцированной ФГА - 13-60%, для индуцированной PWM - 3-10%.

При современном уровне оснащения клинико-диагностических лабораторий метод оценки спонтанной и стимулированной митогенами пролиферации

лимфоцитов с использованием проточной цитометрии может быть использован очень широко в комплексной оценке иммунного ответа пациентов, страдающих иммунозависимыми заболеваниями, что будет способствовать правильной диагностике профиля иммунного ответа.

Разработанный метод оценки пролиферативной активности был использован для обследования пациентов, также он был применен для оценки пролиферации клеток в экспериментальных исследованиях.

Пролиферативная активность лимфоцитов пациентов с острой иммунной недостаточностью (на примере тяжелой сочетанной травмы). По данным ВОЗ около 8% смертей в мире происходят в результате травм (World health statistics, 2021). Выраженная посттравматическая иммуносупрессия, иммунный дистресс-синдром (Шапкин Ю.Г. и др., 2020), несомненно, вносят значительный вклад в общую летальность пациентов с политравмой. В нашем исследовании у пациентов в первые дни после тяжелой сочетанной травмы по сравнению с волонтерами выявлено достоверное увеличение спонтанной пролиферации (1,9% [1,0-3,0] против 1,0% [0,8-1,1], $p < 0,05$), что было обусловлено остротой состояния пациентов и демонстрировало напряженность иммунного ответа *in vivo*. Также показано угнетение пролиферативной функции Т-клеток в ответ на ФГА (5,3% [2,3-9,9] против 40,7% [28,1-47,8], $p < 0,05$), что также объяснялось тем фактом, что лимфоциты были активированы *in vivo* в процессе иммунного ответа и дополнительная стимуляция пролиферации приводила их в состояние рефрактерности. Впоследствии к третьей-четвертой неделям после травмы у части пациентов наблюдалось повышение пролиферативной активности Т-лимфоцитов. Отсутствие восстановления ответа на ФГА к концу второй недели наблюдения расценивалось нами как неблагоприятный прогноз, т.е. высокий риск летального исхода, что требовало изменения тактики ведения пациентов. При помощи ROC-анализа было выявлено, что индекс пролиферации лимфоцитов в ответ на стимуляцию ФГА менее 10,4% при исследовании показателя в течение второй недели после тяжелой сочетанной травмы служит прогностическим фактором наступления летального исхода. Чувствительность определения неблагоприятного исхода составила 83%, специфичность 87%, $p < 0,001$.

Пролиферативная активность лимфоцитов пациентов при хроническом заболевании (на примере рассеянного склероза). РС является хроническим прогрессирующим заболеванием центральной нервной системы аутоиммунной природы и характеризуется образованием очагов демиелинизации в белом веществе головного мозга и в спинном мозге (Шмидт Т.Е., Яхно Н.Н., 2021). Его прогрессирование обусловлено сочетанным повреждающим действием на нервную ткань макрофагов, Т-цитотоксических клеток и Т-хелперов 1-го типа (Хаитов Р.М., 2018). Помимо клинического обследования и инструментальной диагностики пациентов для уточнения характера течения РС возможно использование лабораторных биомаркеров, а именно выявление в периферической крови пациентов специфических к белкам миелина аутореактивных клонов лимфоцитов.

Разработанный метод был адаптирован к оценке пролиферации антигенспецифических лимфоцитов в ответ на аутоантиген основной белок миелина у пациентов с рассеянным склерозом. Мониторинг миелин-специфических клонов лимфоцитов *in vitro* методом проточной цитометрии в пролиферативном тесте

у пациентов способствовало лабораторному подтверждению обострения. Выявлено, что при обострении заболевания индекс стимуляции пролиферации лимфоцитов на основной белок миелина был значимо выше, чем в ремиссии - 1,20 [1,10-1,20] и 0,90 [0,90-1,00], $p < 0,001$. Результаты работы согласуются с немногочисленными данными литературы (Зафранская М.М. и др., 2015) о выявлении специфического пролиферативного ответа лимфоцитов больных рассеянным склерозом при культивировании мононуклеаров с миелиновым антигеном *in vitro*.

Показано, что индекс стимуляции пролиферации лимфоцитов на основной белок миелина более 1,0 является прогностическим фактором наличия обострения заболевания, что требует коррекции проводимой терапии. Чувствительность метода при использовании низкой дозы основного белка миелина составила 83%, специфичность была 80% (рис.2а), высокой дозы – 75% и 75% соответственно (Рис.2б), $p < 0,001$.

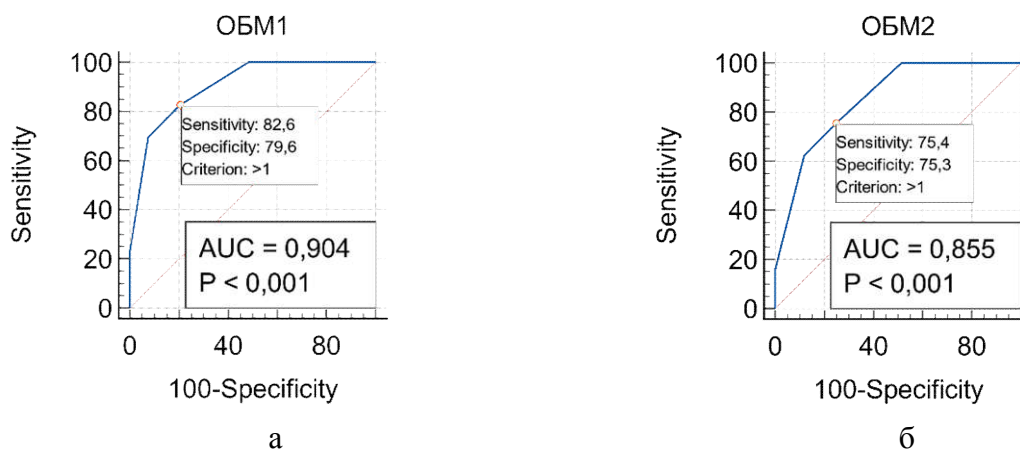


Рис.2. Результаты определения порогового значения индуцированной основным белком миелина в дозе 2,5 мкг/мл (а) и 15 мкг/мл (б) пролиферативной активности лимфоцитов пациентов с рассеянным склерозом методом ROC-анализа для разделения пациентов в обострении и ремиссии.

Таким образом, использование в лабораторной диагностике функционального теста оценки пролиферации лимфоцитов в ответ на митогены и аутоантиген - основной белок миелина - у пациентов с вторичной иммунной недостаточностью и аутоиммунным заболеванием позволило расширить диагностическую панель и выявить биомаркеры с высокой прогностической значимостью.

Применение оценки пролиферации лимфоцитов в экспериментальных исследованиях. Было изучено функциональное состояние клеток при воздействии факторов физической и химической природы, что явилось первым этапом тестирования новых соединений перед оценкой их действия *in vivo*.

Различные факторы химической и физической природы могут влиять на функционирование клеток организма, в том числе иммунной системы. Показано, что растительные флавоноиды могут обладать как иммуностимулирующими, противовоспалительными, противоопухолевыми свойствами (Auyeung K.K., Ko J.K., 2010), так и ингибировать деятельность иммунной системы (Dimitrova P., et al., 2018). Известно, что препараты наносеребра и его соединений обладают выраженными цитотоксическими свойствами, в том числе и против опухолевых клеток (Zhang X.F.

et al., 2016). Показана высокая биологическая активность модифицированной в результате фототерапии крови - облучение видимым полихроматическим светом вызывает секрецию клетками крови оксида азота (Samoilova K.A. et al., 2015), цитокинов (Zhevago N.A., Samoilova K.A., 2006) и ростовых факторов (Богачева О.Н. и др., 2004), что приводит к модулированию функций лейкоцитов и клеток сосудистой стенки.

В экспериментальных исследованиях с применением разработанного метода оценки пролиферативной активности лимфоцитов было показано дозозависимое снижение пролиферативного потенциала клеток при культивировании с флавоновым гликозидом эмбинином (табл.1), что отражает его супрессивное воздействие на пролиферацию с параллельным стимулирующим эффектом на киллерный потенциал клеток-эффекторов (рис.3). Снижение митотической активности свидетельствовало о перепрограммировании деятельности клеток на выполнение секреторной и киллерной функции.

Таблица 1. Влияние различных доз эмбиниона при инкубации с ФГА на пролиферативную активность Т-клеток

Индукторы	Количество клеток в S-фазе и G ₂ /M, %
ФГА (контроль)	36,1±3,0
ФГА + низкая доза эмбиниона	34,4±3,2
Эффект на низкой дозе	-1,7 *
ФГА + высокая доза эмбиниона	32,7±2,2
Эффект на высокой дозе	-3,4 *
Различия между дозами	1,7 **

* - $p < 0,05$ по сравнению со стандартным индуктором ФГА, ** - $p < 0,05$ между дозами

Эффект фармакологической субстанции - разность количества клеток в S-фазе и G₂/M в ответ на митоген ФГА в совокупности с соответствующей дозой эмбиниона и данным показателем в ответ на стандартный митоген ФГА (контроль).

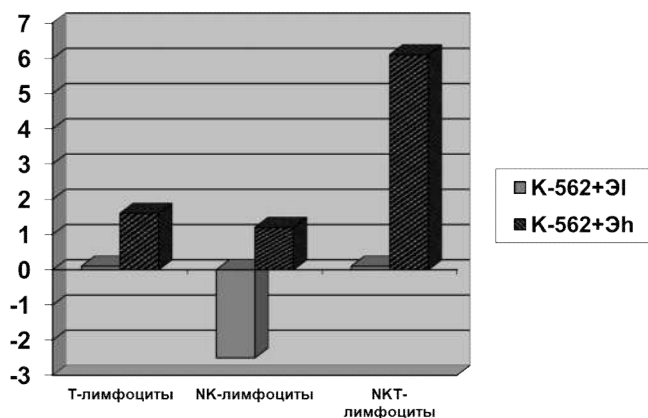


Рис.3. Эффект эмбиниона на киллерную активность клеток-эффекторов. Эффект фармакологической субстанции - разность между показателем индуцированной цитотоксической активности лимфоцитов (%) в ответ на К-562 в совокупности с соответствующей дозой эмбиниона и данным показателем (%) в ответ на стандартный индуктор К-562 (контроль). Эффекты отличаются ($p < 0,05$) от контрольных значений индуцированной цитотоксической активности при использовании низкой дозы соединения на NK-клетках, при использовании высокой дозы - на Т- и НКТ-лимфоцитах. К-562+ЭI - эффект изменения цитотоксической активности клеток на К-562 при низкой дозе эмбиниона, К-562+Эh - при высокой дозе.

В двух других модельных тест-системах было показано отсутствие изменений функциональной активности лимфоцитов и МСК в отличие от токсического действия наноструктурированного бисиликата серебра АКС и фотомодифицированной ВИД+ИК крови на клетки миеломной линии RPMI 8226. Эти факторы обладали противоопухолевым эффектом, что доказано по результатам ЛДГ- и МТТ-тестов. Порог чувствительности к наночастицам серебра для трансформированных клеток может быть ниже, чем для нормальных (Azizi M, et al., 2017), что связано с высокой скоростью обменных процессов в опухолевых клетках, в результате чего происходит истощение запасов антиоксидантов, что и приводит к быстрой гибели опухолетрансформированной клетки от окислительного стресса (Valle-Prieto A., Conget P.A., 2010). Нормальные и опухолевые клетки могут по-разному реагировать на фототерапию (Barasch A. et al., 2016), причем повреждения отмечены именно в трансформированных клетках и, по-видимому, обусловлены проапоптотическим действием излучения (Tsai S.R. et al., 2015).

АКС и фотомодифицированная ВИД+ИК кровь не оказывали токсического действия на нормальные клетки, не снижали пролиферацию лимфоцитов и МСК, не изменяли баланс клеток в разных фазах митотического цикла, что предполагает возможность их безопасного и эффективного применения в испытаниях *in vivo* у пациентов с онкологическими заболеваниями.

Выявление гормонорезистентных лимфоцитов периферической крови для прогнозирования эффективности глюкокортикостероидной терапии бронхиальной астмы. Бронхиальная астма (БА) является одним из наиболее распространенных неинфекционных заболеваний, которым страдает в Российской Федерации до 10% детского населения и до 7% взрослых (Бронхиальная астма. Проект федеральных клинических рекомендаций, 2019). В схемы базисной терапии пациентов с БА для купирования воспаления дыхательных путей включают ингаляционные глюкокортикостероиды в связи с их иммуносупрессивным действием (Global Initiative for Asthma. Global strategy for asthma management and prevention. 2019). Стероидрезистентных пациентов менее 5% от всех больных БА, но именно на них приходится около половины расходов здравоохранения (Zervas E. et al., 2018). В настоящее время не решен вопрос о возможности прогнозирования в модельных тест-системах *in vitro* чувствительности пациентов к кортикостероидной терапии. В нашем исследовании у больных БА с недостаточно эффективной терапией показано отсутствие необходимой супрессии специфического пролиферативного ответа на аллерген домашней пыли под влиянием пульмикорта, индекс АГ7+П/АГ7 был более 1 в отличие от пациентов с эффективной терапией - $1,08 \pm 0,35$ и $0,78 \pm 0,1$ соответственно, $p < 0,05$. Выявление в модельной тест-системе антиген-специфических гормонорезистентных лимфоцитов способствовало лабораторному подтверждению клинических данных о наличии неполного контроля заболевания у пациентов с БА в связи с гормонорезистентностью.

Помимо пролиферации другой важнейшей функцией клеток иммунной системы является возможность их активации в ответ на стимул.

Оптимизация теста активации базофилов. Клиническая лабораторная диагностика аллергических заболеваний является крайне актуальной задачей ввиду того, что ими страдают не менее 30% населения земного шара. В дополнение к анамнестическим данным и результатам тестов *in vivo* для диагностики

сенсibilизации было предложено множество лабораторных методов, но наиболее клинически значимыми и патогенетически обоснованными являются определение специфических иммуноглобулинов класса E (Федеральные клинические рекомендации по диагностике аллергических заболеваний, 2019) и относительно новый тест активации базофилов методом проточной цитометрии (Ebo D.G. et al, 2008, Hoffmann H.J. et al., 2015). В рутинной практике чаще используется определение sIgE, но при аллергическом рините (Campo P. et al, 2019), гастроинтестинальных проявлениях аллергии (Heine R.G., 2015) sIgE часто не выявляются. Известно, что чувствительность определения sIgE к лекарственным средствам невелика (Ansotegui I.J. et al, 2020). Самым современным является тест активации базофилов, предложенный в конце 20 века. Он сочетает в себе как безопасность для пациента, так и преимущества провокационных проб для оценки взаимодействия возможного аллергена и клеток-эффекторов аллергического воспаления *in vitro*. Базофильные гранулоциты экспрессируют более 40 различных рецепторов, включая рецепторы к хемокинам (CCR1, 2, 3, 5, CXCR 2, 4), цитокинам (IL-3R, IL-25R, IL-33R, IL-18R, VEGFR), компонентам комплемента (CD21/C3d, CD88/C5a), иммуноглобулинам E (FcεRI, FcεRII), G (FcγRIII, FcγRIIB), D, а также MRGPRX2 (Mas-related G-protein-coupled receptor X2) и др. (Siracusa M.C. et al, 2013, Wedi B. et al, 2020), что позволяет этим клеткам участвовать в развитии как IgE, так и не IgE-опосредованного аллергического воспаления (Ansotegui I.J. et al, 2020). Поскольку тест активации базофилов является функциональным, то существуют сложности при его стандартизации и каждая лаборатория нуждается в установлении собственных пороговых значений ввиду использования различных стратегий гейтирования для определения целевой популяции и маркеров активации клеток (Ansotegui I.J. et al, 2020).

Предложенные в нашей работе алгоритмы преаналитической подготовки материала, оценки результатов тестов на аналитическом этапе и подходы к интерпретации результатов на постаналитическом этапе позволили стандартизовать проведение теста активации базофилов и внедрить его в практику клинко-диагностических и научно-исследовательских лабораторий нашей страны и ближнего зарубежья. На преаналитическом этапе методики пробоподготовки периферической крови для использования в тесте, изложенные в инструкциях к наборам реагентов, были дополнены установлением оптимальной концентрации аллергенов, что достигнуто при их разведении 1:25. На аналитическом этапе был модифицирован протокол цитометрического анализа. Введение дополнительной гистограммы CD203c против CD3 позволило с большей точностью определить популяцию активированных базофилов среди всех базофилов, что внесло вклад в минимизирование неизбежного субъективизма при оценке гистограмм. На постаналитическом этапе предложена комплексная интерпретация данных теста активации базофилов.

В работе продемонстрировано высокое клиническое значение и диагностическая информативность тестов с лекарственными и аэроаллергенами, определены показания к их применению, установлены пределы колебаний параметров, характерные для популяции.

Клиническая значимость выявления сенсibilизации к йодсодержащим рентгеноконтрастным веществам в тесте активации базофилов. По данным отечественных и зарубежных авторов (Матвеев А.В. и др., 2020, Kim Z. et al, 2016)

частота реакций немедленной гиперчувствительности на введение неионных йРКВ составляет около 2%. Несмотря на невысокую частоту реакций гиперчувствительности в популяции, у йРКВ есть выраженный потенциал для развития тяжелых реакций, они входят в список первых 5 фармакологических препаратов, вызывающих анафилактический шок при использовании (Матвеев А.В. и др., 2020). Выявление риска тяжелых реакций на йРКВ является актуальной задачей.

В нашем исследовании в группе сравнения сенсibilизации к йРКВ не выявлено. У пациентов с системными реакциями на введение йРКВ в анамнезе частота выявления сенсibilизации в тесте активации базофилов на препарат была в два раза выше, чем в группе больных с местными реакциями гиперчувствительности, $p < 0,01$ (табл.2). У пациентов с лекарственной гиперчувствительностью к фармакологическим препаратам, не содержащим йод, сенсibilизация *in vitro* на йРКВ встречалась достаточно редко (табл.2).

Таблица 2. Частота выявления сенсibilизация *in vitro* к йодсодержащим рентгеноконтрастным веществам в различных группах пациентов, N (%)

Местные реакции на йРКВ n=79	Системные реакции на йРКВ n=59	Лекарственная гиперчувствительность n=38	Значимость отличий
18 (22,7) *, **	26 (44,0) *, ***	2 (5,2) **, ***	*, **, *** $p < 0,01$ между группами

У пациентов с легкой степенью реакции *in vivo* на йРКВ сенсibilизация *in vitro* определена практически в 4 раза реже, чем при средней степени (13,5 и 51%, $p < 0,01$). Результаты исследования доказывают соответствие данных, получаемых лабораторно, и клинического состояния пациентов с гиперчувствительностью.

Чувствительность подтверждения имевшейся в анамнезе гиперчувствительности к йРКВ составила 86% - тест активации базофилов был положительным у 18 из 21 пациента. Чувствительность теста активации базофилов для прогнозирования риска развития реакций гиперчувствительности на планируемый к применению йРКВ была выше и составила 94%. Ни у одного пациента не было зафиксировано тяжелых и средней тяжести неблагоприятных реакций на рекомендованный при проведении лабораторного тестирования йРКВ. 3 из 124 обследованных пациентов (2,4%) предъявили впоследствии жалобы на легкие отсроченные неблагоприятные реакции при применении йРКВ, не вызвавших активации базофилов *in vitro*. В литературе описаны 2 случая подбора альтернативного контрастного вещества пациентам с неблагоприятными реакциями на йРКВ с помощью теста активации базофилов [Borras J. et al, 2019].

Специфичность теста активации базофилов составила 100%. Отрицательный результат данного теста на предполагаемый к введению йРКВ позволяет врачам, несмотря на отягощенный анамнез пациента, с уверенностью в безопасности провести необходимое исследование *in vivo* с выбранным препаратом, что будет способствовать корректной диагностике основного заболевания.

Клиническая значимость выявления сенсibilизации к аллергенам клещей домашней пыли в тесте активации базофилов. Одними из самых

распространенных аллергенов в мире являются клещи домашней пыли (Коровкина Е.С., Мокроносова М.А., 2012). Диагностика аллергических заболеваний осложняется тем, что многие аэроаллергены вызывают схожие клинические симптомы ринита, конъюнктивита, дерматита, что делает выявление причинно-значимого аллергена крайне важной задачей, которую сложно решить без привлечения данных подтверждающих тестов *in vivo* и *in vitro*.

В группе сравнения в нашем исследовании у 1 человека (2,9%) с отсутствием клинических проявлений аллергии индекс активации базофилов к клещам домашней пыли был повышен, что может свидетельствовать о латентной сенсibilизации. Специфичность метода составила 96%. Частота выявления сенсibilизации в тесте активации базофилов как минимум к 1-му аллергену пылевых клещей у пациентов с бытовой сенсibilизацией была подтверждена у 59 человек, чувствительность метода составила 87%, что соответствует данным ряда авторов (Gomes H.A.C. et al., 2013, Ogulur I. et al., 2017). У всех 10 пациентов с положительными кожными тестами на *D. pteronissinus* сенсibilизация к этому аллергену была подтверждена и в тесте активации базофилов. Значимой корреляции между интенсивностью кожной реакции на аллерген и индексом активации базофилов *in vitro* не наблюдалось.

На рис. 4 сопоставлены данные выявления сенсibilизации к клещам домашней пыли в группе пациентов с бытовой (а) и полисенсibilизацией (б), полученные двумя методами – в тесте активации базофилов и при определении sIgE. Совпадения результатов наблюдались в 42-69% случаев – в 36-40% результаты были положительными, в 6-29% - отрицательными. Практически в половине случаев (52%) при бытовой сенсibilизации и в 29% при полисенсibilизации подтвердить аллерген можно было только в тесте активации базофилов. Выявлена значимая разница ($p<0,01$) между частотами подтверждения сенсibilизации в тесте активации базофилов и при оценке специфических IgE. При этом определена прямая зависимость между результатами теста активации базофилов и уровнем sIgE ($R=0,47$, $p<0,05$, *D. pteronissinus*, $R=0,54$, $p<0,05$, *D. farina*).

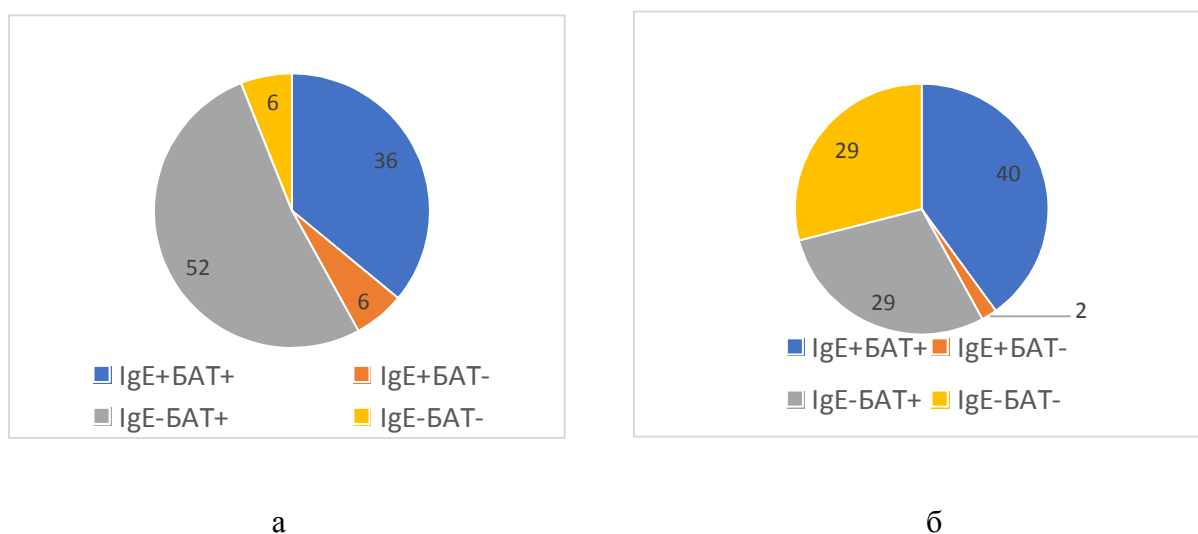


Рис.4 Сопоставление данных подтверждения сенсibilизации к клещам домашней пыли с использованием теста активации базофилов и определения специфических IgE в группе пациентов с бытовой сенсibilизацией (а) и полисенсibilизацией (б). БАТ – тест активации базофилов, IgE – специфические иммуноглобулины E к клещам домашней пыли.

При проведении исследования было выявлено неблагоприятное влияние приема ГКС на возможность подтверждения сенсibilизации к пылевым клещам - в группе пациентов с бытовой сенсibilизацией, не применяющих эти препараты, частота подтверждения была значимо выше, чем в другой группе (93% и 76%). Влияние ГКС на чувствительность метода была ранее продемонстрирована в экспериментальных работах (Sturm G.J. et al., 2009). Прием блокаторов H1-гистаминовых рецепторов подобного влияния не оказывал, что свидетельствовало об отсутствии необходимости отмены этих препаратов для получения корректного результата теста.

Сопоставление результатов оценки наличия сенсibilизации к аллергенам *D.pteronissinus* и *D.farinae* в тесте активации базофилов *in vitro* двумя наборами реактивов. При сравнении двух наборов для проведения теста активации базофилов, использующих разные маркеры для идентификации и оценки активации базофилов, выявлена высокая статистически значимая корреляционная зависимость между результатами, полученными с использованием Allergenicity kit и BD FastImmune ($R=0,71$ и $0,78$, $p<0,05$). Это свидетельствует о корректных методологических подходах, примененных при разработке теста активации базофилов, независимо от частных методических особенностей вариантов тест-систем.

АСИТ-терапия. В нашем исследовании 100 пациентов после лабораторного обследования и подтверждения причинно-значимого аллергена были направлены на проведение аллергенспецифической иммунотерапии с аллергенами клещей домашней пыли. В половине случаев положительный результат оценки сенсibilизации в тесте активации базофилов был единственным лабораторным биомаркером, подтверждающим анамнестические данные для направления пациента на АСИТ, специфические IgE были менее 0,1 МЕ/мл. В настоящее время 5 человек закончили полный курс терапии с высоким клиническим эффектом.

Использование в нашем исследовании клеточного анализа для лабораторной диагностики сенсibilизации к ингаляционным аллергенам позволило осуществить значительно более точное подтверждение причинно-значимого аллергена по сравнению с определением sIgE. Ввиду высокой клинической значимости теста активации базофилов в перспективе необходимо дополнить им спектр рекомендуемых методов для подтверждения сенсibilизации к ингаляционным аллергенам.

Включение в алгоритм интерпретации теста, помимо подтверждения сенсibilизации, дополнительных параметров (спонтанной, индуцированной анти-IgE антителами активации базофилов, определения Т-лимфоцитов 2-го типа) для комплексной оценки состояния пациента позволило применить персонифицированный подход к ведению пациентов с отягощенным аллергологическим анамнезом.

Оценка спонтанной активации базофилов. В целом в обеих группах пациентов по сравнению с волонтерами была значимо выше спонтанная активация базофилов – у пациентов с реакциями гиперчувствительности к йРКВ она составила 2,4% [1,2-3,7], у пациентов с риноконъюнктивальными симптомами аллергии - 2,0% [1,2-3,4], у условно здоровых волонтеров 1,4% [1,0-1,8], $p<0,05$. У пациентов наблюдалась выраженная гетерогенность этого показателя. Высокая спонтанная активация базофилов у пациентов, ее связь с уровнем специфических

иммуноглобулинов Е к клещам домашней пыли ($R=0,25$, $p<0,05$) и количеством эозинофилов в периферической крови ($R=0,31$, $p<0,05$) у пациентов с бытовой сенсibilизацией, а также с тяжестью заболевания при изолированном аллергическом рините (1,8% [1,1-2,8] и 2,6% [1,0-5,8], $p<0,05$) подтвердили тот факт, что этот параметр может характеризовать выраженность аллергического воспаления. Симптоматическая терапия блокаторами H1-гистаминовых рецепторов не влияла на этот параметр. Снижение спонтанной активации базофилов на фоне приема глюкокортикостероидных препаратов отражало купирование воспаления при корректной терапии. Повышение спонтанной активации базофилов при значительной эозинофилии свидетельствовало о совместном поддержании аллергического воспаления несколькими популяциями клеток. Высокая спонтанная активация базофилов является неблагоприятным фоном для развития реакций гиперчувствительности.

Оценка индуцированной анти-IgE антителами активации базофилов. При проведении исследования было выявлено, что средние значения индуцированной анти-IgE антителами активации базофилов в группе сравнения 68,5% [53-81] были значимо выше, чем у пациентов с реакциями лекарственной гиперчувствительности 61,0% [36-74], $p<0,05$ и риноконъюнктивальными симптомами 46,6% [24-72], $p<0,01$. У пациентов наблюдалась выраженная гетерогенность этого показателя, причины снижения индуцированной анти-IgE антителами активации базофилов могли быть различны.

Снижение индуцированной анти-IgE антителами активации базофилов у пациентов с симптомами респираторной аллергии во многом было обусловлено использованием иммуносупрессивных препаратов, особенно при системном применении. Этот показатель составил 8,0% [5-11] у пациентов на системной терапии ГКС, 35,2% [16-66] у больных с применением местных форм этих препаратов, 53,9% [31-75] в группе без терапии, $p<0,0001$ у всех групп в отношении группы сравнения - 68,5% [53-81] и $p<0,05$ между группами пациентов. Снижение активации базофилов на анти-IgE антитела в эксперименте при культивировании клеток с высокими дозами преднизолона было показано G.J Sturm с соавт. (2009). Н. Hertmann с соавт. (2012) установили, что одним из механизмов действия ГКС является уменьшение активации базофилов и снижение экспрессии маркера дегрануляции CD63 и, менее эффективно, рецептора CD203c в случае перекрестного связывания аллергена с комплексом IgE/FcεRI.

У части пациентов крайне низкие значения (менее 16%) индуцированной анти-IgE антителами активации базофилов были выявлены и вне связи с приемом ГКС. В нашем исследовании установлено, что в 83% случаев среди пациентов с риноконъюнктивальными симптомами снижение данного параметра было обусловлено острым воспалительным процессом в респираторном, желудочно-кишечном или урогенитальном трактах. Острота инфекционного процесса была подтверждена лабораторными методами – у пациентов был отмечен лейкоцитоз, повышение скорости оседания эритроцитов и/или увеличение концентрации С-реактивного белка в сыворотке крови.

В результате системного инфекционного процесса в организме присутствует большое количество апоптотических клеток, также воспаление сопровождается увеличением в сыворотке крови количества иммунных комплексов, содержащих IgG.

Таким образом, острый инфекционный процесс через два ингибиторных рецептора, экспрессированных на базофилах – CD300a (его лигандом является фосфотидилсерин апоптотических клеток) и FcγRIIB – низкоаффинный рецептор к IgG – может влиять на выраженность ответа базофильных гранулоцитов на позитивный контроль (антитела к комплексу IgE/FcεR1) при проведении теста активации базофилов *in vitro*. Практически важно, что выраженное снижение активации базофилов на анти-IgE антитела при остром воспалении в тесте активации базофилов характерно только для пациентов с неблагоприятным аллергологическим фоном, у которых наблюдается гиперактивация базофилов *in vivo*. Нами обследовано 10 человек со спокойным аллергоанамнезом на фоне острой инфекции, что также было подтверждено лабораторными методами. Индуцированная активация базофилов на анти-IgE антитела в этой группе составила 58,3% [37-69], что было сопоставимо с этим параметром в группе сравнения - 68,5% [53-81]. Вероятно, у людей со спокойным аллергоанамнезом не происходит включения сигналов ингибиторных рецепторов, как это описано у пациентов с аллергопатологией, у которых экспрессия CD300a на базофилах человека быстро повышается в ответ на перекрестное связывание IgE/FcεRI (Sabato V. et al., 2014).

Гиперактивация базофилов *in vivo* у пациентов с IgE-зависимыми аллергическими реакциями обусловлена высокой концентрацией IgE в сыворотке крови, что способствует увеличению плотности поверхностной экспрессии высокоаффинного рецептора к IgE на базофилах (Sihra B.S. et al, 1997). В нашем исследовании была выявлена отрицательная корреляционная зависимость между количеством IgE на мембране клеток и уровнем активации базофилов на поликлональные антитела к комплексу IgE/FcεR1 в тесте *in vitro* у пациентов с поллинозом ($R=-0,69$, $p<0,0001$). Следовательно, гиперактивации базофилов *in vivo* уменьшает возможность индуцировать анти-IgE антителами активацию клеток *in vitro*. По нашему мнению, именно гиперактивация базофилов *in vivo* обуславливает снижение индуцированной активации *in vitro* на анти-IgE антитела по сравнению с волонтерами у пациентов с гиперчувствительностью даже в отсутствии иммуносупрессивной терапии и острого воспалительного процесса. Доказательством этого служит факт, что у половины пациентов с риноконъюнктивальными симптомами и низкими (менее 16%) значениями количества активированных базофилов в ответ на анти-IgE антитела наблюдалась высокая (более 3%) спонтанная активация этих клеток. В этой группе пациентов наблюдалась статистически значимая отрицательная корреляционная зависимость между спонтанной и индуцированной антителами к IgE активацией *in vitro* ($R=-0,16$, $p<0,05$). Дополнительным возможным механизмом снижения вплоть до полного отсутствия активации базофилов на анти-IgE антитела являются генетические особенности нарушения проведения сигнала от комплекса FcεRI-IgE с участием тирозинкиназы Syk (Patil S.U., Shreffler W.G., 2012). Возможны и другие, на данный момент неизвестные факторы, влияющие на данный параметр.

Выраженное снижение активации базофилов на анти-IgE антитела должно рассматриваться в комплексной оценке результатов теста активации базофилов как отягчающий фактор при наблюдении и лечении пациентов с отягощенным аллергоанамнезом. потому что свидетельствует не только о супрессии на фоне лечения глюкокортикостероидными препаратами, но и о наличии выраженного

воспаления как аллергической, так и инфекционной природы.

T-лимфоциты 2-го типа иммунного ответа FSlowSSlowCD3⁺CD294⁺ и их роль в развитии аллергического воспаления. В периферической крови основной осью с противоположными задачами являются T1/T2 клетки – T-лимфоциты 1-го и 2-го типов иммунного ответа, включающих как хелперные 1 и 2 (Th1 и Th2), так и цитотоксические 1 и 2 (Tc1 и Tc2) клетки. Исторически гуморальный тип иммунного ответа рассматривался как защитный от гельминтов и токсинов, а также способствующий развитию аллергического воспаления (Lloyd C.M., Snelgrove R.J., 2018). В настоящее время высказано мнение (Gause W.C. et al, 2020), что 2-й тип иммунного ответа, помимо участия в поддержании аллергических реакций, осуществляет контроль хронических воспалительных заболеваний, метаболического гомеостаза, репарации, фиброобразования тканей и др. Маркерами T-клеток 2-го типа иммунного ответа являются молекулы CCR4 и новая молекула CRTH2 (CD294, chemoattractant receptor-homologous molecule expressed on T-helper cells 2) – молекула, гомологичная хемоаттрактантному рецептору, которая экспрессирована в лимфоидной популяции преимущественно на T-клетках-хелперах 2-го типа иммунного ответа, а также на базофилах, эозинофилах, тучных клетках (Rudulier C.D. et al., 2019 Watanabe S. et al., 2020).

В проведенном исследовании у пациентов выявлена высокая гетерогенность относительного количества T-лимфоцитов 2-го типа иммунного ответа FSlowSSlowCD3⁺CD294⁺, показатель мог быть в пределах референтного интервала (0,3-1,5%), умеренно (1,6-3,6%) и значительно (3,6% и более) повышен. У пациентов с лекарственной гиперчувствительностью по сравнению с больными с риноконъюнктивальными симптомами и сенсибилизацией к ингаляционным аллергенам в 2 раза чаще были выявлены крайне высокие значения T-лимфоцитов 2-го типа иммунного ответа, в 1,5 раза чаще этот параметр был умеренно повышенным, различия статистически значимы при попарном сравнении групп (табл.3).

Табл.3. Частота выявления пациентов с нормальным, повышенным и крайне высоким относительным количеством T-лимфоцитов 2-го типа иммунного ответа в разных группах пациентов, N (%)

FSlowSSlowCD3 ⁺ CD294 ⁺ %	Референтный интервал %	Сенсибилизация к ингаляционным аллергенам n=248	Лекарственная гиперчувстви- тельность n=184	Значимость различий
Нормальное количество 0,3-1,5	0,3-1,5	168 (68)	90 (49)	p<0,001
Повышенное количество 1,6-3,6		66 (27)	75 (41)	p<0,01
Крайне высокое количество более 3,6		14 (5)	19 (10)	p<0,05

При анализе данных выявлено, что относительное количество T-лимфоцитов

2-го типа иммунного ответа было приблизительно в 1,5 раза выше в группах пациентов по отношению к группе сравнения и составило 1,2% [0,8-1,8] (больные с риноконъюнктивальными симптомами) и 1,6% [1,0-2,4] (пациенты с лекарственной гиперчувствительностью) против 1,0% [0,6-1,3], $p < 0,001$. Клиническими проявлениями лекарственной гиперчувствительности были, в основном, дерматиты с папулезными и эритематозными элементами, крапивница, отеки слизистых. У больных с риноконъюнктивальными симптомами можно было выделить отдельную группу пациентов с дополнительным поражением кожного покрова, в этой группе было выявлено максимальное относительное количество Т-клеток 2-го типа - 2,0% [1,4-2,7], что значимо отличалось от результатов у пациентов с ринитом и астмой без кожных проявлений.

В результате исследования определен фенотип популяции Т-лимфоцитов 2-го типа - $CD45RA^-CD3^+CD294^+CD2^+CD5^+CD7^+CD27^+CD28^+CD57^-CCR7^-$. Молекулы CD2, CD5, CD28 были экспрессированы на 100% клеток $CD3^+CD294^+$, маркеры CD27 и CD7 на 60-85%. Отсутствие экспрессии CD45RA и CCR7 позволяет классифицировать эту популяцию как клетки эффекторной памяти (De Biasi S. et al., 2020), а согласно расширенной классификации D. Mathew с соавт., (2020), это клетки эффекторной памяти 1-го типа EM1 с фенотипом $CD45RA^-CD27^+CCR7^-$. В отличие от клеток центральной памяти с фенотипом $CD45RA^-CD27^+CCR7^+$, клетки эффекторной памяти активно пролиферируют и секретируют цитокины в ответ на антигенную стимуляцию.

В результате исследования впервые показано, что у пациентов с реакциями гиперчувствительности выраженное увеличение (более 3,6% от лимфоцитов) популяции Т-лимфоцитов 2-го типа $FSlowSSlowCD3^+CD294^+$ происходило за счет роста субпопуляции Т-цитотоксических лимфоцитов 2 $FSlowSSlowCD8^+CD294^+$, а не Т-хелперов 2 $FSlowSSlowCD4^+CD294^+$ - 5,7% [3,6-8,4] и 2,0% [1,4-2,5], $p < 0,000001$, рис.5. Соотношение Th2 к Tc2 у пациентов с умеренным повышением Т-лимфоцитов 2-го типа составило 2,8. В другой группе этот параметр был практически в 10 раз меньше - 0,29. Значительное повышение в периферической крови популяции $FSlowSSlowCD3^+CD294^+$ за счет $FSlowSSlowCD3^+CD8^+CD294^+$ сопровождалось выраженным повреждением кожных покровов.

У пациентов и с повышенным (преимущественно Th2) и с крайне высоким (преимущественно Tc2) количеством Т-лимфоцитов 2-го типа иммунного ответа выявлено увеличение спонтанной продукции интерлейкина 4 - 4,0 пг/мл [3,0-7,0] и 4,0 пк/мл [1,0-7,0], превышающее в два раза верхнюю границу референтного интервала, что доказывало возможность синтеза интерлейкина 4 как Т-хелперными, так и Т-цитотоксическими лимфоцитами в случае принадлежности их к T2 типу иммунного ответа. Интерлейкин 4 является ведущим цитокином 2-го типа иммунного ответа, его синтезируют базофилы и Т-лимфоциты 2-го типа (Симбирцев А.С., 2021). Одной из его функций является стимуляция дифференцировки наивных Т-лимфоцитов в Т-хелперы 2-го типа, а согласно нашим данным, и в Т-цитотоксические лимфоциты 2-го типа иммунного ответа.

О подавлении активности клеток 1-го типа иммунного ответа при высоком содержании лимфоцитов 2-го типа свидетельствовала обратная корреляционная зависимость между количеством $FSlowSSlowCD3^+CD294^+$ клеток и содержанием в сыворотке интерферона γ ($R = -0,53$) и индуцированной продукцией этого главного

цитокина 1-го типа иммунного ответа ($R=-0,38$) у пациентов с повышенным и крайне высоким количеством Т-клеток 2-го типа.

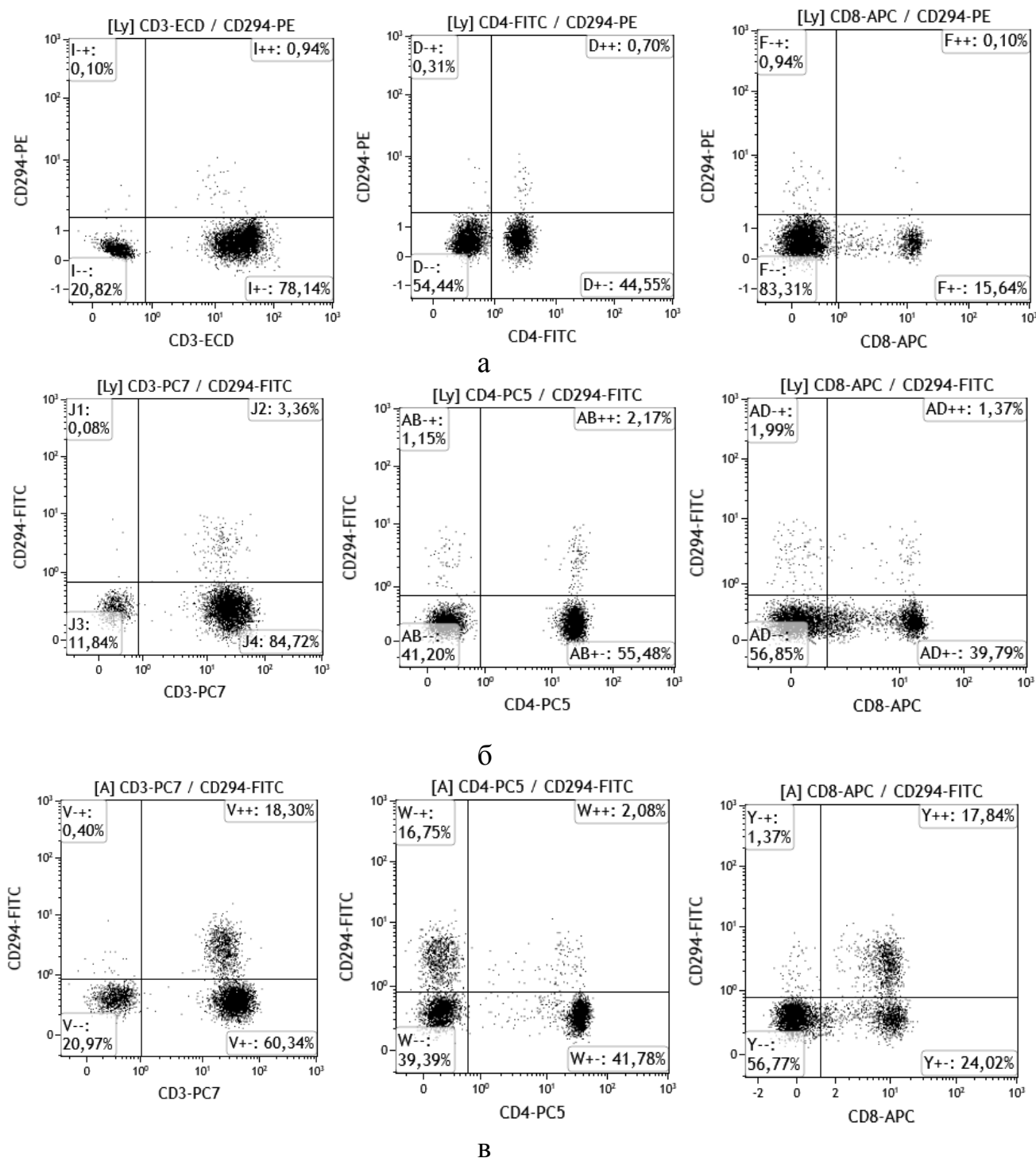


Рис.5. Гистограммы пациентов с нормальным (а), умеренно повышенным (б) и крайне высоким (в) количеством Т-клеток 2-го типа $FSlowSSlowCD3^+CD294^+$.

Опираясь на наши данные, можно утверждать, что значительное увеличение в циркуляции количества клеток $FSlowSSlowCD3^+CD294^+$, являющихся эффекторными клетками памяти, служит лабораторным биомаркером для прогнозирования возможных кожных реакций гиперчувствительности. Высокое относительное

количество Тс2 в периферической крови отражало присоединение клеточных механизмов повреждения тканей с участием замедленных реакций гиперчувствительности IV типа, в которых Т-цитотоксические лимфоциты являются основными клетками-эффекторами.

В нашем исследовании была выявлена прямая корреляционная зависимость между относительным количеством FSlowSSlowCD3⁺CD294⁺ и эозинофилов (R=0,4, p<0,05) у пациентов с бронхиальной астмой. Эти данные доказывают совместное участие различных популяций лейкоцитов в поддержании аллергического воспаления. Негативная роль выраженного увеличения популяции Тс2 при бронхиальной астме подтверждается тем, что эти клетки являются более стероидрезистентными, чем Th2 (Hinks T.S.C. et al., 2019).

В литературе есть данные о возможности индукции Т-лимфоцитами 2 синтеза IgE плазматическими клетками (Haase P., Voehringer D., 2021). В наших ранних работах была найдена прямая корреляция между количеством FSlowSSlowCD3⁺CD294⁺ клеток и уровнем общего иммуноглобулина Е у пациентов с рассеянным склерозом (Бычкова Н.В. и др., 2011), атопическим дерматитом и спонтанной крапивницей (Бычкова Н.В. и др., 2017).

Таким образом, можно определить несколько механизмов, с помощью которых Т-лимфоциты 2 с фенотипом FSlowSSlowCD3⁺CD294⁺ участвуют в усилении аллергического воспаления. Эти клетки способны к значительной продукции цитокинов 2-го типа, а именно интерлейкинов 4, 5, 13, способствующих воспалительной реакции. Они поддерживают аллергическое воспаление, стимулируя дифференцировку Т-лимфоцитов 2-го типа, продукцию IgE плазматическими, гиперсекрецию слизи и гиперреактивность дыхательных путей. Лимфоциты FSlowSSlowCD3⁺CD294⁺ опосредуют рост, дифференцировку, миграцию базофилов и эозинофилов, а также активацию тучных клеток в тканях. И, наконец, показано их участие, особенно лимфоцитов с фенотипом цитотоксических Т-лимфоцитов 2, в развитии кожных аллергических реакций. В тесте активации лимфоцитов *in vitro* с гранулизином описано выявление цитотоксических Т-клеток памяти со специфическим к лекарству Т-клеточным рецептором у пациентов с тяжелыми побочными реакциями, затрагивающими кожу по механизму замедленной гиперчувствительности, на ароматические противоэпилептические препараты (Chu M.T. et al., 2021). Впервые обнаруженная нами экспрессия костимулирующей молекулы CD28 на всей популяции FSlowSSlowCD3⁺CD294⁺ подтверждает их статус эффекторных клеток. Эта молекула обеспечивает усиление сигнала Т-клеточного рецептора в случае распознавания антигена/аллергена, что приводит к возрастанию цитотоксического потенциала CD28⁺ клеток, как показано в эксперименте (Timalsena S. et al, 2017).

Следовательно, при обоих типах реакций – немедленного и замедленного типов – Т-лимфоциты 2 с фенотипом FSlowSSlowCD3⁺CD294⁺ являются одними из центральных звеньев патогенеза аллергического воспаления и, следовательно, их оценка при лабораторном тестировании имеет клиническое значение. Определение этого параметра необходимо для выявления выраженности сдвига иммунного ответа у пациентов в сторону 2-го типа и интенсивности реакций гиперчувствительности, в том числе замедленного типа, что будет влиять на тактику ведения пациента.

Выявленное в нашей работе увеличение в периферической крови пациентов с

реакциями гиперчувствительности количества Т-лимфоцитов с экспрессией CD294 свидетельствовало в целом о выраженной поляризации иммунного ответа в сторону 2-го типа.

Персонафицированная оценка параметров теста активации базофилов.

Невысокие значения чувствительности и специфичности при разделении групп пациентов и условно здоровых лиц с использованием ROC-анализа для таких параметров, как спонтанная и индуцированная анти-IgE антителами активация базофилов и относительное количество Т-лимфоцитов 2-го типа свидетельствовали о высокой гетерогенности этих показателей у пациентов. Определяющими могут быть индивидуальные особенности организма пациента, наличие недавней анафилактической реакции и проведенная терапия. Поэтому персонафицированная оценка всех параметров теста активации базофилов, их точная интерпретация позволит более корректно подойти к определению состояния каждого пациента в данный момент, а выявление при лабораторном обследовании выраженных отклонений показателей от средних значений здоровой популяции должно влиять на тактику ведения пациента.

Комплексная оценка результатов теста активации базофилов в сжатом виде изложена в табл.4.

Таблица 4. Комплексная оценка результатов теста активации базофилов

Результат теста	Интерпретация данных
Индекс активации базофилов на исследуемый аллерген превышает пороговое значение	Подтверждает наличие сенсibilизации к данному аллергену
Высокая спонтанная активация базофилов	Свидетельствует о выраженности аллергического воспаления
Низкая активация на анти-IgE антитела	Может наблюдаться при - приеме системных или местных глюкокортикостероидных препаратов - выраженном аллергическом или инфекционном воспалении у пациентов с отягощенным аллергоанамнезом - генетических особенностях проведения сигнала с участием тирозинкиназы <i>Syk</i>
Высокое относительное количество Т-клеток 2-го типа	Подтверждает доминирующий 2-ой тип иммунного ответа Характеризует интенсивность немедленных и замедленных реакций гиперчувствительности Часто наблюдается при ангиоотеках и выраженных кожных проявлениях гиперчувствительности

Таким образом, в диссертационном исследовании была обоснована клинико-диагностическая значимость проточной цитометрии для оценки функциональной активности клеток иммунной системы в норме, при обследовании пациентов с иммунозависимыми заболеваниями и в эксперименте, разработаны методологические основы оценки функционального состояния клеток иммунной системы в многоцветном цитометрическом анализе, а значит, была достигнута цель

исследования. Применение оценки функциональной активности лимфоцитов и базофилов с использованием метода проточной цитометрии позволило оптимизировать клиничко-лабораторную диагностику пациентов с вторичными иммунодефицитными состояниями, аллергическими и аутоиммунными заболеваниями с целью коррекции терапии. Высокая диагностическая значимость и эффективность разработанного метода оценки пролиферативной активности лимфоцитов и оптимизированного теста активации базофилов обеспечили широкое внедрение этих тестов в клиническую практику ряда иммунологических лабораторий нашей страны и ближнего зарубежья.

ВЫВОДЫ

1. Разработанный и валидированный относительно стандартного радиобиологического теста метод определения пролиферативной активности клеток с помощью оценки жизненного цикла технологией проточной цитометрии обладает преимуществами для использования в лабораторной практике – он коррелирует с клинической картиной, сопоставим со стандартным радиобиологическим методом и экологически безопасен.

2. Высокой значимостью для прогноза течения заболевания обладают лабораторные биомаркеры, отражающие уровень пролиферации лимфоцитов на Т-клеточный митоген для пациентов с вторичной иммунной недостаточностью в результате травмы (пороговое значение менее 10,4%) и индекс пролиферативной активности на аутоантиген для пациентов с рассеянным склерозом (пороговое значение более 1,0).

3. Анализ пролиферативной активности лимфоцитов методом проточной цитометрии – важный инструмент в экспериментальной иммунологии, который может быть использован как для оценки иммуотропных эффектов исследуемого вещества, так и для подтверждения отсутствия изменения функционального состояния лимфоцитов на химические и физические факторы.

4. Высокая диагностическая значимость оценки функциональной активности базофилов для определения сенсibilизации к йодсодержащим рентгеноконтрастным веществам заключается в возможности точного индивидуального подбора безопасного препарата, чувствительность метода составляет 94% при специфичности 100%.

5. Результаты определения функциональной активности базофилов для подтверждения сенсibilизации к клещам домашней пыли являются основанием для направления пациента на аллергенспецифическую иммунотерапию ввиду высокой чувствительности (87%, вне приема глюкокортикостероидов 93%), специфичности (96%) метода при отсутствии противопоказаний к проведению исследования.

6. У пациентов с отягощенным аллергоanamнезом спонтанная активация базофилов выше, а индуцированная антителами к комплексу IgE/FcεR1 ниже по сравнению с условно здоровыми лицами, что отражает функциональное состояние клеток и свидетельствует об интенсивности аллергического воспаления.

7. Высокое относительное количество Т-лимфоцитов с фенотипом FSlowSSlowCD3⁺CD294⁺ указывает на выраженность сдвига иммунного ответа в сторону 2-го типа и характеризует интенсивность немедленных и замедленных реакций гиперчувствительности.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Специалистам клинической лабораторной диагностики, аллергологам-иммунологам и врачам смежных специальностей

1. Рекомендуется внедрение в практику клинико-диагностических лабораторий многопрофильных стационаров и ЛПУ разработанного метода оценки пролиферации лимфоцитов с использованием технологии проточной цитометрии, что позволит заменить экологически небезопасный радиобиологический метод и включить в комплексную оценку иммунной системы определение функционального состояния клеток крови.

2. Модельную тест-систему для выявления антиген-специфических гормонорезистентных лимфоцитов *in vitro* рекомендуется использовать для лабораторного подтверждения причины неэффективности гормональной терапии с целью коррекции дальнейшего лечения больных бронхиальной астмой.

3. Определение сенсibilизации к йодсодержащим рентгеноконтрастным веществам в тесте активации базофилов рекомендуется назначать пациентам с отягощенным аллергологическим анамнезом для предотвращения тяжелых реакций гиперчувствительности при применении этих препаратов.

4. Метод оценки функциональной активности базофилов рекомендуется включить в комплексное обследование пациентов с ринитом и бронхиальной астмой для корректного выявления причинно-значимого аллергена.

5. Рекомендуется аллергологам-иммунологам осуществлять комплексную интерпретацию результатов оценки функциональной активности базофилов. Выявление высокой спонтанной активации базофилов, повышенного количества Т-лимфоцитов 2-го типа иммунного ответа и сниженной активации клеток на антигена к комплексу IgE/FcεR1 должны рассматриваться как неблагоприятные факторы состояния пациента, что повлияет на корректное терапевтическое ведение пациентов даже в случае отсутствия выявления сенсibilизации к исследованным аллергенам.

6. Для получения результатов с наибольшей чувствительностью определения сенсibilизации рекомендуется направлять пациентов на исследование функциональной активности базофилов до назначения иммуносупрессивной терапии.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Полученные на большом клиническом материале результаты исследования определили значимость применения оценки функционального состояния лимфоцитов и базофилов методом проточной цитометрии в клинико-лабораторной диагностике. Доказанная клинико-диагностическая значимость и эффективность функциональных тестов с помощью данной технологии диктуют необходимость их включения в обследование пациентов с иммунозависимыми заболеваниями.

Наиболее важным является дальнейшее внедрение определения предложенных тестов оценки пролиферации лимфоцитов и активации базофилов, продемонстрировавших высокие показатели клинико-лабораторной информативности, в практику иммунологических лабораторий многопрофильных стационаров. В дальнейшем на основании предложенных в работе методологических подходов у пациентов с другими аллергическими, аутоиммунными и иммунодефицитными заболеваниями возможно использование результатов тестов в целях клинико-лабораторной диагностики.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в научных изданиях, входящих в перечень рецензируемых научных изданий, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ, а также международных базах данных, для опубликования основных научных результатов диссертации по специальности 3.3.8. Клиническая лабораторная диагностика (биологические науки), патенты

1. Калашникова А.А. Выявление антиген-специфических гормонорезистентных лимфоцитов крови для прогнозирования эффективности глюкокортикоидной терапии бронхиальной астмы / Калашникова А.А., Бычкова Н.В., Давыдова Н.И., Жданова М.В., Евлоева М.К., Новик Г.А. // Медицинская иммунология. – 2011. – Т.13. – №2-3. – С.157-166.
2. Жеваго Н.А. Эффективность полихроматического видимого и инфракрасного излучения в послеоперационной иммунореабилитации больных раком молочной железы / Жеваго Н.А., Самойлова К.А., Давыдова Н.И., Бычкова Н.В., Глазанова Т.В., Чубукина Ж.В., Буйнякова А.И., Зимин А.А. // Вопросы курортологии, физиотерапии и лечебной физической культуры. – 2012. – №4. – С.23-32.
3. Синельникова Н.А. Особенности иммунного ответа и активации базофилов у детей с хронической крапивницей / Синельникова Н.А., Бычкова Н.В., Калинина Н.М. // Медицинская иммунология. – 2015. – Т.17. – №1. – С.39-46.
4. Калинина Н.М. Клинические и лабораторные показатели при хронической крапивнице у детей и взрослых / Калинина Н.М., Синельникова Н.А., Бычкова Н.В. // Российский иммунологический журнал. – 2016. – Т. 10(19). – №2(1). – С.321-323.
5. Козлова Я.И. Тест активации базофилов в диагностике аллергического бронхолегочного аспергиллеза / Козлова Я.И., Учеваткина А.Е., Бычкова Н.В., Филиппова Л.В., Аак О.В., Пятакова А.В., Фролова Е.В., Давыдова Н.И., Клишко Н.Н. // Проблемы медицинской микологии. – 2016. – Т.18. – №3. – С.7-11.
6. Новик Г.А. Открытое проспективное контролируемое пострегистрационное исследование эффективности и безопасности длительного применения аминокислотной смеси у детей первого года жизни с аллергией к белкам коровьего молока / Новик Г.А., Халева Е.Г., Жданова М.В., Бычкова Н.В. // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2016. – Т.71. – №6. – С.446-457.
7. Zhevago N.A., Polychromatic light (480-3400nm) similar to the terrestrial solar spectrum without its UV component in post-surgical immunorehabilitation of breast cancer patients / Zhevago N.A., Zimin A.A., Glazanova T.V., Davydova N.I., Bychkova N.V., Chubukina Z.V., Buinyakova A.I., Ballyuzek M.F., Samoilova K.A. // Journal of Photochemistry & Photobiology B: Biology. – 2017. – Vol.166. – P.44-51.
8. Бычкова Н.В. Увеличение Т-цитотоксических 2 лимфоцитов с фенотипом CD3⁺CD8⁺CD294⁺ у пациентов с тяжелыми кожными проявлениями лекарственной аллергии / Бычкова Н.В., Чиненова Л.В., Калинина Н.М. // Российский иммунологический журнал. – 2017. – Т.11(20). – №4. – С.687-689.
9. Синельникова Н.А. Предикторные факторы тяжести и длительности болезни у детей с хронической крапивницей / Синельникова Н.А., Калинина Н.М., Савенкова Н.Д., Бычкова Н.В. // Аллергология и иммунология в педиатрии. – 2018. – Т.53. – №2. – С.32-40.

10. Бычкова Н.В. Возможности лаборатории в диагностике лекарственной гиперчувствительности // Российский иммунологический журнал. – 2019. – Т.13. – №2-1. – С.180-182.
11. Kalmykova N.V. Percutaneous Exposures of volunteers to polychromatic light (480-3400 nm) trigger systemic mechanism of the human myeloma cells growth delay without any effect on bortezomib cytotoxicity *in vitro* / Kalmykova N.V., Shcherbanyuk A.V., Moiseev S.I., Bychkova N.V., Davidova N.I., Samoiloa K.A. // Laser Therapy. – 2019 – Vol.28(3). – P.164-170.
12. Бычкова Н.В. Активация базофилов: теоретические аспекты и применение в диагностике аллергических заболеваний / Бычкова Н.В. // Медицинская иммунология. – 2021. – Т.23. – №3. – С.481-494.
13. Бычкова Н.В., Клиническая значимость выявления сенсibilизации к йодсодержащим рентгеноконтрастным веществам в тесте активации базофилов методом проточной цитометрии / Бычкова Н.В., Селиванов П.А., Калинина Н.М. // Клиническая лабораторная диагностика. – 2021. – Т.66. – №12. – С.747-754.
14. Бычкова Н.В. Лекарственная гиперчувствительность. Механизмы формирования и возможности лабораторной диагностики / Бычкова Н.В. // Медицинская иммунология. – 2022. – Т.24. – №2. – С.239-250.
15. Бычкова Н.В. CD3⁺CD294⁺ Т-лимфоциты 2-го типа иммунного ответа и их роль в развитии аллергического воспаления / Бычкова Н.В. // Медицинская иммунология. – 2022. – Т.24. – №5. – С.1089 -1097.
16. Бычкова Н.В. Клиническая значимость выявления сенсibilизации к аллергенам клещей домашней пыли в тесте активации базофилов методом проточной цитометрии / Бычкова Н.В., Крутикова И.В., Чернышова А.В., Калинина Н.М. // Медицинская иммунология. – 2022. – Т.24. – №6. – С.1347 -1354.

Патенты

17. Патент на изобретение № RU 2 731 905 С1. Способ прогнозирования эффективности Омализумаба при лечении бронхиальной астмы у детей / Новик Г.А., Бычкова Н.В., Харченко А.Н. Официальный бюллетень Федеральной службы по интеллектуальной собственности № 25 – 2020. - 09.09.2020.

Статьи в научных изданиях, входящих в перечень рецензируемых научных изданий, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ, а также международных базах данных, для опубликования основных научных результатов диссертации по другим специальностям

18. Лабис В.В. Базофильный тест в практической медицине / Лабис В.В., Базикян Э.А., Сизова С.В., Железный В.В., Бычкова Н.В., Козлов И.Г. // Практическая медицина. – 2019. – №1. – С.76-79.
19. Бычкова Н.В. Оптимизация концентрации аллергенов для использования в тесте активации базофилов / Бычкова Н.В., Учеваткина А.Е., Козлова Я.И., Фролова Е.В., Новик Г.А., Калинина Н.М. // Российский медицинский журнал – 2019. – Т.3. – С.32-35.
20. Бычкова Н.В. Изучение иммуотропных эффектов флавонового гликозида эмбинина методом проточной цитометрии / Бычкова Н.В., Калашникова А.А., Уэйли А.К., Лужанин В.Г., Калинина Н.М., Шустов Е.Б., Оковитый С.В. // Профилактическая и клиническая медицина. – 2019 – №4(73). – С.77-82.

21. Щербанюк А.В. Клетки миеломной линии RPMI8226 и нормальные клетки человека имеют разную чувствительность к наночастицам бисиликата серебра *in vitro* / Щербанюк А.В., Моисеев С.И., Бычкова Н.В., Германов Н.А., Голяндин С.Н., Улин В.П., Улин Н.В., Калмыкова Н.В. // Вопросы онкологии. – 2021. – Т.67. – №5. – С.724-731.

Монографии, учебно-методические пособия

22. Бычкова Н.В. Анализ содержания ДНК методом проточной цитометрии. Возможности применения в клинической практике. Монография. / Бычкова Н.В. // Тверь: изд. ООО «Триада», 2015. – 103 с.

23. Бычкова Н.В. Диагностика гиперчувствительности методом проточной цитометрии (учебно-методическое пособие, рекомендовано к печати Федерацией лабораторной медицины) / Бычкова Н.В., Калинина Н.М., Давыдова Н.И., Васякина Л.И., Калашникова А.А., Чиненова Л.В. // СПб:ИПЦ «Измайловский», 2022 - 91с.

24. Пронкина Н.В. Проточная цитометрия (практическое пособие) / Пронкина Н.В., Шишкова И.В., Труфакина Е.В., Гайковая Л.Б., Лобанова О.А., Матущенко А.И., Кухарчик Г.А., Ермаков А.И., Дмитриева В.П., Бычкова Н.В. и др. // Акцион Медицина МЦФЭР <https://www.book.zdrav.ru>. – 46с.

Статьи, тезисы докладов и статей в научных журналах и сборниках материалов конференций

25. Бычкова Н.В. Метод проточной ДНК-цитометрии в оценке функциональной активности иммунокомпетентных клеток / Бычкова Н.В., Давыдова Н.И., Дмитриева И.Б., Калинина Н.М. // Медицинская иммунология. – 2004. –Т.6. – №3-5. – С.397.

26. Калашникова А.А. Определение специфических иммунологических маркеров демиелинизирующего процесса у пациентов с рассеянным склерозом и рассеянным энцефаломиелитом / Калашникова А.А., Давыдова Н.И., Бычкова Н.В., Бисага Г.Н. // Медицинская иммунология. – 2004. – Т.6. – №3-5. – С.287.

27. Бычкова Н.В. Оценка функциональной активности иммунокомпетентных клеток методом ДНК-цитометрии / Бычкова Н.В., Вологжанин Д.А., Дмитриева И.Б., Калинина Н.М., Давыдова Н.И. // Russian Journal of Immunology – 2004. – Vol.9 (S1). – P.87.

28. Вологжанин Д.А. Функциональная активность лимфоцитов и соотношение С18:2/С18:3 свободных жирных кислот в сыворотке крови при тяжелой механической травме / Вологжанин Д.А., Калинина Н.М., Губанов А.И., Кузин А.А., Бычкова Н.В., Князев П.С. // Russian Journal of Immunology – 2004. – Vol.9 (S1). – P.217.

29. Бычкова Н.В. Оценка пролиферативной активности иммунокомпетентных клеток методом проточной ДНК-цитометрии / Бычкова Н.В., Давыдова Н.И., Вологжанин Д.А., Бисага Г.Н. // Российский иммунологический журнал – 2008. –Т.2(11). – №2-3 – С.118-119.

30. Бычкова Н.В. Оценка активации базофилов *in vitro* с помощью метода проточной цитометрии / Бычкова Н.В., Калашникова А.А., Давыдова Н.И., Вологжанин Д.А. // Российский аллергологический журнал. – 2009. - №3 – Вып. 1. – С.132.

31. Калашникова А.А. Изучение глюкокортикоидной резистентности лимфоцитов у детей с бронхиальной астмой / Калашникова А.А., Бычкова Н.В., Давыдова Н.И., Чиненова Л.В., Виноградова М.А., Новик Г.А., Калинина Н.М. // Сборник докладов и

- тезисов научно-практической конференции «Результаты научных исследований, проведенных в вузах Северо-западного федерального округа» – СПб, 2009. – С.31-32.
32. Bychkova N. Flow cytometric basophile activation test and specific immunoglobulin E in patients with atopic dermatitis / Bychkova N., Zaitseva Yu, Alhutova N., Davydova N., Novik G. // Book of Abstracts «International Mast Cell & Basophil Meeting» – Berlin, 2010. – P.31.
33. Бычкова Н.В. Изучение глюкокортикоидной резистентности лимфоцитов у детей с бронхиальной астмой / Бычкова Н.В., Калашникова А.А., Давыдова Н.И., Чиненова Л.В., Виноградова М.А., Новик Г.А., Калинина Н.М. // Сборник докладов и тезисов научно-практической конференции «Высокотехнологическая медицинская помощь в клинике педиатрической академии. Особенности ведения новорожденных» – СПб, 2010. – С.175-176.
34. Бычкова Н.В. Сенсibilизация к лекарственным препаратам, Т-хелперы 2 и иммуноглобулин Е у пациентов с рассеянным склерозом / Бычкова Н.В., Чиненова Л.В., Давыдова Н.И., Карпов М.И., Бисага Г.Н. // Медицинская иммунология – 2011. – Т.13. – №4-5. – С.362-363.
35. Бычкова Н.В. Анализ аллерген-индуцированной *in vitro* активации базофилов методом проточной цитометрии и специфических иммуноглобулинов Е у детей с атопическим дерматитом / Бычкова Н.В., Зайцева Ю., Алхутова Н.А., Давыдова Н.И., Новик Г.А., Калинина Н.М. // Сборник докладов и тезисов Международной научно-практической конференции «Многопрофильная клиника XXI века. Передовые медицинские технологии» – СПб, 2011 – С.30-31.
36. Khaleva E. The Basophil Activation Test in Children with Food Allergies / Khaleva E., Novik G., Bychkova N., Davydova N. // Tribuna Medica – 2013. – Vol.LXV(S1). – P.251.
37. Khaleva E. The Basophil Activation Test in Children with Food Allergies / Khaleva E., Bychkova N., Novik G., Davydova N., Zaiceva U. // Folia medica Cassoviensia – 2013. – Т.68 –№1 – P.59.
38. Khaleva E. The Basophil Activation Test in Children with Food Allergies / Khaleva E., Novik G., Bychkova N., Zaiceva U. // Book of Abstracts 24th European students' conference – 2013, Berlin. – P.308.
39. Новик Г.А. Новый метод диагностики пищевой аллергии / Новик Г.А., Халева Е.Г., Бычкова Н.В. // Сборник докладов и тезисов I Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Инновации в здоровье нации» – СПб., 2013. – С.56-57.
40. Бычкова Н.В. Диагностическая значимость теста активации базофилов для выявления сенсibilизации к йодсодержащим рентгеноконтрастным препаратам / Бычкова Н.В., Калашникова А.А., Давыдова Н.И., Калинина Н.М. // Сборник докладов и тезисов международной научно-практической конференции «Многопрофильная клиника XXI века. Высокотехнологичная медицинская помощь» – СПб., 2014. – С.40-42.
41. Халева Е. Г. Тест активации базофилов у детей с пищевой аллергией / Халева Е. Г., Новик Г. А., Бычкова Н.В. // Сборник докладов и тезисов XVII Конгресса педиатров России с международным участием "Актуальные проблемы педиатрии". – СПб, 2014. – С.356.
42. Khaleva E. Diagnostic value of basophil activation test in children with a food allergy / Khaleva E., Novik G., Bychkova N. // Allergy – 2014. – Vol.69(S99). – P.392.

43. Бычкова. Н.В. Возможности лабораторной диагностики аллергии на стоматологические материалы и местные анестетики / Бычкова. Н.В. // Сборник докладов и тезисов Международной научно-практической конференции, посвященной 55-летию основания стоматологического факультета ПСПбГМУ им. акад.И.И. Павлова «Фундаментальные и прикладные проблемы стоматологии». – СПб., 2014. – С.30-31.
44. Бычкова Н.В. Пролиферативная активность лимфоцитов пациентов с тяжелой сочетанной травмой / Бычкова Н.В., Калашникова А.А., Давыдова Н.И., Калинина Н.М. // Сборник докладов и тезисов международного научного форума «Многопрофильная клиника XXI века. Экстремальная медицина». – СПб., 2015. – С.65-66.
45. Khaleva E. Practical application of basophil activation test in children with food allergy / Khaleva E., Novik G., Bychkova N. // Abstracts 4th Pediatric Allergy and Asthma Meeting. – Berlin, 2015. – <http://www.eaaci-paam2015.com/PAAM2015-Abstracts/index.html> TP 38.
46. Khaleva E. IgE-mediated and non IgE-mediated mechanisms of food allergy in children / Khaleva E., Novik G., Bychkova N. // Allergy – 2015. – Vol.70(S101). – P.383.
47. Бычкова Н.В. Исследование функциональной активности лимфоцитов методом проточной цитометрии / Бычкова Н.В., Калашникова А.А., Давыдова Н.И., Калинина Н.М. // Медицинская иммунология. – 2015. – Т.17. – С.243-244.
48. Бычкова Н.В. Диагностика сенсibilизации к рентгеноконтрастным препаратам методом проточной цитометрии / Бычкова Н.В., Давыдова Н.И., Калинина Н.М. // Российский аллергологический журнал – 2016. – Т.2. – №3. – С.128-129.
49. Бычкова Н.В. Применение метода проточной цитометрии для диагностики аллергических заболеваний / Бычкова Н.В. // Справочник заведующего КДЛ. – 2016. – № 4. – С. 21-29.
50. Sinelnikova N.A. Characteristic of basophil activation in children with spontaneous and inducible chronic urticaria / Sinelnikova N.A., Savenkova N.D., Kalinina N.M., Bychkova N.V. // Allergy, asthma & immunophysiology: innovative technologies. Filodritto. – 2016. – P. 65-73.
51. Бычкова Н.В. Тест активации базофилов для диагностики лекарственной сенсibilизации / Бычкова Н.В., Давыдова Н.И., Калинина Н.М. // Сборник докладов и тезисов Международного научно-практического конгресса «Многопрофильная клиника XXI века. Передовые медицинские технологии». – СПб, 2016. – С. 41-43.
52. Синельникова Н.А. Возможности иммунодиагностики хронической крапивницы у детей с использованием проточной цитометрии / Синельникова Н.А., Бычкова Н.В., Калинина Н.М., Савенкова Н.Д. // Медицинский алфавит. Современная лаборатория – 2016 – Т.3. – №.19. – С.75-76.
53. Синельникова Н.А. Особенности иммунного ответа, современные возможности иммунодиагностики хронической крапивницы у детей / Синельникова Н.А., Савенкова Н.Д., Калинина Н.М., Бычкова Н.В. // Сборник докладов и тезисов I Российского форума с международным участием «Современная педиатрия. Санкт-Петербург-Белые ночи-2016» – СПб, 2016. – С.66-67.
54. Синельникова Н.А. Особенности активации базофилов у детей со спонтанной и индуцированной хронической крапивницей / Синельникова Н.А., Калинина Н.М.,

Савенкова Н.Д., Бычкова Н.В. // Аллергология и иммунология – 2016. – Т.17. – №2. – С.140-141.

55. Khaleva E. Evaluation of efficacy and safety of feeding an amino acid-based formula longterm in infants with cow's milk protein allergy: results of the open-label prospective postregistration trial / Khaleva E., Novic G., Bychkova N., Makarova N. // Allergy Journal – 2016. – Vol.71(S102). – P.902.

56. Khaleva E. Diagnosis of cow's milk allergy in children under 1 year / Khaleva E., Novic G., Bychkova N., Makarova N., Davydova N., Kalinina N. // Allergy Journal – 2016. – Vol.71(S102). – P.153.

57. Синельникова Н.А. Оценка тяжести хронической крапивницы у детей в период обострения / Синельникова Н.А., Калинина Н.М., Савенкова Н.Д., Бычкова Н.В. // Сборник докладов и тезисов VIII Российской научно-практической конференции «Аллергические и иммунопатологические заболевания – проблема XXI века. Санкт-Петербург-2016» – СПб, 2016. – С.48-49.

58. Savenkova N.D. Features of exacerbation in children with chronic urticaria / Savenkova N.D., Sinelnikova N.A., Kalinina N.M., Bychkova N.V. // Book of Abstracts Proceedings 3dGA2LEN «Global urticaria forum 2016» – Berlin, 2016. – P.47.

59. Kalinina N.M. Methacholinchlorid basophil activation in children with cholinergic urticaria / Kalinina N.M., Bychkova N.V., Sinelnikova N.A., Savenkova N.D. // Book of Abstracts Proceedings 3dGA2LEN «Global urticaria forum 2016» – Berlin, 2016. – P.31.

60. Sinelnikova N.A. Comparative immunological characteristic of spontaneous and inducible urticaria in children / Sinelnikova N.A., Kalinina N.M., Savenkova N.D., Bychkova N.V. // Book of Abstracts Proceedings 3dGA2LEN «Global urticaria forum 2016» – Berlin, 2016. – P.27.

61. Khaleva E. Practical application of basophil activation test in children with a food allergy / Khaleva E., Novik G., Bychkova N. // Clinical and Translation Allergy. – 2016. – Vol.6(S1). – P38.

62. Sinelnikova N.A. Features of basophil activation in children with spontaneous and inducible chronic urticaria / Sinelnikova N.A., Kalinina N.M., Savenkova N.D., Bychkova N.V. // International Journal on Immunorehabilitation. – 2016. – Т.18. – №1. – С.54.

63. Синельникова Н.А. Результаты исследования активации базофилов и Т-хелперов 2 при хронической крапивнице и атопическом дерматите у детей / Синельникова Н.А., Калинина Н.М., Бычкова Н.В., Савенкова Н.Д. // Приложение к журналу «Российский вестник перинатологии и педиатрии. – 2016. – Т.61. – №4. – С.145.

64. Синельникова Н.А. Иммунопатогенетические эндотипы хронической крапивницы у детей / Синельникова Н.А., Калинина Н.М., Бычкова Н.В., Савенкова Н.Д. // Медицинская иммунология – 2017. – Т.19(S) – С.98-99.

65. Бычкова Н.В. CD3+CD294+ лимфоциты как маркеры Тх2 и Тс2 иммунного ответа / Бычкова Н.В., Синельникова Н.А., Чиненова Л.В., Калинина Н.М. // Медицинская иммунология – 2017. – Т.19(S) – С.239-240.

66. Бычкова Н.В. Тест активации базофилов – современный оптимальный метод лабораторной диагностики аллергии / Бычкова Н.В., Новик Г.А., Калинина Н.М. // Лабораторная служба – 2018. – Т.7. – №3. – С.87.

67. Sinelnikova N.A. Atopy influence on immune mechanisms in children with chronic urticaria / Sinelnikova N.A., Savenkova N.D., Kalinina N.M., Bychkova N.V. // Book of Abstracts Proceedings 4rdGA2LEN «Global urticaria forum 2018» – Berlin, 2018. – P.37.

68. Бычкова Н.В. Тест активации базофилов для оценки сенсibilизации к мажорным и минорным аллергенам у пациентов с поллинозом / Бычкова Н.В., Калинина Н.М. // Сборник докладов и тезисов IX Международного научного конгресса «Многопрофильная клиника XXI века. Инновации и передовой опыт». – СПб, 2020 – С.66-70.

69. Калашникова А.А. Усиление цитотоксической активности НК-лимфоцитов под влиянием наноструктурированного бисиликата серебра / Калашникова А.А., Бычкова Н.В., Щербанюк А.В., Калмыкова Н.В. // Сборник докладов и тезисов IX Международного научного конгресса «Многопрофильная клиника XXI века. Инновации и передовой опыт». – СПб, 2020 – С. 151-153.

Список сокращений

CD - кластер дифференцировки		НК-клетки - natural killer cells
ФГА - фитогемагглютинин		НКТ-клетки - natural killer T-cells
PWM - митоген лаконоса, rockweed-митоген		ЛДГ - лактатдегидрогеназа
FcεRI - высокоаффинный рецептор к иммуноглобулину E		MRGPRX2 - Mas-related G-protein-coupled receptor X2
FcεRII - низкоаффинный рецептор к иммуноглобулину E		АСИТ – аллергенспецифическая иммунотерапия
FcγRIIB - низкоаффинный рецептор к иммуноглобулину G		ИГКС - ингаляционные глюкокортикостероиды
sIgE— специфический иммуноглобулин класса E		ДНК - дезоксирибонуклеиновая кислота
FS - forward scatter (рассеяние света вперед)		SS-side scatter (боковое светорассеяние)
йРКВ - йодсодержащие рентгеноконтрастные препарат		Th1 - Т-хелперы 1-го типа иммунного ответа
РPMI 8226 - линия множественной миеломы человека		Th2 - Т-хелперы 2-го типа иммунного ответа
АГ7/С7 - индекс стимуляции лимфоцитов на антиген домашней пыли		Tc1 - Т-цитотоксические 1-го типа иммунного ответа
АГ7+П/АГ7 - индекс подавления пульмикортом антиген-стимулированной пролиферации лимфоцитов		Tc2 - Т-цитотоксические 2-го типа иммунного ответа
РС – рассеянный склероз		БА - бронхиальная астма
МСК - мезенхимальные стволовые клетки		БАТ – тест активации базофилов
ВИД+ИК - видимый поляризованный полихроматический свет, сочетанный с полихроматическим инфракрасным светом, близким к естественной солнечной радиации без ее минорной компоненты – ультрафиолетовых лучей		ROC-анализ - Receiver Operator Characteristic, методика анализа качества модели логистической регрессии
МТТ – метилтетразолий бромид, 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5- diphenyl tetrazolium bromide		АКС - атомные кластеры серебра, наноструктурированный бисиликат серебра Ag ₆ Si ₂ O ₇
CRTH2 (CD294) - chemoattractant receptor-homologous molecule expressed on T-helper cells 2		