

# ФУНКЦИЯ Т-ЛИМФОЦИТОВ КОЖИ ЧЕЛОВЕКА В ЗАЖИВЛЕНИИ РАН В ЭКСПЕРИМЕНТЕ *IN VITRO*

Костоломова Е.Г.<sup>1,2</sup>, Стрелин С.А.<sup>3</sup>, Суховой Ю.Г.<sup>2,4</sup>,  
Унгер И.Г.<sup>2</sup>, Акунеева Т.В.<sup>2</sup>, Марков А.А.<sup>1</sup>, Полянских Е.Д.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО «Тюменский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Тюмень, Россия

<sup>2</sup> ООО «Тюменский филиал института фундаментальной и клинической иммунологии», г. Тюмень, Россия

<sup>3</sup> «Ай Кью Пластик» Тимура Хайдарова, Москва, Россия

<sup>4</sup> ФГБУН «Федеральный исследовательский центр «Тюменский научный центр» Сибирского отделения Российской академии наук», г. Тюмень, Россия

**Резюме.** Полученные результаты показывают роль резидентных Т-клеток кожи человека в патогенезе хронических ран. Изучены 20 образцов нормальной кожи человека, 10 от пациентов перенесших острую травму и 9 от пациентов с хроническими ранами, не заживающими в течение 2 месяцев. С использованием многоцветной проточной цитометрии нами выявлено, что резидентные Т-лимфоциты (CD3<sup>+</sup>αβ<sup>+</sup> и CD3<sup>+</sup>γδ<sup>+</sup>) способны локально продуцировать биологически активные вещества, нормализовать гомеостаз кожи человека, что способствует заживлению ран. Полученные данные свидетельствуют о том, что в крови присутствуют в основном αβ<sup>+</sup>Т-лимфоциты (p < 0,001), γδ<sup>+</sup>Т-клетки, обнаруженные в ранах, являются популяцией кожи. Не обнаружено различий в соотношении резидентных Т-клеток при хронических и острых ранах и здоровым эпителием. Соответственно, незаживление ран и переход в хроническую форму могут быть вызваны нарушением функции Т-лимфоцитов. CD69 регулирует секрецию γδ Т-клетками факторов роста, IFNγ, IL-17 и IL-22. Относительное количество Т-клеток, экспрессирующих на своей поверхности CD69, полученных от пациентов с острой раной, достоверно увеличивалось по сравнению с нормальным эпидермисом и хронической раной (10,5%±2,3 и 7,6%±1,24 и 3,0%±1,05 соответственно (p < 0,001)). Количество клеток с фенотипом CD3<sup>+</sup>αβ<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> достоверно не отличалось у всех трех групп сравнения. Дисрегуляция Т-клеточно-опосредованного заживления при хронических ранах вызвана сниженной продукцией IGF-1 резидентными Т-лимфоцитами CD3<sup>+</sup>αβ<sup>+</sup> (1,7%±0,9 (p < 0,001) и CD3<sup>+</sup>γδ<sup>+</sup> (0,44%±0,02 (p < 0,001), по сравнению с Т-клетками, выделенными из острых ран CD3<sup>+</sup>αβ<sup>+</sup> (13,6%±5,6) и CD3<sup>+</sup>γδ<sup>+</sup> (8,9%±3,1). Как αβ<sup>+</sup> так и γδ<sup>+</sup>Т-лимфоциты, выделенные из незаживающих хронических ран, практически не отвечали на стимуляцию митогенами, в отличие от клеток, полученных из острой раны и здоровой кожи. Анализ секреции исследуемых цитокинов CD69-дефицитными дермальными γδ Т-клетками *in vitro*

**Адрес для переписки:**

Костоломова Елена Геннадьевна  
ООО «Тюменский филиал института  
фундаментальной и клинической иммунологии»  
625027, Россия, г. Тюмень, ул. Котовского, 5/2.  
Тел.: 8 (904) 493-06-74.  
E-mail: lenakost@mail.ru

**Address for correspondence:**

Elena G. Kostolomova  
Institute of Fundamental and Clinical Immunology,  
Tyumen Branch  
5/2 Kotovsky St  
Tyumen  
625027 Russian Federation  
Phone: +7 (904) 493-06-74.  
E-mail: lenakost@mail.ru

**Образец цитирования:**

Е.Г. Костоломова, С.А. Стрелин, Ю.Г. Суховой,  
И.Г. Унгер, Т.В. Акунеева, А.А. Марков, Е.Д. Полянских  
«Функция Т-лимфоцитов кожи человека в  
заживлении ран в эксперименте *in vitro*» // Российский  
иммунологический журнал, 2023. Т. 26, № 2. С. 115-122.  
doi: 10.46235/1028-7221-12430-FOH

© Костоломова Е.Г. и соавт., 2023

Эта статья распространяется по лицензии  
Creative Commons Attribution 4.0

**For citation:**

E.G. Kostolomova, S.A. Strelin, Yu.G. Sukhovei, I.G. Unger,  
T.V. Akuneeva, A.A. Markov, E.D. Polyanskikh "Function  
of human skin T cells in wound healing in the *in vitro*  
experimental setting", Russian Journal of Immunology/  
Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2023, Vol. 26, no. 2,  
pp. 115-122.  
doi: 10.46235/1028-7221-12430-FOH

© Kostolomova E.G. et al., 2023

The article can be used under the Creative  
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.46235/1028-7221-12430-FOH

показал более низкую спонтанную секрецию IL-22 ( $4,56\% \pm 2,3$  и  $23,9\% \pm 1,05$  и  $10,6\% \pm 1,24$  соответственно ( $p < 0,001$ )) и IL-2 ( $0,9\% \pm 0,08$  и  $22,6\% \pm 2,5$  и  $3,9\% \pm 1,0$  и соответственно ( $p < 0,01$ )). Количество  $\gamma\delta$  Т-клеток кожи секретирующих IL-17: здоровая кожа ( $1,4\% \pm 0,085$ ), острая рана ( $11,3\% \pm 3,2$ ) хроническая рана ( $31,7\% \pm 11,8$ ) ( $p < 0,001$ )). Т-лимфоциты в хронических ранах имеют функциональные нарушения и не способны продуцировать биологически активные вещества, способствующие физиологической регенерации ткани.

*Ключевые слова:* проточная цитометрия, кожа, резидентные Т-клетки, заживление ран, IGF-1, IL-2, IL-22, IL-17

## FUNCTION OF HUMAN SKIN T CELLS IN WOUND HEALING IN THE *IN VITRO* EXPERIMENTAL SETTING

Kostolomova E.G.<sup>a, b</sup>, Strelin S.A.<sup>c</sup>, Sukhovei Yu.G.<sup>b, d</sup>, Unger I.G.<sup>b</sup>, Akuneeva T.V.<sup>b</sup>, Markov A.A.<sup>a</sup>, Polyanskikh E.D.<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Tyumen State Medical University, Tyumen, Russian Federation

<sup>b</sup> Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Tyumen Branch, Tyumen, Russian Federation

<sup>c</sup> Timur Khidarov IQ Plastique, Moscow, Russian Federation

<sup>d</sup> Tyumen Scientific Centre, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Tyumen, Russian Federation

**Abstract.** Currently, the treatment of persistent non-healing wounds is among the most difficult clinical issues. We studied 20 samples of normal human skin, 10 specimens from patients with acute trauma, and 9 samples from the patients with chronic wounds that did not heal within 2 months. Using multicolor flow cytometry, we found that the resident T lymphocytes ( $CD3^+\alpha\beta^+$  and  $CD3^+\gamma\delta^+$ ) are able to locally produce biologically active substances, normalize human skin homeostasis, thus promoting the wound healing. The data obtained indicate that the blood contains mainly  $\alpha\beta^+$ T lymphocytes ( $p < 0.001$ ), while the  $\gamma\delta^+$ T cells detected in wounds represent a population similar to skin cells. We found no difference in the ratio of resident T cells in chronic and acute wounds, and healthy epithelium. Accordingly, non-healing of wounds and chronic clinical course may be caused by dysfunction of T cells. CD69 regulates  $\gamma\delta$  T cell secretion of growth factors, IFN $\gamma$ , IL-17 and IL-22. The relative number of CD69-expressing T cells from the patients with acute wounds was significantly increased, if compared with cells from normal epidermis and chronic wounds ( $10.5\% \pm 2.3$ ,  $7.6\% \pm 1.24$ , and  $3.0\% \pm 1.05$ , respectively.  $p < 0.001$ ). The number of cells with the  $CD3^+\alpha\beta^+CD69^+$  phenotype did not differ significantly between all three groups under comparison. Dysregulation of T cell-mediated healing in chronic wounds is caused by reduced production of IGF-1 by resident  $CD3^+\alpha\beta^+$ T lymphocytes ( $1.7\% \pm 0.9$ ) ( $p < 0.001$ ), and  $CD3^+\gamma\delta^+$  ( $0.44\% \pm 0.02$ ,  $p < 0.001$ ) compared to  $CD3^+\alpha\beta^+$ T cells derived from acute wounds ( $13.6\% \pm 5.6$ ) and  $CD3^+\gamma\delta^+$  ( $8.9\% \pm 3.1$ ). The  $\alpha\beta^+$  and  $\gamma\delta^+$  T cells isolated from non-healing chronic wounds did not respond to mitogenic stimuli, unlike the cells obtained from acute wounds and healthy skin. *In vitro* analysis of cytokine secretion by the CD69-deficient dermal  $\gamma\delta$  T cells showed a lower spontaneous secretion of IL-22 ( $4.56\% \pm 2.3$  and  $23.9\% \pm 1.05$  and  $10.6\% \pm 1.24$ , respectively;  $p < 0.001$ ) and IL-2 ( $0.9\% \pm 0.08$  and  $22.6\% \pm 2.5$  and  $3.9\% \pm 1.0$ , and respectively;  $p < 0.01$ ). When analyzing the number of resident  $\gamma\delta$  skin T cells secreting IL-17, we obtained the following differences for healthy skin ( $1.4\% \pm 0.08$ ), acute wounds ( $11.3\% \pm 3.2$ ) and chronic wounds ( $31.7\% \pm 11.8$ ), thus showing a significant intergroup difference ( $p < 0.001$ ). T lymphocytes in chronic wounds exhibit some functional disorders and are not able to produce biologically active substances that promote physiological tissue regeneration. The results suggest a role of resident T cells in human skin in wound healing processes and provide new insights into the pathogenesis of chronic wounds.

*Keywords:* flow cytometry, skin, resident T cells, wound healing, IGF-1, IL-2, IL-22, IL-17

## Введение

Длительно незаживающие раны — одна из проблем современной медицины. В процессе заживления кожной раны могут возникнуть осложнения, вследствие которых на месте острой раны может возникнуть хроническая рана или

чрезмерное рубцевание. Первоначальные представления об иммунологическом надзоре за кожей подчеркивали важность иммунных клеток, которые циркулируют между лимфатическими узлами, дренирующими кожу, периферическими тканями и тканями, которые могут быстро реагировать на проблемы с антигенами [22]. Одна-

ко недавно было предложено, что резидентные Т-клетки кожи, а не рекрутированные Т-клетки, играют главную роль в кожном иммунном гомеостазе и патологии [23]. Так, резидентные Т-клетки памяти кожи стратегически позиционируются как первая линия защиты от вторичной антигенной стимуляции [21] Т-клетки, которые экспрессируют гетеродимеры, состоящие из  $\gamma$ - и  $\delta$ -цепей рецептора Т-клеток (TCR) обнаруживаются как в эпидермисе, так и в дерме кожи человека и животных [8]. Пул Т-клеток в эпидермисе мыши состоит исключительно из  $\gamma\delta^+$ Т-клеток с инвариантными TCR, обозначенными как дендритные эпидермальные Т-клетки (DETC). В отличие от грызунов в эпидермисе человека существует также большая популяция эпидермальных  $\alpha\beta^+$ Т-клеток [17]. Помимо анализа их присутствия, мало что известно об этих популяциях Т-клеток кожи человека. Исследование пула Т-лимфоцитов кожи человека и их функциональной активности позволит получить представление о патогенезе острых ран и хронических ран.

**Цель данной работы** — изучить роль Т-лимфоцитов кожи в заживлении острых и хроническими ран человека *in vitro*.

## Материалы и методы

Образцы нормальной кожи человека ( $n = 20$  (19 женщин и 1 мужчины)) возраст  $56,8 \pm 8,2$  года были получены в результате блефаропластики. Образцы кожи пациентов ( $n = 10$ ), перенесших недавнюю травму, были использованы для изучения острых ран. Ни один из пациентов не имел системного заболевания или не получал иммунодепрессивного лечения. Образцы ткани пациентов ( $n = 9$ ) с хроническими ранами, которые не зажили в течение 2 месяцев, использовали для изучения хронических ран. Образцы ткани и периферической крови для исследования были доставлены из ГБУЗ ТО «Областная клиническая больница № 1» (отделение пластической и гнойной хирургии). Венозную кровь от 20 здоровых доноров получали путем пункции периферической вены и собрали в вакуумную пробирку с добавлением  $K_3$ ЭДТА. Все исследования выполнены с информированного согласия испытуемых и в соответствии с «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 г. № 266. В качестве источника клеток кожи использовали биоптаты кожи, полученные по ранее описанной методике [1]. Исследование фенотипического состава Т-лимфоцитов кожи проводили методом проточной цитометрии с использованием прямой иммунофлуоресценции на приборе Cytomics FC500 (Beckman Coulter, США) с применением программного обеспечения СХР

2.0. Настройку проточного цитофлуориметра проводили с учетом рекомендаций Хайдукова и соавт. [4]. Для анализа использовали антитела к IGF-1 (G-17) и сопутствующие блокирующие пептиды (Santa Cruz Biotechnology (США)). Моноклональные антитела CD3, CD69, TCR $\alpha\beta$  и TCR $\gamma\delta$ , меченные флуоресцирующими красителями (Beckman Coulter, США). В качестве негативного контроля использовались IgG (Beckman Coulter). Анализируемые клетки кожи в виде осадка ресуспендировали в 50 мкл PBS. После добавления антител образцы 20 минут инкубировали в холодильнике при  $t +4$  °С и отмывали от не связавшихся антител методом центрифугирования в течение 7 минут при 600 g PBS. Для каждого из образцов анализировали не менее 50000-75000 клеток. Удаление эритроцитов из образцов крови проводили по безотмывочной технологии с использованием лизирующего раствора Versa Lyze (Beckman Coulter, США).

Для изучения способности резидентными эпидермальными Т-клетками спонтанной продукции инсулиноподобного фактора роста (IGF-1), IL-2, IL-22, IL-17 и при стимуляции *in vitro* резидентные Т-клетки выделяли из нормальной кожи и оценивали секрецию биологически активных веществ с помощью проточной цитометрии. Суспензию клеток кожи получали по ранее описанной методике [1], инкубировали с Брефелдином А в течение 24 часов в присутствии или в отсутствие с ФГА (при конечной концентрации вещества — 100 нг/мкл) и иономицина кальция (при конечной концентрации вещества — 1 мкг/мкл). После окончания культивирования обе клеточные культуры дважды отмывали PBS, инкубировали с моноклональными антителами, в течение 20 минут при  $t +4$  °С в темноте отмывали от несвязавшихся антител методом центрифугирования в течение 7 минут при 600 g PBS.

Статистическую обработку проводили при помощи программного обеспечения Statistika 8.0 (StatSoft, США). Данные были проанализированы с использованием непарного t-критерия Стьюдента для определения значимых различий между двумя группами пациентов и парного t-критерия для определения значимых различий в одной и той же группе. Все результаты были признаны значимыми при  $p \leq 0,05$ .

## Результаты

Ранее нами было установлено, что процессы апоптоза и пролиферации играют важную роль как в патогенезе образования рубцовой ткани, так и в поддержании гомеостаза здоровой кожи [2, 3, 5]. Прежде чем исследовать роль резидентных Т-клеток в заживлении ран и гомеостазе, мы определили наличие популяций Т-лимфоцитов в здоровой коже человека [7]. Т-лимфоциты кожи

сравнивали с периферическими Т-лимфоцитами крови здоровых доноров. Мы обнаружили значительное количество  $\gamma\delta^+$ Т-клеток ( $15,9\% \pm 2,7$  и  $3,4 \pm 0,9$  соответственно) в коже по сравнению с кровью. Субпопуляция  $\alpha\beta^+$ Т-клеток составила  $0,9\% \pm 0,03$  и  $69,9\% \pm 18,6$  соответственно. Мы не обнаружили достоверных различий в соотношении субпопуляций  $CD3^+\alpha\beta^+$  и  $CD3^+\gamma\delta^+$  при острых и хронических незаживающих ранах и здоровым эпителием. Мы предположили, что незаживление ран и хронизация вызваны нарушением функциональной активности  $\alpha\beta^+$  и/или  $\gamma\delta^+$ Т-лимфоцитов. В нашем исследовании относительное количество Т-клеток, экспрессирующих на своей поверхности CD69, полученных от пациентов с острой раны, достоверно увеличивалось по сравнению с нормальным эпидермисом и хронической раной ( $10,5\% \pm 2,3$  и  $7,6\% \pm 1,24$  и  $3,0\% \pm 1,05$  соответственно ( $p < 0,001$ )). Количество клеток с фенотипом  $CD3^+\alpha\beta^+CD69^+$  достоверно не отличалось у всех трех групп сравнения.

Чтобы исследовать способность Т-лимфоцитов кожи участвовать в заживлении раны, мы оценили продукцию IGF-1 клетками здоровой кожи с помощью проточной цитометрии. Обнаружено, что эпидермальные Т-лимфоциты спонтанно (*in vitro*) продуцируют IGF-1 на низких уровнях  $CD3^+\alpha\beta^+$  ( $3,9 \pm 1,3\%$ ) и  $CD3^+\gamma\delta^+$  ( $1,9 \pm 0,6\%$ ), как и описано для DETC мыши [17]. Продукция IGF-1 кожными резидентными Т-клетками, окрашенными анти-IGF-1, увеличивается при стимуляции ФГА (100 нг/мкл) и иономицином кальция (1 мкг/мкл) в пуле  $CD3^+\alpha\beta^+$  до  $10,8 \pm 2,1\%$  ( $p < 0,001$ ), а в субпопуляции  $CD3^+\gamma\delta^+$  до  $7,3 \pm 1,9\%$ ; ( $p < 0,001$ ) относительно базального уровня.

Резидентные Т-клетки кожи реагируют на ее повреждение, инфицирование, стресс секрецией цитокинов и факторов роста, которые стимулируют клеточную пролиферацию, вызывают цитоллиз и активируют другие клетки для инфильтрации пораженной области.

По данным нашего исследования, резидентные Т-лимфоциты, выделенные из незаживающих хронических кожных ран, не секретируют IGF-1 по сравнению с Т-клетками, выделенными из острых ран и здоровой кожи (табл. 1).

Одним из признаков ранней стадии заживления раны является увеличение IGF-1 в месте раны, было показано, что уровни IGF-1 снижаются в незаживающих ранах от пациентов с диабетом [14]. Поэтому мы выдвинули гипотезу, что резидентные Т-клетки кожи активируются при повреждении *in vivo* с образованием IGF-1. Так, уровни IGF-1, продуцируемые как  $\alpha\beta^+$  ( $25,7\% \pm 5,1$  и  $10,8\% \pm 2,1$  соответственно), так и  $\gamma\delta^+$ Т-клетки ( $19,2\% \pm 3,7$  и  $7,3\% \pm 1,9$  соответственно), стимулированные ФГА и иономицином, полученными из биоптата острой раны, были

выше уровня инсулиноподобного фактора роста 1 в Т-клетках здоровой кожи. Т-лимфоциты, выделенные из незаживающих хронических ран, практически не отвечали на стимуляцию митогенами  $CD3^+\alpha\beta^+$  ( $1,7 \pm 0,9$  спонтанная и  $2,3 \pm 0,2$  стимулированная секреция),  $CD3^+\gamma\delta^+$  ( $0,44 \pm 0,02$  и  $3,1 \pm 1,4$  соответственно). Чтобы определить, является ли это уникальным ответом резидентных Т-клеток кожи во время повреждения,  $\alpha\beta^+$  и  $\gamma\delta^+$ Т-клетки были выделены из крови как здоровых доноров, так и от пациентов с острыми и хроническими ранами. Спонтанные уровни Т-клеток, продуцирующие IGF-1, выделенные у пациентов с ранами и здоровых доноров, статистически недостоверно отличались. Базальный уровень IGF-1, секретируемый субпопуляцией резидентных  $CD3^+\alpha\beta^+$  клеток в исследуемых группах, составил: хроническая незаживающая рана ( $3,5\% \pm 0,9$ ); острая рана ( $7,2\% \pm 2,8$ ) и здоровая кожа ( $5,0\% \pm 1,6$ ) ( $p = 0,12$ ) и пулом  $CD3^+\gamma\delta^+$  лимфоцитов ( $2,9\% \pm 1,0$ ;  $6,7\% \pm 3,1$  и  $3,3\% \pm 0,8$  соответственно ( $p = 0,11$ )). При стимуляции *in vitro* митогенами секреция IGF-1 тремя пулами Т-лимфоцитов крови достоверно значимо увеличивались ( $p < 0,001$ ). Возможно, повышенная продукция  $\alpha\beta^+\gamma\delta^+$ Т-лимфоцитами IGF-1 во время заживления раны ограничена локальной средой. В совокупности наши результаты демонстрируют, что Т-клетки кожи человека являются локальным источником IGF-1, обладая способностью усиливать экспрессию фактора роста при активации, влияя на процессы регенерации раны.

Далее мы исследовали способность  $\gamma\delta^+$ Т-лимфоцитов здоровой и поврежденной кожи синтезировать цитокины. Чтобы проанализировать функцию CD69 в секреции IL-22, IL-2 и IL-17 дермальными  $\gamma\delta^+$ Т-клетками *in vitro*, мы приготовили суспензии клеток кожи [1], полученных от трех исследуемых групп. Анализ методом проточной цитометрии показал более низкую спонтанную секрецию IL-22 в CD69-дефицитных дермальных  $\gamma\delta^+$ Т-клетках по сравнению с клетками, полученными из острой раны и здоровой кожи ( $4,56\% \pm 2,3$  и  $23,9\% \pm 1,05$  и  $10,6\% \pm 1,24$  соответственно ( $p < 0,001$ )). Резидентные Т-лимфоциты, полученные из хронической раны, не ответили на стимуляцию *in vitro* ФГА и иономицином кальция в течение 24 часов в отличие от групп сравнения ( $5,6\% \pm 2,3$  и  $55,4\% \pm 1,05$  и  $21,8\% \pm 1,24$  соответственно ( $p < 0,001$ )).  $CD3^+\gamma\delta^+$  клетки, выделенные из хронических ран, продуцируют значительно меньше IL-2 после стимуляции по сравнению с клетками, выделенными из острой раны и нормального эпидермиса до ( $0,9\% \pm 0,08$  и  $22,6\% \pm 2,5$  и  $3,9\% \pm 1,0$  соответственно ( $p < 0,01$ )) и после стимуляции митогеном ( $1,8\% \pm 0,5$  и  $48,6\% \pm 8,0$  и  $9,9\% \pm 3,5$  соответственно ( $p < 0,001$ )). При анализе количества резидентных  $\gamma\delta^+$ Т-лимфоцитов

ТАБЛИЦА 1. ПРОДУКЦИЯ IGF-1 Т-КЛЕТКАМИ ПРИ ОСТРЫХ И ХРОНИЧЕСКИХ РАНАХ

TABLE 1. PRODUCTION OF IGF-1 BY T CELLS IN ACUTE AND CHRONIC WOUNDS

Резидентные Т-лимфоциты Resident T lymphocytes	Здоровая кожа Healthy skin (n = 20)	Острая рана Acute wound (n = 10)	Хроническая рана Chronic wound (n = 9)	p
CD3 <sup>+</sup> αβ <sup>+</sup> (%)	3,9±1,3	13,6±5,6#*	1,7±0,9	**p < 0,001
CD3 <sup>+</sup> γδ <sup>+</sup> (%)	1,9±0,6	8,9±3,1#*	0,44±0,02	**p < 0,001

Примечание. # – разница со здоровой кожей; \* – разница с хронической раной.

Note. #, difference with healthy skin; \*, difference with chronic wound.

кожи, секретирующих IL-17, мы получили следующие цифры: здоровая кожа (1,4%±0,085), острая рана (11,3%±3,2) хроническая рана (31,7%±11,8) (p < 0,001)).

## Обсуждение

Кожа человека содержит эпидермальные резидентные αβ<sup>+</sup> и γδ<sup>+</sup>Т-клетки, которые могут функционировать при иммунном надзоре за кожей [10]. Ранее нами было установлено, что процессы апоптоза и пролиферации играют важную роль как в патогенезе образования рубцовой ткани, так и в поддержании гомеостаза здоровой кожи [2, 3, 4]. Прежде чем исследовать роль резидентных Т-клеток в заживлении ран и гомеостазе, мы определили наличие популяций Т-лимфоцитов в здоровой коже человека [5]. Т-лимфоциты кожи сравнивали с периферическими Т-лимфоцитами крови здоровых доноров. Мы обнаружили значительное количество γδ<sup>+</sup>Т-клеток в коже по сравнению с кровью (p < 0,001). Основной пул αβ<sup>+</sup>Т-клеток был обнаружен в крови здоровых доноров (p < 0,001). Соответственно, γδ<sup>+</sup>Т-лимфоциты являются популяцией кожи. Мы не обнаружили достоверных различий в соотношении субпопуляций CD3<sup>+</sup>αβ<sup>+</sup> и CD3<sup>+</sup>γδ<sup>+</sup> при острых и хронических незаживающих ранах и здоровым эпителием [10]. Значит, незаживление ран и переход в хроническую форму может быть вызван нарушением функциональной активности резидентных Т-лимфоцитов. Исследования Sibrián D. et al. показали, что экспрессия CD69 на тканевых резидентных иммунных клетках при воспалении является маркером различных сигнальных путей, которые потенциально регулируют регенерацию тканей [9]. В нашем исследовании относительное количество Т-клеток, экспрессирующих на своей поверхности CD69, полученных от пациентов с острой раны, достоверно увеличивалось по сравнению с нормальным эпидермисом и хронической раной (p < 0,001). Количество клеток с фенотипом CD3<sup>+</sup>αβ<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> достоверно не отличалось у всех трех групп сравнения. По результатам этого этапа

исследования можно сделать предварительный вывод, что резидентные γδ<sup>+</sup>Т-лимфоциты в хронических ранах имеют функциональные нарушения и не способны продуцировать биологически активные вещества во время процесса восстановления тканей. По данным литературного анализа, мышечные DETC регулируют гомеостаз кожи посредством секреции IGF-1, члена семейства инсулиновых гормонов роста. IGF-1 используется кератиноцитами в коже для развития и поддержания эпидермиса [17]. В коже человека IGF-1 регулирует форму и миграцию кератиноцитов для обеспечения эпителизации раны [24]. Предполагается, что фибробласты являются основным источником IGF-1 в коже [13]. Чтобы исследовать способность Т-лимфоцитов кожи участвовать в заживлении раны, мы оценили продукцию IGF-1 клетками здоровой кожи с помощью проточной цитометрии. Обнаружено, что эпидермальные Т-лимфоциты, как αβ<sup>+</sup>, так и γδ<sup>+</sup> спонтанно (*in vitro*) продуцируют IGF-1 на низких уровнях, что описано и для DETC мыши [17]. Продукции IGF-1 кожными резидентными Т-клетками окрашенными анти-IGF-1 увеличивается при стимуляции митогенами в пуле CD3<sup>+</sup>αβ<sup>+</sup> и CD3<sup>+</sup>γδ<sup>+</sup> (p < 0,001) относительно базального уровня.

Резидентные Т-клетки кожи реагируют на ее повреждение, инфицирование, стресс секрецией цитокинов и факторов роста, которые стимулируют клеточную пролиферацию, вызывают цитолиз и активируют другие клетки для инфильтрации пораженной области. Предыдущие исследования показали, что количество IGF-1 в раневой жидкости человека достигает максимальных значений в течение 24 часов после повреждения [12]. Уровень IGF-1 увеличивается после повреждения эпидермиса кожи, достигая максимума через 3 дня после ранения [20]. По данным нашего исследования, резидентные Т-лимфоциты, выделенные из незаживающих хронических кожных ран, не секретируют IGF-1, по сравнению с Т-клетками, выделенными из острых ран и здоровой кожи (p < 0,001) (табл. 1).

Одним из признаков ранней стадии заживления раны является увеличение IGF-1 в месте

раны, было показано, что уровни IGF-1 снижаются в незаживающих ранах от пациентов с диабетом [13]. Поэтому мы выдвинули гипотезу, что резидентные Т-клетки кожи активируются при повреждении *in vivo* с образованием IGF-1. Т-лимфоциты, полученные из биоптата острой раны, при стимуляции секретируют достоверно большее количество IGF-1 ( $p < 0,001$ ), чем Т-клетки здоровой кожи. Т-лимфоциты, выделенные из незаживающих хронических ран, не отвечали на стимуляцию митогенами. Чтобы определить, является ли это уникальным ответом резидентных Т-клеток кожи во время повреждения,  $\alpha\beta^+$  и  $\gamma\delta^+$ Т-клетки были выделены из крови доноров и пациентов. При стимуляции *in vitro* митогенами секреция IGF-1 тремя пулами Т-лимфоцитов крови достоверно значимо увеличивались ( $p < 0,001$ ). Возможно, повышенная продукция  $\alpha\beta^+$   $\gamma\delta^+$ Т-лимфоцитами IGF-1 во время заживления раны ограничена локальной средой. В совокупности наши результаты демонстрируют, что Т-клетки кожи человека являются локальным источником IGF-1, обладая способностью усиливать экспрессию фактора роста при активации, влияя на процессы регенерации раны.

Далее мы исследовали способность  $CD3^+\gamma\delta^+$ Т-лимфоцитов здоровой и поврежденной кожи синтезировать цитокины. Известно, что CD69 регулирует секрецию CD8Т-клетками и  $\gamma\delta$ Т-клетками  $IFN\gamma$ , IL-17 и IL-22, обуславливая иммунный ответ типа 3 (GATA 3) [9]. Так, IL-22 увеличивает пролиферацию и миграцию кератиноцитов, стимулирует выработку коллагена дермальными фибробластами и способствует дифференцировке миофибробластов после ранения [19]. Анализ методом проточной цитометрии показал более низкую спонтанную секрецию IL-22 и IL-2 в CD69-дефицитных дермальных  $\gamma\delta^+$ Т-клетках по сравнению с клетками, полученными из острой раны и здоровой кожи ( $p < 0,001$ ). Резидентные Т-лимфоциты, полученные из хронической раны, не ответили на стимуляцию митогенами *in vitro* в течение 24 часов в отличие от групп сравнения ( $p < 0,001$ ). Можно предположить, что резидентные Т-лимфоциты в хронической раневой среде становятся менее чувствительными к активации. Потеря функции  $\gamma\delta^+$ Т-клеток приводит к длительному заживлению ран у мышей с диабетом [21]. При анализе количества резидентных  $\gamma\delta^+$ Т-лимфоцитов кожи, секретирующих IL-17 мы получили следующие цифры: здоровая кожа ( $1,4\% \pm 0,085$ ), острая рана ( $11,3\% \pm 3,2$ ) хроническая рана ( $31,7\% \pm 11,8$ ) ( $p < 0,001$ ). Умеренная продукция IL-17 резидентными Т-лимфоцитами оказывает благоприятное действие в заживлении острых ран, способствуя пролиферации кератиноцитов и выработке противомикробных пептидов [15], нерегулируемая же передача сигналов

семейства IL-17 может приводить к длительному воспалению. Возможно, постоянно повышенный уровень IL-17 связан с хроническим незаживающим течением раневого процесса. Ранее проведенные исследования показали, что уровни семейства IL-17 в раневой жидкости из венозных язв повышены по сравнению с уровнями венозной крови пациентов, взятых в одно и то же время, и семейство IL-17 также повышено в образцах пораженной ткани у пациентов с гангренозной пиодермией относительно нормальной кожи [16, 18]. Однако ни в одном из исследований не изучались конкретные подтипы семейства IL-17. Проведенное исследование указывает на то, что резидентные Т-клетки, хотя и присутствуют в хронических ранах, функционально нарушены и не способны продуцировать IGF-1 и цитокины в процессе восстановления тканей.

## Заключение

Заживление кожной раны представляет собой сложный процесс, требующий постоянной связи между клетками в форме высвобождения цитокинов, межклеточных контактов и межклеточных взаимодействий. Данное исследование демонстрирует, что попадающие в кожу популяции резидентных Т-клеток ( $\alpha\beta TCR^+$  и  $\gamma\delta TCR^+$ ) способны секретировать IGF-1, IL-2, IL-22, IL-17, нормализовать гомеостаз кожи и способствовать заживлению ран. Хронические раны характеризуются стойким воспалением с замедленным заживлением. Поскольку резидентные Т-лимфоциты обеих исследуемых субпопуляций ( $CD3^+\alpha\beta$  и  $CD3^+\gamma\delta^+$  в хронических незаживающих ранах имеют функциональные нарушения и не способны продуцировать биологически активные вещества во время процесса регенерации и ремоделирования тканей. Возможно, активирующие антигены чрезмерно стимулируют резидентные Т-клетки в хронической ране, что приводит к их невосприимчивости к активационным сигналам. Дисфункция резидентных Т-лимфоцитов может быть вызвана повышенной экспрессией ингибирующих рецепторов, таких как апоптоз усиливающаяся в ответ на тяжелые повреждения. Полученные результаты показывают роль резидентных Т-клеток, находящихся в коже человека, в заживлении ран и дают новое представление о понимании патогенеза хронических ран. С клинической точки зрения исследование повреждения резидентных Т-клеток на ранней стадии процесса заживления раны может быть прогностическим фактором для формирования хронической раны.

## Список литературы / References

1. Гольцов С.В., Костоломова Е.Г., Суховой Ю.Г., Паульс В.Ю. Способ определения субпопуляционно-го состава клеток кожи и получения цитоиммунограммы кожи. Патент RU2630607 (Россия) от 02.06.2016. [Goltsov S.V., Kostolomova E.G., Suhovei Yu.G., Pauls V.Yu. A method for determining the subpopulation composition of skin cells and obtaining a skin cytoimmunogram. Patent RU2630607 (Russia) on 02.06.2016].
2. Костоломова Е.Г., Суховой Ю.Г., Унгер И.Г. Дозозависимое влияние лиофилизированного экстракта клеток куриного эмбриона на индуцированный апоптоз моноцитов в условиях *in vitro* // Российский иммунологический журнал, 2019. Т. 13 (22), № 3. С. 1206-1210. [Kostolomova E.G., Suhovei Yu.G., Unger I.G. Dependable effect of lyophilized extract of chicken embryo cells on induced apoptosis of monocytes under *in vitro* conditions. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2019, Vol. 13 (22), no. 3, pp. 1206-1210. (In Russ.)]
3. Костоломова Е.Г., Суховой Ю.Г., Унгер И.Г., Акунеева Т.В. Взаимодействие иммуноцитов кожи в процессе репаративной регенерации в ране // Российский иммунологический журнал, 2017. Т. 20, № 2. С. 148-150. [Kostolomova E.G., Suhovei Yu.G., Unger I.G., Akuneeva T.V. Interaction of skin immunocytes in the process of reparative regeneration in the wound. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2017, Vol. 20, no. 2, pp. 148-150. (In Russ.)]
4. Кудрявцев И.В., Субботовская А.И. Опыт измерения параметров иммунного статуса с использованием шестицветного цитофлуориметрического анализа // Медицинская иммунология, 2015. Т. 17, № 1. С. 19-26. [Kudryavtsev I.V., Subbotovskaya A.I. Application of six-color flow cytometric analysis for immune profile monitoring. *Meditsinskaya Immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2015, Vol. 17, no. 1, pp. 19-26. (In Russ.) doi: 10.15789/1563-0625-2015-1-19-26.
5. Марков А.А., Костоломова Е.Г., Тимохина Т.Х., Соловьев Г.С., Паромова Я.И., Полянских Е.Д., Воронин К.А. Влияние супернатанта *Bifidobacterium bifidum* на морфофункциональные свойства фибробластов человека в динамике в эксперименте *in vitro* // Медицинская иммунология, 2023. Т. 25, № 3. С. 581-586. [Markov A.A., Kostolomova E.G., Timokhina T.Kh., Solov'yev G.S., Paromova Ya.I., Polyanskikh E.D., Voronin K.A. Effect of *Bifidobacterium bifidum* supernatant on the morphological and functional characteristics of human fibroblasts in real time during an *in vitro* experiment. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2023, Vol. 25, no. 3, pp. 581-586. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-EOB-2720.
6. Олейник Е.К., Чуров А.В., Олейник В.М. Иммунологическая память: роль регуляторных клеток // Медицинская иммунология, 2018. Т. 20, № 5. С. 613-620. [Oleinik E.K., Churov A.V., Oleinik V.M. Immunological memory: the role of regulatory cells (TREGS). *Meditsinskaya Immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2018, Vol. 20, no. 5, pp. 613-620. (In Russ.) doi: 10.15789/1563-0625-2018-5-613-620.
7. Суховой Ю.Г., Костоломова Е.Г., Унгер И.Г., Акунеева Т.В. Локальный иммунитет кожи как отражение ее возрастного и функционального состояния // Российский иммунологический журнал, 2017. Т. 20, № 3. С. 521-523. [Sukhovei Y.G., Kostolomova E.G., Unger I.G., Akuneeva T.V. Local immunity of skin as reflection of its age and functional state. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2017, Vol. 20, no. 3, pp. 521-523. (In Russ.)]
8. Bernal-Alferes B., Gómez-Mosqueira R., Ortega-Tapia G.T., Burgos-Vargas R., García-Latorre E., Domínguez-López M.L., Romero-López J.P. The role of  $\gamma\delta$  T cells in the immunopathogenesis of inflammatory diseases: from basic biology to therapeutic targeting. *J. Leukoc. Biol.*, 2023, qiad046. doi: 10.1093/jleuko/qiad046.
9. Boothby I.C., Cohen J.N., Rosenblum M.D. Regulatory T cells in skin injury: At the crossroads of tolerance and tissue repair. *Sci. Immunol.*, 2020, Vol. 5, no. 47, eaaz9631. doi: 10.1126/sciimmunol.aaz9631.
10. Cibrián D., Sánchez-Madrid F. CD69: from activation marker to metabolic gatekeeper. *Eur. J. Immunol.*, 2017, Vol. 47, no. 6, pp. 946-953.
11. Cruz M.S., Diamond A., Russell A., Jameson J.M. Human  $\alpha\beta$  and  $\gamma\delta$  T cells in skin immunity and disease. *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 9, 1304. doi: 10.3389/fimmu.2018.01304.
12. Elijah I.E., Branski L.K., Finnerty C.C., Herndon D.N. The GH/IGF-1 system in critical illness. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2011, Vol. 25, no. 5, pp. 759-767.
13. Farag A.G.A., Abdu Allah A.M.K., El-Rebey H.S., Mohamed Ibraheem K.I., Mohamed A.S.E.D., Labeeb A.Z., Elgazzar A.E., Haggag M.M. Role of insulin-like growth factor-1 in skin tags: a clinical, genetic and immunohistochemical study in a sample of Egyptian patients. *Clin. Cosmet. Investig. Dermatol.*, 2019, Vol. 12, pp. 255-266.
14. Garoufalia Z., Papadopetraki A., Karatza E., Vardakostas D., Philippou A., Kouraklis G., Mantas D. Insulin-like growth factor-I and wound healing, a potential answer to non-healing wounds: A systematic review of the literature and future perspectives. *Biomed Rep.*, 2021, Vol. 15, no. 2, 66. doi: 10.3892/br.2021.1442.
15. Isailovic N., Daigo K., Mantovani A., Selmi C. Interleukin-17 and innate immunity in infections and chronic inflammation. *J. Autoimmun.*, 2015, Vol. 60, pp. 1-11.
16. Ligi D., Mosti G., Croce L., Raffetto J.D., Mannello F. Chronic venous disease – Part I: Inflammatory biomarkers in wound healing. *Biochim. Biophys. Acta*, 2016, Vol. 1862, no. 10, pp. 1964-1974.
17. Liu M., Liu Z., Chen Y., Peng S., Yang J., Chen C., Wang J., Shang R., Tang Y., Huang Y., Zhang X., Hu X., Liou Y.C., Luo G., He W. Dendritic epidermal T cells secreting exosomes promote the proliferation of epidermal stem cells to enhance wound re-epithelialization. *Stem Cell Res. Ther.*, 2022, Vol. 13, no. 1, 121. doi: 10.1186/s13287-022-02783-6.

18. Marzano A.V., Damiani G., Ceccherini I., Berti E., Gattorno M., Cugno M. Autoinflammation in pyoderma gangrenosum and its syndromic form (pyoderma gangrenosum, acne and suppurative hidradenitis). *Br. J. Dermatol.*, 2017, Vol. 176, no. 6, pp. 1588-1598.
19. McGee H.M., Schmidt B.A., Booth C.J., Yancopoulos G.D., Valenzuela D.M., Murphy A.J., Stevens S., Flavell R.A., Horsley V. IL-22 promotes fibroblast-mediated wound repair in the skin. *J. Invest. Dermatol.*, 2013, Vol. 133, no. 5, pp. 1321-1329.
20. Miescher I., Rieber J., Calcagni M., Buschmann J. *In vitro* and *In vivo* effects of IGF-1 delivery strategies on tendon healing: a review. *Int. J. Mol. Sci.*, 2023, Vol. 24, no. 3, 2370. doi:10.3390/ijms24032370.
21. Munoz L.D., Sweeney M.J., Jameson J.M. Skin resident  $\gamma\delta$  T cell function and regulation in wound repair. *Int. J. Mol. Sci.*, 2020, Vol. 21, no. 23, 9286. doi: 10.3390/ijms21239286.
22. Raziyeva K., Kim Y., Zharkinbekov Z., Kassymbek K., Jimi S., Saparov A. Immunology of acute and chronic wound healing. *Biomolecules*, 2021, Vol. 11, no. 5, 700. doi: 10.3390/biom11050700.
23. Tokura Y., Phadungsaksawasdi P., Kurihara K., Fujiyama T., Honda T. Pathophysiology of skin resident memory T Cells. *Front. Immunol.*, 2021, Vol. 11, 618897. doi: 10.3389/fimmu.2020.618897.
24. Tu C.-L., Celli A., Mauro T., Chang W. Calcium-sensing receptor regulates epidermal intracellular  $Ca^{2+}$  signaling and re-epithelialization after wounding. *J. Invest. Dermatol.*, 2019, Vol. 139, Iss. 4, pp. 919-929.

---

**Авторы:**

**Костоломова Е.Г.** — к.б.н., доцент кафедры микробиологии, научный сотрудник лаборатории геномики, протеомики и метаболомики Университетского НИИ медицинских биотехнологий и биомедицины ФГБОУ ВО «Тюменский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ; заведующая научно-исследовательской лабораторией ООО «Тюменский филиал института фундаментальной и клинической иммунологии», г. Тюмень, Россия

**Стрелин С.А.** — к.м.н., доцент, врач, пластический хирург «Ай Кью Пластик» Тимура Хайдарова, Москва, Россия

**Суховой Ю.Г.** — д.м.н., профессор, ФГБУН «Федеральный исследовательский центр «Тюменский научный центр» Сибирского отделения Российской академии наук»; ведущий научный сотрудник ООО «Тюменский филиал института фундаментальной и клинической иммунологии», г. Тюмень, Россия

**Унгер И.Г.** — к.м.н., директор, ведущий научный сотрудник ООО «Тюменский филиал института фундаментальной и клинической иммунологии», г. Тюмень, Россия

**Акунеева Т.В.** — старший научный сотрудник ООО «Тюменский филиал института фундаментальной и клинической иммунологии», г. Тюмень, Россия

**Марков А.А.** — к.м.н., директор, ведущий научный сотрудник Университетского НИИ медицинских биотехнологий и биомедицины, доцент кафедры медицинской профилактики и реабилитации ФГБОУ ВО «Тюменский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Тюмень, Россия

**Полянских Е.Д.** — студентка Института материнства и детства ФГБОУ ВО «Тюменский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Тюмень, Россия

---

**Authors:**

**Kostolomova E.G.**, PhD (Biology), Associate Professor, Department of Microbiology, Research Associate, Laboratory of Genomics, Proteomics and Metabolomics, University Research Institute of Medical Biotechnology and Biomedicine, Tyumen State Medical University; Head, Research Laboratory, Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Tyumen Branch, Tyumen, Russian Federation

**Strelin S.A.**, PhD (Medicine), Associate Professor, Plastic Surgeon, Head Physician, Timur Khidarov IQ Plastique,, Moscow, Russian Federation

**Sukhovei Yu.G.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Tyumen Scientific Centre, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences; Leading Research Associate, Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Tyumen Branch, Tyumen, Russian Federation

**Unger I.G.**, PhD (Medicine), Director, Leading Research Associate, Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Tyumen Branch, Tyumen, Russian Federation

**Akuneeva T.V.**, Senior Research Associate, Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Tyumen Branch, Tyumen, Russian Federation

**Markov A.A.**, PhD (Medicine), Director, Leading Research Associate, University Research Institute of Medical Biotechnology and Biomedicine, Associate Professor, Department of Preventive Medicine and Rehabilitation, Tyumen State Medical University, Tyumen, Russian Federation

**Polyanskikh E.D.**, Student, Institute of Motherhood and Childhood, Tyumen State Medical University, Tyumen, Russian Federation