

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2023-22-4-43-51>

# Клетки врожденного иммунитета в модели острого псориазоподобного воспаления у мышей

Э.А. Ахматова<sup>1</sup>, Е.В. Сорокина<sup>1,2</sup>, И.Ж. Шубина<sup>3</sup>, Е.А. Курбатова<sup>1</sup>, В.Н. Столпникова<sup>1</sup>,  
Е.О. Калининченко<sup>1</sup>, И.В. Бишева<sup>1</sup>, С.А. Сходова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова»; Россия, 105064 Москва, Малый Казенный пер., 5А;

<sup>2</sup>Академия постдипломного образования ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр ФМБА России»; Россия, 125371 Москва, Волоколамское шоссе, 91;

<sup>3</sup>ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115522 Москва, Каширское шоссе, 24

**Контакты:** Екатерина Вячеславовна Сорокина [sorokina-cathrine@yandex.ru](mailto:sorokina-cathrine@yandex.ru)

**Введение.** Экспериментальные модели псориаза на животных помогли выяснить функции воспалительных медиаторов, раскрыть вклад врожденных или адаптивных иммунных механизмов, кератиноцитов в развитие и поддержание воспаления при псориазе.

**Цель исследования** – изучить субпопуляционный состав иммунных клеток крови, кожи, лимфоидных органов и сравнить 2 метода изоляции клеток из кожи.

**Материалы и методы.** В исследование включены 46 мышей линии C57BL/6, которые разделены на 2 группы: опытную ( $n = 24$ ) для воспроизведения модели острого псориазоподобного дерматита с помощью имихимод-крема 5 % (62,5 мг/см<sup>2</sup>/сут/мышь, 7 дней) и контрольную ( $n = 22$ ). Оценку тяжести воспаления кожи осуществляли по балльной шкале. На 7-й день исследовали кожу, селезенку, лимфатические узлы (ЛУ), тимус мышей. Для изоляции клеток из кожи применяли метод спонтанной миграции и ферментативной диссоциации с помощью коллагеназы. Оценку субпопуляционной структуры мононуклеарных клеток проводили методом проточной цитометрии с применением моноклональных антител против соответствующих антигенов (CD3, CD4, CD8, CD5, МНС II класса,  $\gamma\delta$ -TCR, CD38, CD80, CD83, CD86, TLR2). Статистическая обработка проведена при помощи программного пакета WinMDI 2.8.

**Результаты.** Показано, что для иммунофенотипирования  $\gamma\delta$ -Т-лимфоцитов, дендритных клеток CD86<sup>+</sup>, CD83<sup>+</sup>, CD83<sup>+</sup>CD86<sup>+</sup> применимы оба метода изоляции клеток кожи. Выявлено снижение экспрессии TLR2 на клетках крови и повышение на клетках ЛУ и кожи. В ЛУ, тимусе отмечено выраженное повышение числа CD38<sup>+</sup>, повышение  $\gamma\delta$ -Т-лимфоцитов – в ЛУ и крови. В коже показана инфильтрация  $\gamma\delta$ -Т-лимфоцитами, CD8<sup>+</sup>- и CD38<sup>+</sup>-клетками.

**Заключение.** Острое псориазоподобное воспаление у мышей сопровождалось повышением количества  $\gamma\delta$ -Т-клеток в крови, ЛУ и коже. Наблюдалась инфильтрация кожи CD8<sup>+</sup>- и CD38<sup>+</sup>-клетками. Оба метода изоляции клеток – метод спонтанной миграции и метод ферментативной диссоциации – оказались применимы для дальнейшего иммунофенотипирования.

**Ключевые слова:** псориаз, животные модели псориаза, имихимод

**Для цитирования:** Ахматова Э.А., Сорокина Е.В., Шубина И.Ж. и др. Клетки врожденного иммунитета в модели острого псориазоподобного воспаления у мышей. Российский биотерапевтический журнал 2023;22(4):43–51. DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2023-22-4-43-51>

## Innate immunity cells in a model of acute psoriasis-like inflammation in mice

Elina A. Akhmatova<sup>1</sup>, Ekaterina V. Sorokina<sup>1,2</sup>, Irina Zh. Shubina<sup>3</sup>, Ekaterina A. Kurbatova<sup>1</sup>, Vera N. Stolpnikova<sup>1</sup>,  
Evgeny O. Kalinichenko<sup>1</sup>, Irina V. Bisheva<sup>1</sup>, Svetlana A. Skhodova<sup>1</sup>

<sup>1</sup>I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Serums, Russian Academy of Medical Sciences; 5A Maly Kazenny lane, Moscow 105064, Russia;

<sup>2</sup>Academy of Postgraduate Education under FGBU “Federal Research and Clinical Center for Specialized Medical Assistance and Medical Technologies of the FMBA of Russia”; 91 Volokolamskoye Shosse, Moscow 125371, Russia;

<sup>3</sup>N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115522, Russia

**Background.** Experimental animal models of psoriasis helped to clarify the functions of inflammatory mediators, to reveal the contribution of innate or adaptive immune mechanisms, keratinocytes to the development and maintenance of inflammation in psoriasis.

**Aim.** To study the subpopulation composition of immune cells of blood, skin, lymphoid organs and compare two methods of isolation of cells from the skin.

**Materials and methods.** The study included 46 mice of the C57BL/6 line, which were divided into 2 groups: experimental ( $n = 24$ ) to reproduce a model of acute psoriasis-like dermatitis using imiquimod cream 5 % (62.5 mg/cm<sup>2</sup>/day/mouse, 7 days) and control ( $n = 22$ ). The severity of skin inflammation was assessed on a point scale. On the 7<sup>th</sup> day, the skin, spleen, lymph nodes, and thymus were examined. To isolate cells from the skin, the method of spontaneous migration and enzymatic dissociation using collagenase was used. The assessment of the subpopulation structure of mononuclear cells (MNCs) was carried out by flow cytometry using monoclonal antibodies against the corresponding antigens (CD3, CD4, CD5, CD8, MHC class II, TCR $\gamma\delta$ , CD38, CD80, CD83, CD86, TLR2). Statistical processing was carried out using the WinMDI 2.8 software package.

**Results.** It has been shown that both methods of isolation of skin cells are applicable for immunophenotyping of  $\gamma\delta$  T-lymphocytes, CD86<sup>+</sup>, CD83<sup>+</sup>, CD83<sup>+</sup>CD86<sup>+</sup> dendritic cells. A decrease in TLR2 expression on blood cells and an increase in lymph node and skin cells were revealed. There was a marked increase in the number of CD38<sup>+</sup> in the lymph nodes, thymus, and an increase in  $\gamma\delta$  T-lymphocytes in the lymph nodes and blood. The infiltration of  $\gamma\delta$  T-lymphocytes, CD8<sup>+</sup> is shown in the skin and CD38<sup>+</sup> cells.

**Conclusion.** Acute psoriasis-like inflammation of mice was accompanied by an increase in the number of  $\gamma\delta$  T cells in the blood, lymph nodes and skin. Infiltration of the skin by CD8<sup>+</sup> and CD38<sup>+</sup> cells was observed. Both methods of cell isolation – the method of spontaneous migration and the method of enzymatic dissociation proved to be applicable for further immunophenotyping.

**Keywords:** psoriasis, animal models of psoriasis, imiquimod

**For citation:** Akhmatova E.A., Sorokina E.V., Shubina I.Zh. et al. Innate immunity cells in a model of acute psoriasis-like inflammation in mice. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2023;22(4): 43–51. DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2023-22-4-43-51>

## Введение

Изучение молекулярных механизмов индукции и развития воспаления на животных моделях позволяет оптимизировать методы лечения различных хронических воспалительных заболеваний. Одним из тяжелых воспалительных заболеваний человека является псориаз. За последние десятилетия расширилось использование животных моделей псориаза и благодаря многим из них были получены ценные данные о патогенезе заболевания. С 2009 г. одной из самых используемых моделей для изучения псориазоподобного воспаления является местное применение агониста TLR 7/8 имихимода у мышей. Воспаление, вызванное имихимодом, имитирует определенные признаки псориаза, демонстрируя развитие иммунного ответа с преобладанием Th17 и IL-23 в качестве ключевого фактора, а также значение плазмитоидных дендритных клеток в роли первичных сенсоров. Эта модель также используется в доклинических исследованиях для оценки потенциальных методов лечения и имеет два главных преимущества – простоту воспроизведения и экономичность [1–3]. Имихимод – (1-(2-метилпропил)-1H-имидазо(4,5c)хинолин-4-амин), имидазохинолин – представляет собой низкомолекулярное соединение, которое является местным иммунным модификатором ответа и активирует факторы как врожденного, так и при-

обретенного иммунитета (особенно Т-хелперы 1-го типа), вызывая противовирусное, противоопухолевое и иммунорегуляторное действие. Механизм действия имихимода включает индукцию цитокинов в коже, которые затем заставляют иммунную систему хозяина распознавать присутствие вирусной инфекции или опухоли. Имихимод является лигандом Toll-подобного рецептора 7 и мощным иммунным активатором для макрофагов, моноцитов и дендритных клеток, что приводит к секреции провоспалительных цитокинов (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-12) и хемокинов. Имихимод также стимулирует NK-клетки, пролиферацию В-клеток, созревание и миграцию клеток Лангерганса – основных антигенпредставляющих клеток кожи. Основные биологические эффекты имихимода опосредованы стимуляцией TLR7 и TLR8, при этом активируется транскрипционный ядерный фактор NF- $\kappa$ B, что приводит к индукции медиаторов воспаления и активации иммунитета. Имихимод вызывает у мышей экспрессию в коже IL-17A, IL-17F и IL-23 и гистопатологические изменения, аналогичные изменениям в коже при псориазе у человека. Модель имихимод-индуцированного воспаления кожи также может быть использована для изучения молекулярного и клеточного патогенеза псориаза, а поиск новых мишеней и путей управления иммунным ответом при воспалении поможет приблизиться к усовершенствованию методов терапии.

## Материалы и методы

Исследование проводилось на самках мышей линии C57BL/6, животные были ранжированы путем случайного распределения на 2 группы. Опытная группа ( $n = 24$ ) — IMQ (imiquimod, имихимод) — составлена для воспроизведения модели псориазоподобного дерматита с помощью индуктора патологии, контрольная группа ( $n = 22$ ) — животные, не получавшие препарат. За 1 день до начала исследования всем животным удаляли шерсть на отрезке площадью, примерно равной  $6 \text{ см}^2$  ( $2 \times 3 \text{ см}$ ), с помощью гипоаллергенного эпилирующего крема. Формирование экспериментальной патологии проведено по методу L. van der Fits и соавт. [3] с дозой индуктора патологии (крем 5 % имихимод)  $62,5 \text{ мг/см}^2$  в день на каждое животное (ежедневная доза  $3,125 \text{ мг}$  активного соединения) в течение 7 дней.

Визуальную оценку степени тяжести псориазоподобного воспаления кожи животных проводили перед 1-м нанесением индуктора и далее ежедневно с использованием адаптированного для мышей индекса площади поражения и тяжести псориаза (Psoriasis Area and Severity Index, PASI) [4–9], используя оценку выраженности эритемы, инфильтрации и шелушения. Степень инфильтрации кожи также оценивалась методом измерения толщины складки с помощью электронного микрометра (Milesee Technology Co., Ltd., Китай). Кровь для иммунологических исследований отбирали в пробирки с гепарином в объеме  $200 \text{ мкл}$  на 7-й день исследования. У лабораторных животных извлекали селезенку, лимфатические узлы (ЛУ) (подмышечные, паховые), тимус, а также получали биоптат кожи размерами  $2 \times 2 \text{ см}$  (в месте формирования патологии, у здоровых мышей — в этой же локализации) для патологоанатомического и иммунологического исследований (иммунофенотипирование (ИФТ) методом проточной цитометрии). Для изоляции клеток из кожи применяли метод спонтанной миграции и ферментативной диссоциации с помощью коллагеназы (коллагеназа тип IV [НПП «ПанЭко», Россия]). Оценка субпулляционной структуры мононуклеарных лейкоцитов (МНЛ) осуществляли методом проточной цитометрии с применением моноклональных антител (eBioscience, США; Miltenyi Biotec, Германия) против соответствующих антигенов (на МНЛ селезенки, ЛУ, тимуса и кожи исследовали уровни экспрессии CD3, CD4, CD5, CD8, МНС II класса, TCR ( $\text{T}\gamma\delta$ ), CD38, CD80, CD83, CD86, TLR2), результаты учитывали на проточном цитометре (FC-500 Beckman Coulter, США). Статистическая обработка материала проведена при помощи программного пакета WinMDI 2.8.

## Результаты исследования

Воспроизведение воспаления кожи достигнуто в опытной группе к 5-му дню, и продолжало усили-

ваться до 7-го дня. Выраженность воспаления визуально оценивалась ежедневно, на 7-й день был завершён курс нанесения индуктора патологии, измеряли массу тела, толщину кожи, проведена окончательная оценка степени выраженности воспалительного процесса в коже. Выраженность эритемы, инфильтрации и шелушения составила соответственно  $10 \pm 2,8$ ;  $3,2 \pm 0,7$  и  $2,4 \pm 0,8$  балла, суммарное значение индекса PASI составило  $15,6 \pm 3,8$  балла, площадь пораженной кожи относительно площади нанесения индуктора патологии —  $80 \pm 20,1 \%$ . В группе контроля выраженность эритемы составила  $0,3 \pm 0,15$  балла, шелушение и суммарное значение индекса PASI —  $0,3 \pm 0,47$  и  $0,6 \pm 0,5$  балла соответственно.

При измерении массы тела мышей в группах на 7-й день по сравнению с 1-м днем выявлено, что в опытной группе масса тела мышей к 7-му дню составила  $18,13 \pm 1,47 \text{ г}$ , имела тенденцию к снижению, хотя достоверных различий не выявлено. В группе контроля масса тела мышей к 7-му дню не изменилась и составила  $20,72 \pm 1,08 \text{ г}$ . По данным литературы, в результате формирования данной патологии при использовании имихимода отмечено снижение веса, что связано прежде всего с обезвоживанием [10].

Толщина кожи мышей в процессе формирования патологии увеличивалась в опытной группе с  $0,71 \pm 0,17$  до  $1,34 \pm 0,49 \text{ мм}$ . В группе контроля толщина кожи не претерпела изменений ( $p < 0,05$ ;  $t$ -тест).

При гистологическом исследовании кожи из очага воспроизведенного дерматита в эпидермисе наблюдали явления акантоза, гиперкератоза, что обуславливает появление шелушения, в единичном случае наблюдали небольшие участки некроза в верхних отделах; в дерме выявлены периваскулярные лимфогистиоцитарные инфильтраты с примесью нейтрофилов. Толщина эпидермиса мышей с патологией превышала таковую intactных мышей в 2,5 раза ( $p < 0,05$ ;  $t$ -тест).

При сравнении иммунофенотипа клеток крови мышей, относящихся к опытной и контрольной группам, обращает на себя внимание то, что основные различия затрагивают клетки, экспрессирующие  $\gamma\delta$ -TCR. У мышей с острым воспалением  $\gamma\delta$ -Т-клеток больше в  $\sim 4,8$  раза ( $38,0 \pm 24,2 \%$  против  $7,9 \pm 0,9 \%$ ) по сравнению с контролем. В то же время у мышей, получавших имихимод, по сравнению с контролем число клеток  $\text{MHCII}^+\text{CD5}^-$  снижено ( $17,3 \pm 1,4 \%$  против  $31,0 \pm 2,9 \%$  в контроле).

При ИФТ клеток, полученных из гомогенатов ЛУ мышей с острым имихимод-индуцированным воспалением, выявлено, что практически все изучаемые параметры достоверно отличались от контрольной группы. Наиболее ярко эти сдвиги видны на примере клеток с фенотипом  $\text{CD38}^+$  — маркером ранней активации — повышение в 21 раз ( $27,6 \pm 4,1 \%$  против

**Таблица 1.** Содержание субпопуляций лейкоцитов периферической крови (ПК), ЛУ, селезенки, тимуса при развитии острого имихимод-индуцированного воспаления (7-й день воспроизведения)

Table 1. The content of subpopulations of peripheral blood (PB) leukocytes, lymph nodes (LN), spleen, thymus in the development of acute imiquimod-induced inflammation (7th day of reproduction)

Объект An object	Группа Group	CD4 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup> CD8a <sup>+</sup>	CD5 <sup>+</sup>	CD5 <sup>+</sup> MHC-II <sup>+</sup>	MHC-II <sup>+</sup> CD5 <sup>-</sup>	CD8a <sup>+</sup>	γδ-TCR	CD38 <sup>+</sup>	CD38 <sup>+</sup> CD80 <sup>+</sup>	CD80 <sup>+</sup>	CD83 <sup>+</sup>	CD83 <sup>+</sup> CD86 <sup>+</sup>	CD86 <sup>+</sup>
		M ± σ, % клеток с экспрессией M ± σ, % of cells with expression												
Кровь Blood	Опытная Experi- mental	19,3 ± 2,9	0,9 ± 0,3	30,2 ± 4,2*	4,2 ± 0,8	17,3 ± 1,4*	14,8 ± 3,3*	38,0 ± 24,2*	31,9 ± 7,2	22,7 ± 8,8	27,4 ± 9,2	2,7 ± 1,2	2,9 ± 1,4	7,5 ± 3,1
	Конт- рольная Control	23,2 ± 4,2	0,7 ± 0,4	39,6 ± 2,7	4,4 ± 0,7	31,0 ± 2,9	20,3 ± 2,9	7,9 ± 0,9	34,6 ± 3,8	—	—	2,8 ± 0,7	2,4 ± 0,9	9,2 ± 1,0
Лим- фати- ческий узел Lymph node	Опытная Experi- mental	48,9 ± 3,6*	50,5 ± 3,4*	60,5 ± 7,1*	4,4 ± 1,3*	22,8 ± 3,4*	58,9 ± 3,8*	82,9 ± 7,3*	27,6 ± 4,1*	23,2 ± 3,3	30,7 ± 3,7	3,0 ± 0,2*	2,4 ± 0,7*	29,7 ± 3,6*
	Конт- рольная Control	29,7 ± 4,2	37,1 ± 3,9	43,0 ± 3,2	2,6 ± 0,6	36,3 ± 3,8	40,6 ± 3,1	5,7 ± 0,8	1,3 ± 0,4	—	—	1,2 ± 0,2	1,2 ± 0,2	48,3 ± 3,7
Селе- зенка Spleen	Опытная Experi- mental	32,0 ± 2,0	0,5 ± 0,4	72,0 ± 3,6*	20,6 ± 1,8*	19,7 ± 2,6*	22,3 ± 2,9*	20,1 ± 3,9*	1,7 ± 0,5*	1,8 ± 0,9	2,5 ± 0,6	0,6 ± 0,3*	0,6 ± 0,3*	8,9 ± 1,0*
	Конт- рольная Control	38,0 ± 3,4	0,2 ± 0,08	81,7 ± 2,3	64,9 ± 2,9	2,2 ± 0,3	43,8 ± 3,9	69,6 ± 2,3	7,2 ± 0,3	—	—	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1	72,1 ± 2,3
Тимус Thymus	Опытная Experi- mental	50,2 ± 5,4*	37,7 ± 5,7*	80,2 ± 4,3	19,5 ± 3,4	7,1 ± 2,9	40,8 ± 4,7*	6,6 ± 1,9*	48,3 ± 5,3*	46,5 ± 6,3	72,1 ± 4,4	2,7 ± 1,1	2,7 ± 1,1	66,3 ± 6,7*
	Конт- рольная Control	36,0 ± 2,7	31,0 ± 1,9	—	—	10,2 ± 0,8	32,6 ± 2,2	3,6 ± 0,4	0,4 ± 0,2	—	—	0,8 ± 0,2	0,8 ± 0,3	27,2 ± 2,1

\* $p < 0,05$  — достоверность различий между параметрами, определяемыми разными методами (U-тест Манна–Уитни).

Примечание. M — средняя арифметическая; σ — стандартное отклонение.

\* $p < 0,05$  — reliability of differences between parameters determined by different methods (Mann–Whitney U test).

Note. M — arithmetic mean; σ — standard deviation.

1,3 ± 0,4 %) и клеток, экспрессирующих  $\gamma\delta$ -TCR, — повышение в 14 раз (82,9 ± 7,3 % против 5,7 ± 0,8 %) (табл. 1). По сравнению с мышами из группы контроля повышенными оказались такие параметры, как CD5<sup>+</sup> — в 1,4 раза (60,5 ± 7,1 % против 43,0 ± 3,2 %), CD5<sup>+</sup>МНСII<sup>+</sup> — в 1,7 раза (4,4 ± 1,3 % против 2,6 ± 0,6 %). Острое воспаление у мышей сопровождалось повышенным накоплением в ЛУ CD4<sup>+</sup>-клеток — повышение в 1,6 раза (48,9 ± 3,6 % против 29,7 ± 4,2 %), CD8a<sup>+</sup> — в 1,4 раза (58,9 ± 3,8 % против 40,6 ± 3,1 %) и CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> — в 1,4 раза (50,5 ± 3,4 % против 37,1 ± 3,9 %). У мышей с острым воспалением помимо этого увеличилось содержание клеток, несущих маркеры дендритных клеток CD83<sup>+</sup> — в 2,5 раза (3,0 ± 0,2 % против 1,2 ± 0,2 %) и CD83<sup>+</sup>CD86<sup>+</sup> — в 2 раза (2,4 ± 0,7 % против 1,2 ± 0,2 %), однако количественное содержание клеток CD86<sup>+</sup> в ЛУ оказалось ниже в 1,6 раза по сравнению с таковым у мышей без воспаления (29,7 ± 3,6 % против 48,3 ± 3,7 %).

При анализе данных, полученных при исследовании селезенки, обращает на себя внимание тот факт, что у мышей с острым воспалением количество некоторых клеточных субпопуляций меньше, чем у мышей из контрольной группы. Например, клеток с фенотипом CD5<sup>+</sup>МНСII<sup>+</sup> меньше в 3,1 раза (20,6 ± 1,8 % против 64,9 ± 2,9 %), клеток CD5<sup>+</sup> — в 1,1 раза (72,0 ± 3,6 % против 81,7 ± 2,3 %). Клеток с фенотипом CD8a<sup>+</sup> и CD38<sup>+</sup> тоже оказалось меньше в селезенке опытных мышей в 2,0 и 4,2 раза соответственно (22,3 ± 2,9 % против 43,8 ± 3,9 %; 1,7 ± 0,5 % против 7,2 ± 0,3 %). Такая же тенденция наблюдается в отношении клеток, несущих CD86<sup>+</sup> (8,9 ± 1,0 % против 72,1 ± 2,3 %) и  $\gamma\delta$ -Т-клеток (20,1 ± 3,9 % против 69,6 ± 2,3 %) — снижение по сравнению с контролем в 8,0 и 3,5 раза. Клеток с фенотипом МНСII<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup> в селезенке мышей с воспалением было больше

в 8,0 раза (19,7 ± 2,6 % против 2,2 ± 0,3 %), а CD4<sup>+</sup>CD8a<sup>+</sup> — в 2,5 раза (0,5 ± 0,4 % против 0,2 ± 0,08 %).

Максимальное отличие наблюдается в отношении клеток, экспрессирующих CD38<sup>+</sup> — в тимусе опытных мышей их содержание достоверно выше в 120 раз (48,3 ± 5,3 % против 0,4 ± 0,2 %). Повышено также содержание клеток с фенотипом CD86<sup>+</sup> (66,3 ± 6,7 % против 27,2 ± 2,1 %),  $\gamma\delta$ -TCR<sup>+</sup> (6,6 ± 1,9 % против 3,6 ± 0,4 %), CD4<sup>+</sup> (50,2 ± 5,4 % против 36,0 ± 2,7 %) в 2,4; 1,8 и 1,4 раза соответственно.

При сравнении экспрессии TLR2 клетками периферической крови мышей показано, что у мышей, получавших имихимод, по сравнению с контролем число клеток TLR2<sup>+</sup> значительно снижено в ~9,8 раза (5,3 ± 3,0 % против 51,9 ± 5,3 %). В ЛУ отмечается повышенная в 4 раза экспрессия TLR2, в селезенке — в 1,5 раза. Что касается кожи, то в очагах с воспроизведенной патологией отмечена повышенная в 2 раза экспрессия данного рецептора (табл. 2).

В коже мышей с воспалением выявлено повышенное количество клеток с фенотипом CD38<sup>+</sup> (59,6 ± 5,6 % против 8,6 ± 2,7 %) и CD8a<sup>+</sup> (53,8 ± 4,9 % против 11,5 ± 2,2 %) в 6,9 и 4,7 раза соответственно. Помимо этих субпопуляций, в коже были повышены уровни клеток с фенотипом МНСII<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup> (3,7 ± 1,0 % против 1,7 ± 0,5 %) и  $\gamma\delta$ -Т-клеток (20,7 ± 3,7 % против 13,1 ± 4,5 %) в 2,2 и 1,6 раза соответственно. Однако некоторые сравниваемые параметры оказались ниже значений контрольной группы. Это относится к клеткам с фенотипом CD83<sup>+</sup> (4,8 ± 0,85 против 14,5 ± 2,3 %), CD83<sup>+</sup>CD86<sup>+</sup> (4,4 ± 1,1 % против 12,7 ± 4,7 %) и CD86<sup>+</sup> (52,3 ± 4,7 % против 66,7 ± 4,1 %) — снижение по сравнению с интактными мышами в 3; 2,9 и 1,3 раза соответственно. Аналогичные изменения касаются содержания CD5<sup>+</sup>МНСII<sup>+</sup> (2,9 ± 0,9 против 8,9 ± 2,8 %) и CD4<sup>+</sup>CD8a<sup>+</sup> (3,6 ± 0,9 % против 6,9 ± 1,2 %) —

**Таблица 2.** Экспрессия TLR2 на клетках ПК, ЛУ, селезенки, тимуса и кожи при развитии острого имихимод-индуцированного воспаления (7-й день воспроизведения)

**Table 2.** TLR2 expression on cells of PB, LN, spleen, thymus and skin during the development of acute imiquimod-induced inflammation (7<sup>th</sup> day of reproduction)

Группа Group	ПК PB	ЛУ LN	Селезенка Spleen	Тимус Thymus	Кожа Skin
	M ± σ, % клеток с экспрессией M ± σ, % of cells with expression				
Опытная Experimental	5,3 ± 3,0*	4,6 ± 1,0*	1,8 ± 1,0*	0,6 ± 0,2	4,8 ± 0,8*
Контрольная Control	51,9 ± 5,3	0,5 ± 0,1	0,1 ± 0,05	0,2 ± 0,2	2,8 ± 0,6

\* $p < 0,05$  — достоверность различий между параметрами, определяемыми разными методами (U-тест Манна—Уитни).

**Примечание.** M — средняя арифметическая; σ — стандартное отклонение.

\* $p < 0,05$  — reliability of differences between parameters determined by different methods (Mann—Whitney U test).

Note. M — arithmetic mean; σ — standard deviation.



**Таблица 3.** Содержание субпопуляций лейкоцитов кожи из очагов острого имихимод-индуцированного воспаления (7-й день воспроизведения, метод изоляции клеток — диссоциация с использованием коллагеназы)

Table 3. The content of subpopulations of skin leukocytes from foci of acute imiquimod-induced inflammation (7<sup>th</sup> day of reproduction, cell isolation method — dissociation using collagenase)

Группа Group	CD4 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup> CD8a <sup>+</sup>	CD5 <sup>+</sup>	CD5 <sup>+</sup> MHC-II <sup>+</sup>	MHC-II <sup>+</sup> CD5 <sup>+</sup>	CD8a <sup>+</sup>	CD38 <sup>+</sup>	γδ-TCR	CD38 <sup>+</sup> CD80 <sup>+</sup>	CD80 <sup>+</sup>	CD83 <sup>+</sup>	CD83 <sup>+</sup> CD86 <sup>+</sup>	CD86 <sup>+</sup>
	M ± σ, %												
Опытная Experimental	5,9 ± 1,5	3,6 ± 0,9*	71,8 ± 4,4	2,9 ± 0,9*	3,7 ± 1,0*	53,8 ± 4,9*	59,6 ± 5,6*	20,7 ± 3,7*	2,8 ± 1,0	7,4 ± 0,9	4,8 ± 0,8*	4,4 ± 1,1*	52,3 ± 4,7*
Контрольная Control	—	6,9 ± 1,2	71,6 ± 19,5	8,9 ± 2,8	1,7 ± 0,5	11,5 ± 2,2	8,6 ± 2,7	13,1 ± 4,5	—	—	14,5 ± 2,3	12,7 ± 4,7	66,7 ± 4,1

\* $p < 0,05$  — достоверность различий между параметрами, определяемыми разными методами (U-тест Манна—Уитни).

**Примечание.** M — средняя арифметическая; σ — стандартное отклонение.

\* $p < 0,05$  — reliability of differences between parameters determined by different methods (Mann—Whitney U test).

Note. M — arithmetic mean; σ — standard deviation.

количество снижено в 3,0 и 1,9 раза соответственно по сравнению с контролем (табл. 3).

При изоляции клеток из кожи методом спонтанной миграции на сроках 24 ч инкубации отмечается по сравнению с методом ферментативного расщепления кожи с помощью коллагеназы повышение числа клеток с дифференцировочными маркерами CD5<sup>+</sup>, CD8a<sup>+</sup>, CD38<sup>+</sup>, CD86<sup>+</sup> в 1,3–2 раза (табл. 4). В то же время использование коллагеназы для расщепления кожи способствовало на сроках 24 ч инкубации повышению выделения клеток с экспрессией CD4<sup>+</sup> и MHC-II<sup>+</sup>CD5. Таким образом, вероятно, коллагеназа оказывает негативное/повреждающее влияние на маркеры активированных лимфоцитов и В-клеток CD5<sup>+</sup>, цитотоксических Т-лимфоцитов CD8a<sup>+</sup>, маркеров активации CD38<sup>+</sup>. При этом коллагеназа не оказала значимого действия на маркеры CD86<sup>+</sup>, маркеры зрелых дендритных клеток CD83<sup>+</sup>, CD83<sup>+</sup>CD86<sup>+</sup>, а также γδ-Т-лимфоцитов γδ-TCR и TLR2.

Показатели ИФТ клеток, полученных в процессе спонтанной миграции, существенно не различались при проведении проточной цитометрии через 24 и 72 ч. При получении суспензии клеток кожи при ферментативном переваривании коллагеназой отмечены существенные различия в числе клеток, экспрессирующих маркеры γδ-TCR, MHC-II<sup>+</sup>-клеток, CD8a<sup>+</sup>, CD5<sup>+</sup>, CD5<sup>+</sup>MHC-II<sup>+</sup>, а именно отмечено снижение экспрессии через 48 и 72 ч. Таким образом, для ИФТ γδ-Т-лимфоцитов, дендритных клеток CD86<sup>+</sup>, CD83<sup>+</sup>, CD83<sup>+</sup>CD86<sup>+</sup> подходят оба из исследуемых методов выделения клеток.

При спонтанной миграции клеток из кожи не отмечено повышения числа клеток с течением времени (по сравнению с периодами 24 и 72 ч). При этом с течением времени (48 ч) при ферментативном перева-

ривании кожи коллагеназой, по всей вероятности, происходит расщепление маркеров активированных В-клеток CD5<sup>+</sup>, цитотоксических Т-лимфоцитов CD8a<sup>+</sup>, маркеров активации CD38<sup>+</sup> или число этих клеток снижается.

### Заключение

Таким образом, при изучении клеточного состава крови и лимфоидных органов при псориазоподобном воспалении в опытной группе (IMQ) отмечены изменения в клеточном составе МНЛ всех исследуемых лимфоидных органов. В регионарных ЛУ, тимусе и коже зарегистрировано выраженное повышение числа клеток с молекулой адгезии CD38, причем в тимусе этот показатель был выше в 120 раз по сравнению с контролем, в ЛУ — в 21 раз, в коже — в 7 раз. Роль CD38 в иммунных клетках варьируется от модуляции дифференцировки клеток до эффекторных функций при воспалении, где CD38 может регулировать аттракцию клеток, высвобождение цитокинов и доступность никотинамидадениндинуклеотида. Отсутствие единого мнения в отношении роли CD38 в индукции или, напротив, в ингибировании воспаления подчеркивает необходимость проведения дополнительных исследований для понимания биологии CD38 и его вклада в воспаление и аутоиммунитет. Изначально CD38 идентифицирован как белок, экспрессирующийся на поверхности Т-клеток, но сегодня известно, что функция CD38 выходит за рамки одного типа клеток. Именно поэтому CD38 предложен в качестве прогностического маркера при некоторых патологиях. Однако локализация CD38 на большом спектре клеток и его многочисленные функции создают трудности для понимания вклада CD38 в патологию и гомеостаз [11].

**Таблица 4.** Содержание субпопуляций мононуклеарных лейкоцитов и экспрессии TLR2 в зависимости от методов изоляции клеток кожи из очагов острого имихимод-индуцированного воспаления

Table 4. The content of mononuclear leukocytes subpopulations and TLR2 expression depending on the methods of isolation of skin cells from foci of acute imiquimod-induced inflammation

Метод Method	TLR2	CD4 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup> CD8a <sup>+</sup>	CD5 <sup>+</sup>	CD5 <sup>+</sup> MHC-II <sup>+</sup>	MHC-II <sup>+</sup> CD5 <sup>-</sup>	γδ-TCR	CD8a <sup>+</sup>	CD38 <sup>+</sup>	CD83 <sup>+</sup>	CD83 <sup>+</sup> CD86 <sup>+</sup>	CD86 <sup>+</sup>
	M ± σ, %											
Спонтанная миграция 24 ч Spontaneous migration 24 h	5,7 ± 0,7	3,6 ± 0,9	3,1 ± 0,6	67,9 ± 1,9*	2,9 ± 0,8*	4,9 ± 2,2*	69,5 ± 17,4	58,3 ± 18,7*	68,3 ± 15,5*	5,6 ± 2,4	8,2 ± 4,7	49,3 ± 9,9*
Коллагеназа 24 ч Collagenase 24 h	4,4 ± 1,0	6,8 ± 0,8	4,9 ± 0,3	35,2 ± 1,8	6,1 ± 2,3	20,4 ± 0,9	71,5 ± 2,3	32,2 ± 0,6	24,1 ± 9,1	8,9 ± 2,1	6,9 ± 0,8	35,5 ± 5,2
Контроль коллагеназа 24 ч Collagenase control 24 h	12,7 ± 4,7	—	6,9 ± 1,2	71,6 ± 19,5	8,9 ± 2,8	1,7 ± 0,5	66,7 ± 4,1	11,5 ± 2,2	8,6 ± 2,7	—	—	14,5 ± 2,3
Спонтанная миграция 72 ч Spontaneous migration 72 h	6,1 ± 0,2*	6,4 ± 0,5**	5,0 ± 0,7**	68,3 ± 8,7*	3,0 ± 0,7	3,0 ± 0,5	69,0 ± 2,5*	43,4 ± 3,2*	58,1 ± 1,6*	7,9 ± 0,7	6,5 ± 0,5	41,9 ± 1,5*
Коллагеназа 72 ч Collagenase 72 h	2,8 ± 0,6	2,7 ± 0,5	2,3 ± 0,6	26,0 ± 1,2	2,1 ± 0,3	3,0 ± 0,9	23,2 ± 6,0	22,0 ± 2,1	27,4 ± 2,6	7,1 ± 0,5	6,1 ± 0,4	36,0 ± 2,6

\* $p < 0,05$  — достоверность различий между параметрами, определяемыми разными методами (U-тест Манна—Уитни); \* $p < 0,05$  — достоверность различий между параметрами, определяемыми на разных сроках инкубации (Mann—Whitney U test).

Примечание. M — средняя арифметическая; σ — стандартное отклонение.

\* $p < 0,05$  — the reliability of the differences between the parameters determined at different incubation periods (Mann—Whitney U test); \* $p < 0,05$  — reliability of differences between parameters determined by different methods (Mann—Whitney U test).

Note. M — arithmetic mean; σ — standard deviation.

В исследуемой модели острого имихимод-индуцированного псориазоподобного воспаления отмечено повышение  $\gamma\delta$ -Т-лимфоцитов в ЛУ и крови. В коже показана инфильтрация  $\gamma\delta$ -Т-лимфоцитами, CD8<sup>+</sup>-Т-клетками и клетками с экспрессией CD38. При изучении особенностей экспрессии Toll-подобных рецепторов в исследуемой модели показано снижение экспрессии TLR2 на клетках крови и повышение экспрессии этого рецептора клетками ЛУ и клетками кожи.

Сравнение влияния метода диссоциации кожи на изоляцию клеток показало: для ИФТ  $\gamma\delta$ -Т-лимфоцитов, дендритных клеток CD86<sup>+</sup>, CD83<sup>+</sup>, CD83<sup>+</sup>CD86<sup>+</sup>

применимы оба исследуемых метода изоляции клеток кожи — посредством спонтанной миграции и с помощью ферментативной диссоциации с использованием коллагеназы.

В данной статье представлены результаты влияния агониста TLR 7/8 имихимода на формирование клеточного инфильтрата в коже при воспроизведении модели острого псориазоподобного воспаления у мышей, а также показано действие имихимода на состав регионарных ЛУ и системное действие на селезенку и тимус. Полученные данные указывают на необходимость дальнейших исследований в этом направлении.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Moos S., Mohebiany A.N., Waisman A., Kurschus F.C. Imiquimod-induced psoriasis in mice depends on the IL-17 signaling of keratinocytes. *J Invest Dermatol* 2019;139(5):1110–7. DOI: 10.1016/j.jid.2019.01.006
2. Singh T.P., Zhang H.H., Hwang S.T., Farber J.M. IL-23- and imiquimod-induced models of experimental psoriasis in mice. *Curr Protoc Immunol* 2019;125(1):e71. DOI: 10.1002/cpim.71
3. van der Fits L., Mourits S., Voerman J.S. et al. Imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation in mice is mediated via the IL-23/IL-17 axis. *J Immunol* 2009;182(9):5836–45. DOI: 10.4049/jimmunol.0802999
4. Sun J., Zhao Y., Hu J. Curcumin inhibits imiquimod-induced psoriasis-like inflammation by inhibiting IL-1 $\beta$  and IL-6 production in mice. *PLoS One* 2013;8(6):e67078. DOI: 10.1371/journal.pone.0067078
5. Di T.T., Ruan Z.T., Zhao J.X. et al. Astilbin inhibits Th17 cell differentiation and ameliorates imiquimod-induced psoriasis-like skin lesions in BALB/c mice via Jak3/Stat3 signaling pathway. *Int Immunopharmacol* 2016;32:32–8. DOI: 10.1016/j.intimp.2015.12.035
6. Baek J.O., Byamba D., Wu W.H. et al. Assessment of an imiquimod-induced psoriatic mouse model in relation to oxidative stress. *Arch Dermatol Res* 2012;304(9):699–06. DOI: 10.1007/s00403-012-1272-y
7. Meng Y., Wang M., Xie X. et al. Paeonol ameliorates imiquimod-induced psoriasis-like skin lesions in BALB/c mice by inhibiting the maturation and activation of dendritic cells. *Int J Mol Med* 2017;39(5):1101–10. DOI: 10.3892/ijmm.2017.2930
8. Zhao J., Di T., Wang Y. et al. Multi-glycoside of Tripterygium wilfordii Hook. f. ameliorates imiquimod-induced skin lesions through a STAT3-dependent mechanism involving the inhibition of Th17-mediated inflammatory responses. *Int J Mol Med* 2016;38(3):747–57. DOI: 10.3892/ijmm.2016.2670
9. Li Y., Zhang G., Chen M. et al. Rutaecarpine inhibited imiquimod-induced psoriasis-like dermatitis via inhibiting the NF- $\kappa$ B and TLR7 pathways in mice. *Biomed Pharmacother* 2019;109:1876–83. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.10.062
10. Guillaume P., Lepage M., Goineau S. et al. Preclinical evaluation of anti-psoriasis activity using the imiquimod induced inflammation test in the mouse. *J Invest Dermatol* 2015;135(Suppl. 2):078.
11. Piedra-Quintero Z.L., Wilson Z., Nava P., Guerau-de-Arellano M. CD38: An immunomodulatory molecule in inflammation and autoimmunity. *Front Immunol* 2020;11:597959. DOI: 10.3389/fimmu.2020.597959

### Вклад авторов

Э.А. Ахматова: анализ данных, написание текста рукописи, оформление рукописи;  
 Е.В. Сорокина: дизайн исследования, написание текста рукописи, анализ рукописи;  
 И.Ж. Шубина: обзор источников литературы, общая коррективная текста;  
 С.А. Сходова, Е.А. Курбатова: дизайн исследования, получение данных;  
 В.Н. Столпникова, Е.О. Калиниченко: получение и анализ данных;  
 И.В. Бишева: анализ данных, оформление рукописи.

### Authors' contribution:

E.A. Akhmatova: data analysis, manuscript writing, design of the manuscript;  
 E.V. Sorokina: study design, writing the text of the manuscript, analysis of the manuscript;  
 I.Zh. Shubina: literature review, text editing;  
 S.A. Skhodova, E.A. Kurbatova: research design, data acquisition;  
 V.N. Stolpnikova, E.O. Kalinichenko: data acquisition and analysis;  
 I.V. Bisheva: data analysis, manuscript design.



**ORCID авторов / ORCID of authors**

Э.А. Ахматова / E.A. Akhmatova: <https://orcid.org/0000-0002-9073-5291>

Е.В. Сорокина / E.V. Sorokina: <https://orcid.org/0000-0002-1188-6578>

И.Ж. Шубина / I.Zh. Shubina: <https://orcid.org/0000-0002-9374-3158>

Е.А. Курбатова / E.A. Kurbatova: <https://orcid.org/0000-0002-0282-4471>

В.Н. Столпникова / V.N. Stolpnikova: <https://orcid.org/0000-0001-9363-2274>

Е.О. Калинин / E.O. Kalinichenko: <https://orcid.org/0000-0002-0048-3968>

И.В. Бишева / I.V. Bisheva: <https://orcid.org/0000-0002-8143-7356>

С.А. Сходова / S.A. Skhodova: <https://orcid.org/0000-0002-2342-9307>

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Финансирование.** Исследование проведено без спонсорской поддержки.

**Funding.** The study was performed without external funding.

**Соблюдение правил биоэтики.** Исследование выполнено в соответствии с этическими нормами обращения с животными, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и иных научных целей.

**Compliance with principles of bioethics.** The study was performed in accordance with ethical principles adopted by the European Convention or the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes.

Статья поступила: 18.07.2023. Принята в печать: 13.10.2023.

Article received: 18.07.2023. Accepted for publication: 13.10.2023.