

Т.Ю. Мушкарина¹, Е.Г. Кузьмина¹, Л.Ю. Гривцова^{1,2}, С.А. Иванов^{1,3}, А.Д. Каприн^{3,4,5}

ВЛИЯНИЕ ГАММА-ИЗЛУЧЕНИЯ НА РЕГУЛЯТОРНЫЕ Т-КЛЕТКИ В ТЕСТАХ *IN VITRO*

¹ Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба – филиал Национального медицинского исследовательского центра радиологии Минздрава России, Обнинск

² Обнинский институт атомной энергетики – филиал Национального исследовательского ядерного университета «МИФИ», Обнинск

³ Российский университет дружбы народов им. Патриса Лумумбы, Москва

⁴ Национальный медицинский исследовательский центр радиологии Минздрава России, Обнинск

⁵ Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена – филиал Национального медицинского исследовательского центра радиологии Минздрава России, Москва

Контактное лицо: Татьяна Юрьевна Мушкарина, e-mail: jewelatany@gmail.com

РЕФЕРАТ

Цель: Определить чувствительность Тreg-клеток к различным дозам γ -излучения (2, 4 и 8 Гр) *in vitro* в первичных культурах лимфоцитов от практически здоровых людей и пациентов с неходжкинскими лимфомами с учетом влияния фактора времени и сравнить их реактивность с другими популяциями лимфоцитов.

Материал и методы: Исследованы первичные культуры лимфоцитов периферической крови шести здоровых доноров и пяти пациентов с неходжкинскими лимфомами. Клетки облучали в дозах 2, 4 и 8 Гр и культивировали до 6 сут. Идентификация Тreg-клеток (CD45⁺CD4⁺CD25⁺CD127^{low/}) и других популяций лимфоцитов (Т-клетки, Т-хелперы, Т-цитотоксические клетки, В- и НК-клетки) проводилась методом многоцветной проточной цитофлуориметрии. Статистический анализ данных выполнен с использованием U-критерия Манна–Уитни для попарного сравнения и критерия Краскела–Уоллиса для множественного сравнения.

Результаты: В обеих группах (практически здоровые люди и пациенты с неходжкинскими лимфомами) не выявлено статистически значимых изменений процентного и абсолютного количества Тreg-клеток в ответ на облучение в исследуемых дозах ($p > 0,05$). Однако в культуре лимфоцитов при неходжкинских лимфомах отмечена тенденция к увеличению их процентной доли при 8 Гр (в 1,3 раза, $p = 0,06$). Динамика Тreg-клеток оказалась зависимой от длительности культивирования. У практически здоровых людей абсолютное число Тreg-клеток резко снижалось к 6 сут (в 11,5 раз относительно 1 сут, $p < 0,05$). У пациентов с неходжкинскими лимфомами убыль происходила быстрее, достигая значимых значений к 3 сут (в 2,2 раза, $p < 0,05$) и была особенно выражена к 5-ым сут (в 10 раз, $p < 0,05$), что может быть связано с дополнительным супрессивным действием опухолевых В-клеток. При сравнительном анализе с другими лимфоцитами в группе практически здоровых людей В-клетки оказались наиболее радиочувствительными; Т-цитотоксические клетки и НК-клетки демонстрировали наибольшую резистентность. Тreg-клетки показали среднюю чувствительность, будучи также более устойчивыми, чем общая популяция Т-хелперов. В группе пациентов с неходжкинскими лимфомами наибольшей радиочувствительностью, наоборот, обладали НК-клетки, что может рассматриваться как потенциально неблагоприятный фактор снижения противоопухолевой реактивности НК-клеток при облучении.

Заключение: Исследование в тестах *in vitro* показало среднюю устойчивость Тreg-клеток к γ -излучению в дозах 2, 4 и 8 Гр. Для точной оценки воздействия ионизирующего излучения на Тreg-клетки необходимо учитывать как дозовые характеристики, так и клеточную кинетику во времени после облучения, а также наличие патологического процесса.

Ключевые слова: неходжкинские лимфомы, гамма-излучение, регуляторные Т-клетки, популяции лимфоцитов, тесты *in vitro*

Для цитирования: Мушкарина Т.Ю., Кузьмина Е.Г., Гривцова Л.Ю., Иванов С.А., Каприн А.Д. Влияние гамма-излучения на регуляторные Т-клетки в тестах *in vitro* // Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2026. Т. 71. № 3. С. 53–59. DOI:10.33266/1024-6177-2026-71-3-53-59

T.Yu. Mushkarina¹, E.G. Kuzmina¹, L.Yu. Grivtsova^{1,2}, S.A. Ivanov^{1,3}, A.D. Kaprin^{3,4,5}

The Effect of Gamma Radiation on Regulatory T Cells *in Vitro*

¹ A.F. Tsyb Medical Radiological Research Centre – branch of the National Medical Research Radiological Centre, Obninsk, Russia

² National Research Nuclear University MEPhI, Obninsk, Russia

³ Peoples Friendship University of Russia, Moscow, Russia

⁴ National Medical Research Radiological Centre, Obninsk, Russia

⁵ P.A. Hertsen Moscow Oncology Research Institute – branch of the National Medical Research Radiological Centre, Moscow, Russia

Contact person: T.Yu. Mushkarina, e-mail: jewelatany@gmail.com

ABSTRACT

Purpose: To determine the sensitivity of T-regulatory (Treg) to various doses of γ -radiation (2, 4, and 8 Gy) *in vitro* in primary lymphocyte cultures from healthy individuals and patients with non-Hodgkin's lymphomas, to evaluate the effect of the time factor, and to compare their reactivity with other lymphocyte subsets.

Material and methods: Primary peripheral blood lymphocyte cultures from six healthy individuals and five patients with non-Hodgkin's lymphomas were studied. The cells were irradiated at doses of 2, 4, and 8 Gy and cultured for up to 6 days. Identification of Treg cells (CD45⁺CD4⁺CD25⁺CD127^{low}) and other lymphocyte subsets (T cells, T helper cells, T cytotoxic cells, B and NK cells) was performed by multicolored flow cytometry. Statistical analysis of the data was performed using the Mann-Whitney U-test for pairwise comparison and the Kruskal-Wallis test for multiple comparison.

Results: There were no statistically significant changes in the percentage and absolute number of Treg cells in response to radiation at the studied doses in both groups (healthy individuals and patients with non-Hodgkin's lymphoma), $p > 0.05$. However, in the culture of lymphocytes in non-Hodgkin's lymphomas, there was a tendency to increase their percentage at 8 Gy (1.3-fold, $p = 0.06$). The dynamics of Treg cells were dependent on the duration of cultivation. In healthy individuals, the absolute number of Treg cells decreased sharply by day 6 (11.5 times compared to day 1, $p < 0.05$). In patients with non-Hodgkin's lymphomas, the decrease occurred faster, reaching significant values by day 3 (2.2 times, $p < 0.05$) and especially pronounced by day 5 (10-fold, $p < 0.05$), which may be due to the additional suppressive effect of tumor B cells. In a comparative analysis with other lymphocyte subsets in a group of healthy individuals, B cells were the most radiosensitive, while T-cytotoxic cells and NK cells showed the greatest resistance. Treg cells showed average sensitivity, being also more resistant than the general population of T helper cells. In the group of patients with non-Hodgkin's lymphomas, NK cells, on the contrary, had the greatest radiosensitivity, which is potentially an unfavorable factor for antitumor immunity.

Conclusion: The *in vitro* study demonstrated intermediate resistance of Treg cells to gamma radiation at doses of 2, 4, and 8 Gy. Accurate assessment of the effects of ionizing radiation on Treg cells requires consideration of both dose characteristics and cellular kinetics over time following irradiation, as well as the presence of a pathological process.

Keywords: non-Hodgkin's lymphoma, gamma radiation, regulatory T cells, lymphocyte subsets, *in vitro* tests

For citation: Mushkarina TYu, Kuzmina EG, Grivtsova LYu, Ivanov SA, Kaprin AD. The Effect of Gamma Radiation on Regulatory T Cells *in Vitro*. Medical Radiology and Radiation Safety. 2026;71(3):53–59. DOI:10.33266/1024-6177-2026-71-3-53-59

Введение

Регуляторные Т-клетки (Treg) – это ключевая минорная популяция лимфоцитов, важнейшая функция которой – контроль высоты иммунного ответа. Эти клетки, в первую очередь, защищают собственные ткани организма от аутоиммунного повреждения. Однако повышение их уровня создает предпосылки для развития злокачественных новообразований, причем опухолевые клетки по мере формирования и роста опухоли приспосабливаются использовать иммуносупрессию, вызываемую Treg-клетками, не только в собственном микроокружении, но и на системном уровне, способствуя прогрессированию и метастазированию опухоли [1].

Выявленная роль Treg-клеток в создании противоопухолевой иммунной толерантности делает их перспективной терапевтической мишенью. Стратегии, направленные на модуляцию и истощение Treg-клеток с помощью иммунотерапии, включая комбинирование ее с лучевой терапией, представляют собой многообещающие подходы для преодоления иммуносупрессии и улучшения эффективности лечения онкологических заболеваний [2]. Следовательно, изучение возможностей регуляции численности и функциональной активности Treg-клеток, в том числе при применяемых методах терапии, несомненно, относится к приоритетным исследовательским направлениям.

Лучевая терапия, помимо цитотоксического действия на опухолевые клетки, вызывает широкий спектр изменений в иммунной системе, значение которых активно изучается. Тем не менее, имеющиеся сведения о влиянии ионизирующего излучения на численность и функциональную активность Treg-клеток по-прежнему ограничены и противоречивы [3]. В экспериментах на мышцах линии C57BL/6 показано, что после тотального облучения в дозах 2 и 5 Гр, или локального облучения в дозах 10 и 20 Гр в различных органах и тканях мышечной обнаружено повышение относительного или абсолютного количества Treg-клеток по сравнению с другими типами лимфоцитов [4–7]. Эти данные свидетельствуют в пользу относительной радиорезистентности Treg-клеток. Однако в другой работе получены противоположные

результаты, указывающие на их радиочувствительность: отмечено значительное снижение уровня Treg-клеток в лимфоузлах на 10-й и 12-й день после тотального облучения мышечной в дозе 1,25 Гр [8]. Также показано более выраженное снижение количества Treg-клеток относительно общего числа Т-клеток в периферической крови и микроокружении опухоли через 4–6 дней после локального облучения меланомы мышечной суммарной очаговой дозой 42,5 Гр (5 фракций по 8,5 Гр) [9].

Результаты немногочисленных клинических исследований также неоднозначны. В пользу относительной радиорезистентности свидетельствуют данные сравнения различных режимов неoadьювантной химиолучевой терапии рака шейки матки с более низкой и более высокой суммарной очаговой дозой, в которых установлено, что с увеличением подведенной дозы пропорция Treg-клеток в дренирующих лимфатических узлах оставалась неизменной, несмотря на снижение количества Т-хелперов [10]. При неoadьювантной лучевой терапии рака мочевого пузыря наблюдали повышение процента опухолевых инфильтрирующих Treg-клеток (в отличие от группы без применения лучевой терапии) [11]. В противоположность этому, после стереотаксической лучевой терапии немелкоклеточного рака легкого (суммарная очаговая доза 48 Гр, фракции по 6–8 Гр) обнаружено уменьшение пропорции циркулирующих Treg-клеток [12]. Вариабельность получаемых результатов, вероятно, обусловлена множеством факторов, включая тип онкологического заболевания, различия в дозиметрии (доза, тип излучения, облучаемый объем), фактор времени (временной интервал между облучением и оценкой клеточной популяции), различиями методологических подходов и другими причинами [1, 3].

Несогласованность данных о влиянии ионизирующего излучения на Treg-клетки подчеркивает необходимость проведения дальнейших исследований для оценки возможности включения иммунологических подходов для повышения эффективности лучевой или комбинированной терапии.

Цель данного исследования – в первичных культурах лимфоцитов *in vitro* определить чувствительность Treg-

клеток к разным дозам облучения в норме и при лимфопротеративных заболеваниях с оценкой действия фактора времени и сравнить их реактивность на облучение с другими типами лимфоцитов. В связи с поставленной целью сформулированы и решены следующие задачи: исследовать выживаемость Трег-клеток в норме (у практически здоровых людей) и при неходжкинских лимфомах в первичной культуре лимфоцитов в зависимости от дозы облучения (0, 2, 4 и 8 Гр); оценить выживаемость Трег-клеток в норме (у практически здоровых людей) и при неходжкинских лимфомах в первичной культуре лимфоцитов в зависимости от фактора времени (продолжительности культивирования); сопоставить чувствительность основных субпопуляций лимфоцитов: Трег-клеток, Т-клеток, Т-хелперов, Т-цитотоксических клеток, В- и НК-клеток к разным дозам облучения (0, 2, 4 и 8 Гр).

Материал и методы

Исследования проведены на первичных культурах лимфоцитов периферической крови. Изучены результаты двух групп обследованных людей. В первую группу вошли данные шести практически здоровых людей в возрасте от 19 до 76 лет (медиана возраста 36 (31–46) лет). Во вторую – пять пациентов с неходжкинскими лимфомами: четыре с хроническим лимфоцитарным лейкозом и один с CD5-негативной В-клеточной лимфомой. Возраст пациентов во второй группе варьировал от 53 до 70 лет (медиана 60 (53–65) лет).

Выделение мононуклеарных клеток осуществляли методом центрифугирования на градиенте плотности фиколл-урографин (1,077 г/см³).

Для изучения радиочувствительности Трег-клеток и других популяций лимфоцитов выполнено облучение выделенных клеток на гамма-терапевтическом аппарате «Рокус-М» в дозах 2, 4 и 8 Гр. Этот диапазон доз позволяет оценить и сопоставить выживаемость популяций лимфоцитов в течение нескольких ближайших суток после облучения. Мощность дозы γ -излучения составляла 1,17 Гр/мин для образцов от практически здоровых доноров и 0,98 Гр/мин для образцов от пациентов с лимфопротеративными заболеваниями. В качестве контрольной группы использовали необлученные мононуклеарные клетки (0 Гр).

Клетки культивировали в среде RPMI-1640 с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки, гентамицина (400 мкг/мл) и рекомбинантного IL-2 (100 МЕ/мл). Культивирование проводили без смены среды, что моделировало условия конкуренции клеток за ограниченные питательные вещества, необходимые им для поддержания жизнеспособности. Для группы практически здоровых людей оценку динамики клеток лимфоцитарного пула после облучения проводили на 1, 2, 3, 4 (2 донора) и 1, 3, 6 (4 донора) сут их инкубации в концентрации $1,0 \times 10^6$ кл/мл при 37°C. Клетки пациентов с лимфопротеративными заболеваниями инкубировали при той же температуре (37°C) в течение 1, 3 и 5 сут при средней концентрации клеток $1,2 \times 10^6$ кл/мл.

Трег-клетки идентифицированы по экспрессии характерных мембранных молекул CD45⁺CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-} с помощью метода многоцветной проточной цитофлуориметрии (проточный цитометр – FACS Canto II, BD Biosciences, США). Относительное содержание основных субпопуляций лимфоцитов (CD3⁺CD19⁻Т-клетки, CD3⁺CD4⁺Т-хелперы, CD3⁺CD8⁺Т-цитотоксические лимфоциты, CD19⁺CD3⁻В-клетки и CD16⁺CD3⁻НК-клетки) определено с помощью моноклональных антител к соответствующим кластерам дифференцировки.

Для подсчета абсолютного числа клеток каждой анализируемой популяции использовался двухплатформенный метод, основанный на данных количества лимфоцитов, полученных в камере Горяева.

Данные были систематизированы в программе Microsoft Excel 2010. Статистический анализ выполнен в программе STATISTICA 8.0 (Stat Soft). Количественные показатели представлены в виде медианы (Me) и квартилей (Q₁, Q₃) в связи с большим разбросом и несоответствием значений нормальному распределению. Межгрупповые различия оценены непараметрическим критерием Краскела–Уоллиса. При выявлении статистически значимых различий были проведены попарные сравнения с использованием U-критерия Манна–Уитни. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$. Наличие статистической тенденции констатировали при p -значениях в диапазоне от 0,06 до 0,1.

Результаты и обсуждение

1. Выживаемость Трег-клеток в зависимости от дозы облучения (0, 2, 4 и 8 Гр), исследованная в первичной культуре лимфоцитов

1.1. Группа практически здоровых людей

Выживаемость Трег-клеток референсной группы (практически здоровые люди) для каждой дозы облучения (0, 2, 4 и 8 Гр) приведена в табл. 1 по суммарным данным содержания их в общем объеме собранных лимфоцитов за весь период культивирования (от 0 до 6 сут).

Таблица 1

Выживаемость Трег-клеток в норме (практически здоровые люди) после облучения (2, 4, 8 Гр) и в необлученном контроле (0 Гр) при культивировании лимфоцитов *in vitro*

Survival of Treg cells in normal (practically healthy people) after irradiation (2, 4, 8 Gy) and in non-irradiated control (0 Gy) during *in vitro* lymphocyte culture

№ п/п	Доза облучения, Гр	Трег-клетки, %		Трег-клетки, абс., 10 ⁹ кл/л	
		Me (Q ₁ , Q ₃)	n	Me (Q ₁ , Q ₃)	n
1	0	7,2 (5,5, 9,6)	20	0,023 (0,016, 0,042)	20
2	2	7,0 (5,7, 8,4)	20	0,023 (0,015, 0,040)	20
3	4	7,6 (5,8, 8,9)	20	0,018 (0,012, 0,035)	20
4	8	7,5 (5,1, 10,4)	20	0,014 (0,008, 0,031)	20

Исследование не выявило статистически значимого воздействия ионизирующего излучения на популяцию Трег-клеток. У практически здоровых людей при дозах облучения 2, 4 и 8 Гр не обнаружено преобладания прироста над их гибелью за весь период наблюдения. Выраженной динамики ни процентного ($H=0,46$, $df=3$, $p=0,93$), ни абсолютного числа ($H=2,50$, $df=3$, $p=0,48$) этих клеток не отмечено. Однако, несмотря на высокую индивидуальную вариабельность значений Трег-клеток в норме, медиана их абсолютного числа при дозе облучения 8 Гр была в 1,6 раза меньше (0,014 (0,008, 0,031) × 10⁹ кл/л), чем в группе контроля, 0 Гр (0,023 (0,016, 0,042) × 10⁹ кл/л). Таким образом, при минимальных условиях, поддерживающих выживаемость культивируемых лимфоцитов, полученных от практически здоровых людей, преобладание гибели над пролиферацией Трег-клеток выявлено в виде тенденции только при облучении в дозе 8 Гр.

1.2. Группа пациентов с неходжкинскими лимфомами

В табл. 2 представлены данные, характеризующие выживаемость Трег-клеток при неходжкинских лимфо-

Таблица 2

Выживаемость Трег-клеток при неходжкинских лимфомах после облучения (2, 4, 8 Гр) и в необлученном контроле (0 Гр) при культивировании лимфоцитов *in vitro*
Survival of Treg cells in non-Hodgkin's lymphomas after irradiation (2, 4, 8 Gy) and in non-irradiated control (0 Gy) during *in vitro* lymphocyte culture

№ п/п	Доза облучения, Гр	Трег-клетки, %		Трег-клетки, абс., 10 ⁹ кл/л	
		Me (Q ₁ , Q ₃)	n	Me (Q ₁ , Q ₃)	n
1	0	9,8 (6,2, 12,1)	15	0,020 (0,012, 0,044)	15
2	2	9,5 (8,7, 12,4)	15	0,016 (0,008, 0,025)	15
3	4	11,8 (10,4, 14,0)	15	0,015 (0,007, 0,034)	15
4	8	12,5 (10,3, 14,8)	14*	0,022 (0,005, 0,045)	14*

Примечание: * – у одного пациента на 3-и сутки после облучения в дозе 8 Гр точное иммунофенотипическое определение процента Трег-клеток оказалось затруднительно

мах после облучения в дозах 0, 2, 4 и 8 Гр. Сопоставление выживаемости после облучения лимфоцитов практически здоровых людей (табл. 1) и пациентов с неходжкинскими лимфомами (табл. 2) выявляет более высокий процент Трег-клеток при заболевании, что также отмечено в ряде исследований при хронической лимфо-пролиферации [13–14].

Анализ данных группы пациентов с неходжкинскими лимфомами, так же, как и в референсной группе здоровых людей, не показал статистически значимого влияния подведенных доз облучения на процент ($H=5,16$, $df=3$, $p=0,16$) и абсолютное число ($H=0,80$, $df=3$, $p=0,85$) Трег-клеток. В то же время, при неходжкинских лимфомах можно отметить выраженную тенденцию увеличения (в 1,3 раза) относительного числа Трег-клеток при дозе 8 Гр (от 9,8 (6,2, 12,1)% при 0 Гр до 12,5 (10,3, 14,8)% при 8 Гр), $p=0,06$, что с учетом отсутствия динамики абсолютного количества, предполагает их относительную радиорезистентность. Эти результаты указывают на перспективность обнаружения различий в иммунореактивности Трег-клеток при увеличении объема выборки исследования и использовании в эксперименте более высоких доз облучения.

Таким образом, в группе с патологическим процессом отмечена выраженная устойчивость Трег-клеток к использованным дозам облучения, которая может способствовать сохранению иммуносупрессивной среды в постлучевом периоде и негативно сказываться на эффективности лечения злокачественных новообразований.

2. Выживаемость Трег-клеток в первичной культуре лимфоцитов в зависимости от сроков культивирования

2.1. Группа практически здоровых людей

Для учета возможного действия фактора времени на выживаемость Трег-клеток была проанализирована их динамика в зависимости от срока (дня) наблюдения. Результаты группы практически здоровых людей представлены в табл. 3. В течение 2 сут культивирования статистически значимых различий в относительном или абсолютном количестве Трег-клеток выявлено не было ($p>0,05$). На 3-и сутки процент Трег-клеток увеличился в 1,4 раза по сравнению с исходным значением ($p<0,05$), и этот уровень сохранялся на 4-е сут (также $p<0,05$). Существенные изменения отмечены на 6-е сут исследования: процент Трег-клеток снизился в 2,6 раза по сравнению с 1 сут ($p<0,05$), в то же время как их абсолютное количество уменьшилось в 11,5 раз ($p<0,05$). Полученные результаты указывают на то, что к 6-ым сут в культуре лимфоцитов массово гибнут не только

Таблица 3

Выживаемость Трег-клеток в зависимости от срока культивирования лимфоцитов практически здоровых людей
Survival of Treg cells depending on the duration of lymphocyte culture in healthy individuals

№ п/п	Время, сутки	Трег-клетки, %		Трег-клетки, абс., 10 ⁹ кл/л	
		Me (Q ₁ , Q ₃)	n	Me (Q ₁ , Q ₃)	n
1	1	6,0 (5,3, 7,8)	24	0,023 (0,016, 0,035)	24
2	2	7,4 (7,2, 8,5)	8	0,031 (0,020, 0,044)	8
3	3	8,4 (6,6, 9,6)*	24	0,024 (0,016, 0,043)	24
4	4	8,2 (7,8, 9,1)*	8	0,026 (0,014, 0,050)	8
5	6	2,3 (1,9, 8,8) ***, ***, ****	16	0,002 (0,001, 0,011) ***, ***, ****	16

Примечание:

* – статистически значимые отличия от показателей 1-ых сут, $p<0,05$;

** – статистически значимые отличия от показателей 2-ых сут, $p<0,05$;

*** – статистически значимые отличия от показателей 3-их сут, $p<0,05$;

**** – статистически значимые отличия от показателей 4-ых сут, $p<0,05$

Трег-клетки, но и лимфоциты других типов, причем убыль Трег-клеток несколько меньше, чем других субпопуляций лимфоцитов. Причины гибели клеток, помимо основного изучаемого фактора – облучения, связаны с истощением ростовых факторов и накоплением ингибиторов пролиферации.

2.2. Группа пациентов с неходжкинскими лимфомами

В отличие от группы практически здоровых людей, в культурах при неходжкинских лимфомах наблюдалось значительно более быстрое снижение числа Трег-клеток (табл. 4). К 3 сут абсолютное количество Трег-клеток статистически значимо уменьшилось в 2,2 раза, а к 5 сут – в 10 раз ($p<0,05$). Помимо истощения ростовых факторов и накопления ингибиторов пролиферации, ускоренная гибель клеток, вероятно, обусловлена влиянием опухолевых В-клеток. Предполагается, что опухолевые клетки подавляли популяцию Трег-клеток, даже при обеспечении минимальных условий для поддержания жизнеспособности опухолевых В-клеток.

Таблица 4

Выживаемость Трег-клеток в зависимости от срока культивирования лимфоцитов при неходжкинских лимфомах
Survival of Treg cells depending on the duration of lymphocyte culture in non-Hodgkin's lymphomas

№ п/п	Время, сутки	Трег-клетки, %		Трег-клетки, абс., 10 ⁹ кл/л	
		Me (Q ₁ , Q ₃)	n	Me (Q ₁ , Q ₃)	n
1	1	13,1 (9,9, 16,2)	20	0,020 (0,011, 0,028)	20
2	3	10,4 (8,9, 12,6)	19*	0,009 (0,004, 0,013)**	19*
3	5	10,6 (8,2, 12,3)	20	0,002 (0,0003, 0,005)***, **	20

Примечание:

* – у одного пациента на 3-и сут после облучения в дозе 8 Гр точное иммунофенотипическое определение процента Трег-клеток оказалось затруднительно;

** – статистически значимые отличия от показателей 1-ых сут, $p<0,05$;

*** – статистически значимые отличия от показателей 3-их сут, $p<0,05$

Таким образом, полученные данные в тестах *in vitro* указывают на значительную зависимость динамики популяции Трег-клеток от фактора времени. Для корректной оценки воздействия ионизирующего излучения на Трег-клетки необходимо учитывать не только дозовые характеристики, но и динамику клеточной популяции во времени.

3. Выживаемость основных субпопуляций лимфоцитов в зависимости от дозы облучения (0, 2, 4 и 8 Гр), исследованная в первичной культуре лимфоцитов

3.1. Группа практически здоровых людей

В табл. 5 представлена выживаемость Т-клеток, Т-хелперов, Т-цитотоксических клеток, В- и НК-клеток в зависимости от подведенной дозы облучения вне зависимости от сроков культивирования.

В группе здоровых людей среди культивируемых лимфоцитов преобладают Т-клетки, медиана которых при 0 Гр составляет 71,3 (63,0, 78,7)%, Т-хелперов – 46,8 (40,0, 53,1)%, Т-цитотоксических клеток – 25,5 (22,5, 27,3)%, В-клеток – 5,7 (4,0, 7,2)%, НК-клеток – 13,1 (5,4, 18,3)%.

При анализе их динамики, после облучения мононуклеарных клеток в дозах 2, 4 и 8 Гр выявлена значимо более высокая гибель В-клеток по сравнению с лимфоцитами других типов, включая Трег-клетки: снижение их процентного содержания отмечено уже при 2 Гр и продолжалось при 4 и 8 Гр, а абсолютных значений – при 4 и 8 Гр. При дозе 8 Гр процент В-клеток уменьшился в 2,6 раза, а абсолютное количество – в 2,9 раза относительно необлученной группы ($p < 0,05$). Также наблюдалась тенденция к убыли уровня Т-клеток за счёт уменьшения Т-хелперов при стабильном уровне Т-цитотоксических клеток ($p > 0,05$): процентное содержание Т-хелперов снизилось в 1,1 раза ($p = 0,13$), абсолютное – в 1,9 ($p = 0,09$) раза при 8 Гр относительно группы необлученных клеток (0 Гр). Немного более высокая чувствительность к облучению, обнаруженная для общего количества Т-хелперов, по сравнению с их малочисленной субпопуляцией – Трег-клетками (сокращение числа клеток в 1,6 раз против 1,9 соответственно), позволяет предположить, что Т-хелперы других подтипов, такие как Th1, Th2 и Th17, или, по крайней мере, некоторые из них, обладают большей радиочувствительностью, чем Трег-клетки. В свою очередь, Т-цитотоксические клетки и НК-клетки оказались существенно более устойчивы к воздействию исследуемых доз облучения по сравнению с Трег-клетками. Таким образом, радиорезистентность Трег-клеток более высокая, чем В-клеток и Т-хелперов общей группы, и более низкая, чем Т-цитотоксических клеток и НК-лимфоцитов.

Полученные нами данные по группе практически здоровых людей согласуются с общепринятым представлением о наиболее высокой радиочувствительности В-клеток, промежуточной – Т-клеток, и, напротив, вы-

сокой радиорезистентности – НК-клеток среди популяций лимфоцитов как у мышей, так и у человека, что подтверждено данными зарубежных исследований [15, 16].

В отношении иерархии чувствительности к облучению субпопуляций Т-хелперов и Т-цитотоксических клеток в литературе общепринятое мнение все еще не сложилось. Большинство исследователей относит Т-хелперы к более радиочувствительным популяциям, чем Т-цитотоксические клетки. Но существуют данные о сопоставимой радиочувствительности, а также и о противоположной реакции на облучение этих субпопуляций [15–17].

3.2. Группа пациентов с неходжкинскими лимфомами

Анализ динамики уровня функционально различающихся популяций лимфоцитов при неходжкинских лимфомах после облучения в изучаемом диапазоне доз представлен в табл. 6.

Следует отметить, что при неходжкинских лимфомах в культуре наиболее представлена популяция В-клеток, преимущественно клональными опухолевыми В-клетками, что наиболее характерно для одного из ее вариантов – хронического лимфоцитарного лейкоза. При 0 Гр медиана их процента составляет 73,7 (58,3, 83,4)%, Т-клеток – 12,1 (9,1, 17,0)%, Т-хелперов – 7,1 (6,1, 9,9)%, Т-цитотоксических клеток – 2,8 (1,9, 11,4)%, НК-клеток – 3,2 (1,6, 4,3)%. Наиболее выраженное воздействие облучения отмечено для популяции НК-клеток. Статистически значимое снижение процента НК-клеток обнаружено при всех дозах 2, 4 и 8 Гр (в 5,3, 8,0 и 8,0 раз соответственно по сравнению с медианным значением необлученных клеток, $p < 0,05$). Также выявлено значимое убывание и абсолютного числа НК-клеток при дозах 4 и 8 Гр (в 12,9 и 22,5 раза соответственно относительно показателя необлученных клеток, $p < 0,05$), что указывает на более высокую динамику реакции на облучение этой клеточной популяции относительно других типов лимфоцитов, включая Трег-клетки. Наблюдаемое значимое уменьшение уровня НК-клеток, ключевого участника противоопухолевого иммунитета, возможно, является дополнительным неблагоприятным фактором, способствующим развитию резистентности к терапии. Статистически значимой динамики уровня общей группы Т-клеток и обеих ее субпопуляций на исследуемые дозы облучения не обнаружено ($p > 0,05$), хотя и отмечено некоторое статистически незначимое снижение как абсолютного числа Т-хелперов ($p = 0,16$), так и Т-цитотоксических клеток ($p = 0,12$). Различия в выжива-

Таблица 5

Выживаемость основных субпопуляций лимфоцитов в норме (практически здоровые люди) в зависимости от дозы облучения (0, 2, 4, 8 Гр) при культивировании *in vitro*

Survival of main lymphocyte subsets in healthy individuals depending on radiation dose (0, 2, 4, 8 Gy) during *in vitro* culture

Показатели, Me (Q ₁ ; Q ₃)	Доза облучения, Гр			
	0 Гр, n=20	2 Гр, n=20	4 Гр, n=20	8 Гр, n=20
Т-клетки, %	71,3 (63,0, 78,7)	71,3 (59,5, 79,3)	69,3 (59,8, 79,7)	66,5 (59,0, 77,30)
Т-клетки, 10 ⁹ кл/л	0,55 (0,41, 0,64)	0,56 (0,38, 0,74)	0,40 (0,33, 0,71)	0,29 (0,23, 0,67)
Т-хелперы, %	46,8 (40,0, 53,1)	40,7 (39,0, 51,8)	40,5 (33,3, 51,7)	40,7 (32,3, 49,1)
Т-хелперы, 10 ⁹ кл/л	0,34 (0,26, 0,42)	0,32 (0,20, 0,51)	0,26 (0,15, 0,49)	0,18 (0,12, 0,480)
Т-цитотоксические клетки, %	25,5 (22,5, 27,3)	27,2 (23,1, 29,6)	27,2 (23,7, 32,2)	26,3 (24,3, 34,0)
Т-цитотоксические клетки, 10 ⁹ кл/л	0,18 (0,14, 0,27)	0,22 (0,14, 0,28)	0,19 (0,13, 0,24)	0,17 (0,08, 0,28)
В-клетки, %	5,7 (4,0, 7,2)	3,7* (1,8, 4,5)	2,7* (1,3, 3,3)	2,2* (1,7, 3,2)
В-клетки, 10 ⁹ кл/л	0,04 (0,03, 0,06)	0,03 (0,01, 0,05)	0,02* (0,01, 0,03)	0,014* (0,005, 0,027)
НК-клетки, %	13,1 (5,4, 18,3)	13,3 (5,8, 20,4)	13,5 (7,6, 23,1)	12,5 (7,9, 26,4)
НК-клетки, 10 ⁹ кл/л	0,08 (0,03, 0,16)	0,10 (0,03, 0,16)	0,10 (0,03, 0,16)	0,09 (0,03, 0,22)

Примечание: * – статистически значимые отличия от показателей необлученных лимфоцитов (0 Гр), $p < 0,05$

Таблица 6

Выживаемость основных субпопуляций лимфоцитов при неходжкинских лимфомах в зависимости от дозы облучения (0, 2, 4, 8 Гр) при культивировании *in vitro*

Survival of main lymphocyte subsets in non-Hodgkin's lymphomas depending on radiation dose (0, 2, 4, 8 Gy) during *in vitro* culture

Показатели (Me (Q1; Q3))	Доза облучения, Гр			
	0 Гр, n=15	2 Гр, n=15	4 Гр, n=15	8 Гр, n=15
Т-клетки, %	12,1 (9,1, 17,0)	11,9 (8,7, 18,4)	13,7 (10,0, 17,4)	13,3 (9,8, 21,2)
Т-клетки, 10 ⁹ кл/л	0,37 (0,18, 0,63)	0,32 (0,10, 0,49)	0,29 (0,08, 0,42)	0,22 (0,07, 0,48)
Т-хелперы, %	7,1 (6,1, 9,9)	7,7 (94,3, 8,6)	7,1 (4,9, 11,8)	8,7 (4,3, 12,5)
Т-хелперы, 10 ⁹ кл/л	0,25 (0,12, 0,37)	0,15 (0,08, 0,24)	0,15 (0,03, 0,25)	0,15 (0,03, 0,28)
Т-цитотоксические клетки, %	2,8 (1,9, 11,4)	2,8 (2,0, 11,1)	3,8 (1,7, 10,3)	4,5 (1,8, 9,7)
Т-цитотоксические клетки, 10 ⁹ кл/л	0,09 (0,03, 0,40)	0,06 (0,02, 0,20)	0,07 (0,02, 0,18)	0,06 (0,01, 0,33)
В-, преимущественно клональные клетки, %	73,7 (58,3, 83,4)	75,0 (61,1, 83,1)	76,8 (63,0, 85,4)	76,1 (60,8, 83,1)
В-, преимущественно клональные клетки, 10 ⁹ кл/л	1,88 (1,24, 2,97)	1,63 (0,78, 2,25)	1,35 (0,52, 1,98)	1,03 (0,19, 1,58)
НК- клетки, %	3,2 (1,6, 4,3)	0,6* (0,4, 2,9)	0,4* (0,3, 2,3)	0,4* (0,1, 1,6)
НК- клетки, 10 ⁹ кл/л	0,09 (0,02, 0,15)	0,012 (0,001, 0,104)	0,007* (0,001, 0,081)	0,0040* (0,0005, 0,05638)

Примечание: * – статистически значимые отличия от показателей необлученных лимфоцитов (0 Гр), $p < 0,05$

емости/радиочувствительности популяций лимфоцитов между изучаемыми группами, вероятно, обусловлены дисфункцией апоптотических механизмов, а также метаболическими и пролиферативными особенностями клеток пациентов с лимфолиферативными заболеваниями.

Данные проведенного исследования подтверждают меньшую чувствительность Тreg-клеток к γ -излучению по сравнению с некоторыми другими субпопуляциями лимфоцитов. Экстраполируя эти данные на терапевтическое применение облучения, с известной осторожностью можно предполагать, что при большей относительной радиорезистентности Тreg-клеток, следует ожидать меньшую эффективность лучевой терапии, вследствие сохранения высокого потенциала иммуносупрессии в микроокружении опухолевых клеток [18].

Таким образом, в исследованиях *in vitro* прослежено, что выживаемость/ радиочувствительность регуляторной супрессорной субпопуляции Тreg-клеток во многом зависит от условий, в которых они находятся в период проявления их функции. К числу значимых факторов, изменяющих соотношение супрессирующих и активирующих факторов, следует отнести дозы облучения, а также период времени, прошедший после облучения. Невысокий потенциал питательной среды, создающий преимущества активации и пролиферации одних и ограничивающих возможности других субпопуляций, указывает на важность изучения условий, ответственных за степень устойчивости Тreg-клеток к облучению, которые все еще недостаточно ясны.

Некоторые исследования демонстрируют снижение апоптоза в популяции Тreg-клеток после ионизирующего облучения, что связывают с повышенной экспрессией антиапоптотических белков Bcl-2/Bcl-xL и фермента Akt [5, 19]. Однако участие этих белковых молекул не подтверждено в ряде других исследований [20]. Также после облучения наблюдается увеличение пролиферативной активности Тreg-клеток, оцениваемой по повышенной экспрессии маркера Ki-67 [21]. Причём восстановление их численности, по всей видимости, происходит преимущественно за счёт гомеостатической пролиферации, а не тимической продукции клеток *de novo* или конверсии из других субпопуляций Т-лимфоцитов [22, 23]. Повышенная устойчивость Тreg-клеток к окислительному стрессу, обусловленная более высокой экспрессией тиолов и более сильной внутриклеточной антиоксидантной способностью, может рассматриваться в качестве дополнительного механизма, лежащего в основе их

радиорезистентных свойств [24]. Таргетная модуляция молекулярных механизмов, обеспечивающих радиорезистентность Тreg-клеток, представляет перспективное направление для повышения эффективности лучевой терапии в онкологии.

Заключение

Исследование в тестах *in vitro* влияния на Тreg-клетки γ -излучения (2, 4 и 8 Гр) выявило, что Тreg-клетки проявляют определенную степень устойчивости к облучению. Как у практически здоровых людей, так и у пациентов с неходжкинскими лимфомами при всех изучаемых дозах облучения отсутствуют статистически значимые изменения их процентного и абсолютного количества при учете общего объема собранных лимфоцитов за весь период культивирования. Тем не менее, у пациентов с неходжкинскими лимфомами с более высоким уровнем Тreg-клеток, чем у практически здоровых людей, отмечена тенденция к увеличению их процентной доли при дозе 8 Гр (в 1,3 раза, $p=0,06$). Это свидетельствует о более высокой относительной радиорезистентности Тreg-клеток в условиях патологического процесса, что указывает на сохранение их иммуносупрессорных способностей в постлучевом периоде, и как следствие, на возможность снижения эффективности лучевой терапии.

Динамика Тreg-клеток также оказалась зависимой от длительности (дней) культивирования, что подчеркивает важность учета фактора времени после облучения. У практически здоровых людей число Тreg-клеток резко и статистически значимо снижалось к 6-ым сут (в 11,5 раз по сравнению с 1 сут, $p < 0,05$). У пациентов с неходжкинскими лимфомами уменьшение абсолютного числа Тreg-клеток происходило более быстро, достигая значимых различий уже к 3-им сут (в 2,2 раза, $p < 0,05$) и к 5-ым сут было особенно выражено (в 10 раз, $p < 0,05$). Это, возможно, связано с дополнительным супрессивным действием опухолевых В-клеток на популяцию Тreg-клеток в культуре.

Сравнительный анализ выживаемости основных популяций лимфоцитов показал различия реакций в изучаемых группах. В культурах практически здоровых людей Тreg-клетки демонстрируют среднюю чувствительность к облучению: В-клетки оказались наиболее чувствительны, тогда как Т-цитотоксические и НК-клетки – более резистентны. Также Тreg-клетки проявляли большую устойчивость по сравнению с общей популяцией Т-хелперов. При неходжкинских лимфомах наименьшей выживаемостью обладали НК-клетки, что увеличивает число неблагоприятных факторов прогноза при лечении.

Полученные результаты подчеркивают необходимость при оценке эффектов ионизирующего излучения на Treg-клетки учитывать как дозовые характеристики, так и кинетику клеток во времени после облучения, а также наличие патологического процесса. Необходимы

дальнейшие исследования механизмов радиорезистентности Treg-клеток для улучшения и более точного прогнозирования клинических исходов лучевой терапии, как в самостоятельном виде, так и в комбинации ее с иммунотерапией.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ / REFERENCES

- Hou P.F., Zhu L.J., Pan Y., Sun X.C., Pu J. The Relationship Between Regulatory T Cells and Radiation Therapy. *Cancer Radiother.* 2020;24;1:81-84. Doi: 10.1016/j.canrad.2019.07.160. PMID: 32046914.
- Guo T., Zou L., Ni J., Zhou Y., Ye L., Yang X., Zhu Z. Regulatory T Cells: an Emerging Player in Radiation-Induced Lung Injury. *Front Immunol.* 2020;11:1769. Doi: 10.3389/fimmu.2020.01769. PMID: 32849634.
- Beauford S.S., Kumari A., Garnett-Benson C. Ionizing Radiation Modulates the Phenotype and Function of Human CD4+ Induced Regulatory T Cells. *BMC Immunol.* 2020;21;1:18. Doi: 10.1186/s12865-020-00349-w. PMID: 32299365.
- Qu Y., Zhang B., Liu S., Zhang A., Wu T., Zhao Y. 2-Gy Whole-Body Irradiation Significantly Alters the Balance of CD4+CD25-T Effector Cells and CD4+CD25+Foxp3+T Regulatory Cells in Mice. *Cell Mol Immunol.* 2010;7;6:419-27. Doi: 10.1038/cmi.2010.45. PMID: 20871628.
- Qu Y., Jin S., Zhang A., Zhang B., Shi X., Wang J., Zhao Y. Gamma-Ray Resistance of Regulatory CD4+CD25+Foxp3+ T Cells in Mice. *Radiat Res.* 2010;173;2:148-57. Doi: 10.1667/RR0978.1. PMID: 20095846.
- Billiard F., Buard V., Benderitter M., Linard C. Abdominal γ -Radiation Induces an Accumulation of Function-Impaired Regulatory T Cells in the Small Intestine. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2011;80;3:869-76. Doi: 10.1016/j.ijrobp.2010.12.041. PMID: 21345609.
- Kachikwu E.L., Iwamoto K.S., Liao Y.P., DeMarco J.J., Agazaryan N., Economou J.S., McBride W.H., Schae D. Radiation Enhances Regulatory T Cell Representation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2011;81;4:1128-35. Doi: 10.1016/j.ijrobp.2010.09.034. PMID: 21093169.
- Liu R., Xiong S., Zhang L., Chu Y. Enhancement of Antitumor Immunity by Low-Dose Total Body Irradiation Associated with Selectively Decreasing the Proportion and Number of T Regulatory Cells. *Cell Mol Immunol.* 2010;7;2:157-62. Doi: 10.1038/cmi.2009.117. PMID: 20140010.
- Wei S., Egenti M.U., Teitz-Tennenbaum S., Zou W., Chang A.E. Effects of Tumor Irradiation on Host T-Regulatory Cells and Systemic Immunity in the Context of Adoptive T-Cell Therapy in Mice. *J Immunother.* 2013;36;2:124-32. Doi: 10.1097/CJI.0b013e31828298e6. PMID: 23377667.
- Battaglia A., Buzzonetti A., Martinelli E., Fanelli M., Petrillo M., Ferrandina G., Scambia G., Fattorossi A. Selective Changes in the Immune Profile of Tumor-Draining Lymph Nodes after Different Neoadjuvant Chemoradiation Regimens for Locally Advanced Cervical Cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2010;76;5:1546-53. Doi: 10.1016/j.ijrobp.2009.10.014. PMID: 20338481.
- Wang M., Gou X., Wang L. Protein Kinase B Promotes Radiation-Induced Regulatory T Cell Survival in Bladder Carcinoma. *Scand J Immunol.* 2012;76;1:70-4. Doi: 10.1111/j.1365-3083.2012.02707.x. PMID: 22486221.
- Zhang T., Yu H., Ni C., Zhang T., Liu L., Lv Q., Zhang Z., Wang Z., Wu D., Wu P., Chen G., Wang L., Wei Q., Huang J., Wang X. Hypofractionated Stereotactic Radiation Therapy Activates the Peripheral Immune Response in Operable Stage I Non-Small-Cell Lung Cancer. *Sci Rep.* 2017;7;1:4866. Doi: 10.1038/s41598-017-04978-x. PMID: 28687760.
- Кузьмина Е.Г., Мушкарина Т.Ю., Константинова Т.В. Регуляторные Т-лимфоциты (Treg) при лимфопролиферативных заболеваниях // Современная онкология. 2016. Т.18. №.5. С. 41-42. [Kuz'mina Ye.G., Mushkarina T.Yu., Konstantinova T.V. Regulatory T-lymphocytes (Treg) in Lymphoproliferative Diseases. *Sovremennaya Onkologiya = Modern Oncology.* 2016;18;5:41-42 (In Russ.)].
- Maharaj K., Uriepero A., Sahakian E., Pinilla-Ibarz J. Regulatory T Cells (Tregs) in Lymphoid Malignancies and the Impact of Novel Therapies. *Front Immunol.* 2022;13:943354. Doi: 10.3389/fimmu.2022.943354. PMID: 35979372.
- Heylmann D., Rödel F., Kindler T., Kaina B. Radiation Sensitivity of Human and Murine Peripheral Blood Lymphocytes, Stem and Progenitor Cells. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1846;1:121-9. Doi: 10.1016/j.bbcan.2014.04.009. PMID: 24797212.
- Paganetti H. A Review on Lymphocyte Radiosensitivity and its Impact on Radiotherapy. *Front Oncol.* 2023;13:1201500. Doi: 10.3389/fonc.2023.1201500. PMID: 37601664.
- Heylmann D., Ponath V., Kindler T., Kaina B. Comparison of DNA Repair and Radiosensitivity of Different Blood Cell Populations. *Sci Rep.* 2021;11;1:2478. Doi: 10.1038/s41598-021-81058-1. PMID: 33510180.
- Formenti S.C., Demaria S. Combining Radiotherapy and Cancer Immunotherapy: a Paradigm Shift. *J Natl Cancer Inst.* 2013;105;4:256-65. Doi: 10.1093/jnci/djs629. PMID: 23291374.
- Li C.G., He M.R., Wu F.L., Li Y.J., Sun A.M. Akt promotes irradiation-induced regulatory T-cell survival in hepatocellular carcinoma. *Am J Med Sci.* 2013;346(2):123-7. Doi: 10.1097/MAJ.0b013e31826ceed0. PMID: 23255243.
- Winzler C., Fantinato M., Giordan M., Calore E., Basso G., Messina C. CD4(+) T Regulatory Cells are More Resistant to DNA Damage Compared to CD4(+) T Effector Cells as Revealed by Flow Cytometric Analysis. *Cytometry A.* 2011;79;11:903-11. Doi: 10.1002/cyto.a.21132. PMID: 22015731.
- McFarland H.I., Puig M., Grajkowska L.T., Tsuji K., Lee J.P., Mason K.P., Verthelyi D., Rosenberg A.S. Regulatory T Cells in γ Irradiation-Induced Immune Suppression. *PLoS One.* 2012;7;6:e39092. Doi: 10.1371/journal.pone.0039092. PMID: 22723935.
- Komatsu N., Hori S. Full Restoration of Peripheral Foxp3+ Regulatory T Cell Pool by Radioresistant Host Cells in Scurfy Bone Marrow Chimeras. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007;104;21:8959-64. Doi: 10.1073/pnas.0702004104. PMID: 17494743.
- Balogh A., Persa E., Bogdándi E.N., Benedek A., Hegyesi H., Sáfrány G., Lumniczky K. The Effect of Ionizing Radiation on the Homeostasis and Functional Integrity of Murine Splenic Regulatory T cells. *Inflamm Res.* 2013;62;2:201-12. Doi: 10.1007/s00011-012-0567-y. PMID: 23080082.
- Mougiakakos D., Johansson S.C.C., Kiessling R. Naturally Occurring Regulatory T Cells Show Reduced Sensitivity Toward Oxidative Stress-Induced Cell Death. *Blood.* 2009;113;15:3542-5. Doi: 10.1182/blood-2008-09-181040. PMID: 19050306.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.
Участие авторов. Статья подготовлена с равным участием авторов.
Поступила: 20.02.2026. Принята к публикации: 25.03.2026.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.
Financing. The study had no sponsorship.
Contribution. Article was prepared with equal participation of the authors.
Article received: 20.02.2026. Accepted for publication: 25.03.2026.