

- Thijssen S.F., Mascini E.M., van Hees B.C., et al. Predicting carriage with extended-spectrum beta-lactamase-producing bacteria at hospital admission: a cross-sectional study. *Clin. Microbiol. Infect.* 2015; 21(2): 141–6. doi: 10.1016/j.cmi.2014.09.014
19. Shitrit P., Reisfeld S., Paitan Y., Gottesman B.S., Katzir M., Paul M., et al. Extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae carriage upon hospital admission: prevalence and risk factors. *J. Hosp. Infect.* 2013; 85(3): 230–2. doi: 10.1016/j.jhin.2013.07.014.
20. Ben-Ami R., Schwaber M.J., Navon-Venezia S., Schwartz D., Giladi M., Chmelnitsky I., et al. Influx of extended-spectrum beta-lactamase-producing enterobacteriaceae into the hospital. *Clin. Infect. Dis.* 2006; 42(7): 925–4.
21. Bilavsky E., Temkin E., Lerman Y., Rabinovich A., Salomon J., Lawrence C., et al. Risk factors for colonization with extended-spectrum beta-lactamase-producing enterobacteriaceae on admission to rehabilitation centres. *Clin. Microbiol. Infect.* 2014; 20(11): O804–10. doi: 10.1111/1469-0691.12633.
22. Mushtaq A., Carvalho M., Chishti N., Khatoon S., Weeks J., Jehan F., et al. Frequency of carriage of New Delhi metallo beta-lactamase-1 (NDM-1) and CTX-M-15 among patients from hospitals in Karachi: preliminary data assessing risk factors for carriage and infection. In: NDM-producing bacteria: an in crescendo problem. Proc. 23th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2013, Apr. 27–30; Berlin. Available at: https://escmid.org/escmid_library/online_lecture_library/material/?mid=6957 (accessed 25 January 2016)
23. Klyasova G. A. Infections in patients with hematological malignancies: clinical features, diagnosis and treatment. Dis. Moscow; 2009. (in Russian)
24. Bucanevea G., Castagnolab E., Viscoli C., Leibovicid L., Menichettie F. Quinolone prophylaxis for bacterial infections in afebrile high risk neutropenic patients. *Eur. J. Cancer Suppl.* 2007; 5(2): 5–12. doi:10.1016/j.ejcsup.2007.06.002.
25. Bow E.J. Fluoroquinolones, antimicrobial resistance and neutropenic cancer patients. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2011; 24(6): 545–53. doi: 10.1097/QCO.0b013e32834cf054.
26. Tumbarello M., Sanguinetti M., Montuori E., Trecarichi E.M., Posteraro B., Fiori B., et al. Predictors of mortality in patients with bloodstream infections caused by extended-spectrum-beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae: importance of inadequate initial antimicrobial treatment. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2007; 51(6): 1987–94. doi:10.1128/AAC.01509-06.
27. Paterson D.L., Ko W.C., Von Gottberg A., Mohapatra S., Casellas J.M., Goossens H., et al. Antibiotic therapy for *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: implications of production of extended-spectrum beta-lactamases. *Clin. Infect. Dis.* 2004; 39(1): 31–7. doi:10.1086/420816.
28. Pea F., Poz D., Viale P., Pavan F., Furlanut M. Which reliable pharmacodynamics breakpoint should be advised for ciprofloxacin monotherapy in the hospital setting? A TDM-based retrospective perspective. *J. Antimicrob. Chemother.* 2006; 58(2): 380–6. doi:10.1093/jac/dkl226.

Поступила 11.12.15
Принята к печати 20.01.16

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 616.419-089. 843-06-07

Дроков М.Ю., Паровичникова Е.Н., Кузьмина Л.А., Гальцева И.В., Васильева В.А.,
Михальцова Е.Д., Королева О.М., Дубняк Д.С., Савченко В.Г.

РОЛЬ ГРАНЗИМА В В ПОПУЛЯЦИИ Т-РЕГУЛЯТОРНЫХ КЛЕТОК У БОЛЬНЫХ ПОСЛЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ АЛЛОГЕННОГО КОСТНОГО МОЗГА

ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России, 125167, г. Москва, Россия

Роль Т-регуляторных клеток (Т-рег) в развитии аллоиммунных осложнений после трансплантации аллогенного костного мозга (алло-ТКМ) заключается в контроле избыточной реакции донорских эффекторных клеток. Основными механизмами иммунорегуляции являются: секреция цитокинов, индукция метаболических нарушений в клетках-мишенях, модификация дендритных клеток, прямой цитоллиз Т-эффекторных клеток. Одним из механизмов регуляции, который используют Т-рег, является прямой цитоллиз, основным участником которого является гранзим В. Гранзим В играет одну из ключевых ролей в поддержании «иммунологического» гомеостаза. Наши предварительные данные с качественной и количественной оценкой гранзим В-позитивных Т-рег у 30 больных после алло-ТКМ подтверждают эту роль.

Ключевые слова: трансплантация аллогенного костного мозга; гранзим В; реакция «трансплантат против хозяина»; толерантность.

Для цитирования: Дроков М.Ю., Паровичникова Е.Н., Кузьмина Л.А., Гальцева И.В., Васильева В.А., Михальцова Е.Д., Королева О.М., Дубняк Д.С., Савченко В.Г. Роль гранзима В в популяции Т-регуляторных клеток у больных после трансплантации аллогенного костного мозга. *Гематология и трансфузиология*. 2016; 61(1): 32–37. DOI 10.18821/0234-5730-2016-61-1-32-37

Drokov M.Yu., Parovichnikova E.N., Kuzmina L.A., Galtseva I.V., Vasilieva V.A., Mikhaltsova E.D., Koroleva O.M.,
Dubnyak D.S., Savchenko V.G.

ROLE OF GRANZYME B IN T REGULATORY CELLS IN PATIENTS AFTER ALLOGENEIC STEM CELL TRANSPLANTATION

National Research Center for Hematology, Moscow, 125167, Russian Federation

The role of regulatory T-cells (T-reg) in the development of autoimmune complications after allogeneic bone marrow transplantation (allo-BMT) is to control the augmented response of donor effector cells. The main mechanisms of immune regulation are the secretion of cytokines, induction of metabolic disturbances in target cells, modification of dendritic cells, direct cytolysis of T effector cells. One of the regulatory mechanisms that use T-reg is a direct cytolysis, the major mediator is granzyme B. Granzyme B plays a key role in maintaining the immune homeostasis. Preliminary data from a qualitative and quantitative assessment of granzyme B-positive T-reg in 30 patients after allo-BMT endorse this role.

Key words: transplantation of allogeneic bone marrow; granzyme B; Graft vs. Host Disease (GvHD); tolerance.

For citation: Drokov M.Yu., Parovichnikova E.N., Kuzmina L.A., Galtseva I.V., Vasilieva V.A., Mikhaltsova E.D., Koroleva O.M., Dubnyak D.S., Savchenko V.G. Role of granzyme B in T regulatory cells in patients after allogeneic stem cell transplantation. *Hematology and Transfusiology, Russian journal (Gematologiya i transfusiologya)*. 2016; 61(1): 32–37. (in Russian). DOI 10.18821/0234-5730-2016-61-1-32-37

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

Funding. The study was supported by research topic “Development of new technologies of prevention and treatment of alloimmune complications after allogeneic hematopoietic stem cells transplantation in patients with leukemia” in Hematological Research Center (Moscow).

Received 11 December 2015
Accepted 14 February 2016

В 1987 г. группа под руководством J. Tschopp [1] опубликовала данные о семействе сериновых протеаз, найденных в цитотоксических гранулах цитотоксических Т-лимфоцитов. Ученые смогли верифицировать восемь протеаз из этого семейства белков, исследовать их субстраты, а также определить аминокислотную последовательность. Два белка позже были получены в лаборатории R. Bleackley [2] и были названы гранзимами. На тот момент было принято считать, что белок перфорин (цитотоксин) является единственным медиатором уничтожения клеток-мишеней. Поэтому открытие гранзимов привело к более глубокому пониманию феномена клеточной цитотоксичности.

Гранзим В (син.: гранзим 2, сериновая протеаза В, цитотоксическая клеточная протеаза 1) [3] является одной из сериновых протеаз, которая располагается в гранулах цитотоксических Т-клеток и натуральных киллеров. Намного более низкий уровень найден в моноцитах, покоящихся Т-клетках, В-клетках, активированных гранулоцитах и активированных моноцитах [4]. Гранзим В имеет решающее значение для быстрой индукции смерти клеток-мишеней путем апоптоза, индуцированного взаимодействием с цитотоксическими Т-клетками.

Ген, кодирующий гранзим В как у мышей, так и людей, находится на 14-й хромосоме. Он входит в состав «кластера», наряду с этим кодирующего гранзим Н, катепсин G и химазу 1 тучных клеток. У мышей данный «кластер» содержит гены, кодирующие гранзимы В, С, F, N, G, D, E, катепсин G, химазу 1 тучных клеток.

Первоначальные исследования гранзима В показали, что он обладает способностью к лизису клеток *in vitro*, способен фрагментировать ДНК и изменять конденсацию хроматина [5, 6].

Ключевой особенностью гранзима В, которая и привела к его открытию, явилась его способность расщеплять аспарагиновую кислоту. Эта специфичность к аспарагиновой кислоте является уникальной среди эукариотических сериновых протеаз.

Рецептор к гранзиму В был идентифицирован В. Мотука и соавт. [7] как манноза-6-фосфат/инсулинподобный фактор роста 2 рецептор. Ингибирование взаимодействия гранзима В и этого рецептора предотвращает эндоцитоз, а, соответственно, и индукцию апоптоза.

Гранзим В протеолитически активирует несколько каспаз, участвующих в апоптозе, включая каспазу 3 и каспазу 7 [8]. Активация предшественника ка-

спазы 7 идет посредством промежуточной активации каспазы 3, которая удаляет пропептид каспазы 7, что ведет к ее активации [9]. Также гранзим В может влиять на другие каспазы напрямую. М. Варту и соавт. [10] показали, что гранзим В непосредственно расщепляет проапоптотический белок BID, минуя необходимость активации каспазы 8. С. Adrain и соавт. [11] продемонстрировали, что гранзим В повреждает цитоскелет путем отщепления хвостовой части С-конца α -тубулина, что в свою очередь повышает полимеризацию микротрубочек. С. Loeb и соавт. [12] также выявили, что гранзим В воздействует на белки Notch 1 и FGFR1, которые отвечают за рост и дифференцировку клеток и чье нарушение функции ведет к апоптозу.

О клиническом значении гранзима В свидетельствует тот факт, что деструкция β -островков поджелудочной железы, синтезирующих инсулин, осуществляется за счет гранзим В-зависимых механизмов, что приводит к дефициту этого гормона и развитию сахарного диабета [13]. Имеются сообщения о корреляции между количеством CD8⁺-лимфоцитов, экспрессирующих гранзим В, и активностью системной красной волчанки [14].

Несмотря на имеющиеся сведения о наличии гранзима В в популяции Т-регуляторных клеток (Т-рег), не проводились исследования уровня внутриклеточного гранзима В на разных этапах после алло-ТКМ у больных гемобластозами.

Цель работы – изучение доли гранзим В⁺ Т-регуляторных клеток (Т-рег) у больных после трансплантации аллогенного костного мозга (алло-ТКМ).

Материал и методы

В исследование включены 27 больных в возрасте от 18 до 60 лет (медиана возраста 39 лет), находившихся в отделении химиотерапии гемобластозов и трансплантации костного мозга ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России (Москва).

Алло-ТКМ была выполнена от родственного или неродственного HLA-совместимого или частично совместимого донора.

У 12 больных (6 мужчин и 6 женщин) в возрасте от 22 до 60 лет (медиана возраста 42 года) до ТКМ был диагностирован острый миелобластный лейкоз (ОМЛ); у 12 больных (6 мужчин и 6 женщин) в возрасте от 18 до 58 лет (медиана возраста 27 лет) – острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ), у 1 больного (женщина, 48 лет) – миелодиспластический синдром (МДС), у 2 больных (мужчины, 20 и 23 лет) – лимфомы. Вне ремиссии заболевания находились 6 (22%) из 27 больных; у 21 (78%) больного на момент начала предтрансплантационного кондиционирования была констатирована

Для корреспонденции:

Дроков Михаил Юрьевич, кандидат медицинских наук, научный сотрудник научно-клинического отдела высокодозной химиотерапии гемобластозов, депрессии кроветворения и трансплантации костного мозга ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России, 125167, г. Москва, Россия. E-mail: mdrokov@gmail.com.

For correspondence:

Drokov Mikhail Yu., MD, PhD, Research Officer of Clinical Research Department of High-Dose Chemotherapy Hemoblastosis, Depression of Hematopoiesis and Bone Marrow Transplantation of National Research Center for Hematology. Moscow, 125167, Russian Federation. E-mail: mdrokov@gmail.com.

Information about authors:

Drokov M.Yu., <http://orcid.org/0000-0001-9431-8316>, Scopus Author ID 48661939800; Parovichnikova E.N., <http://orcid.org/0000-0001-6177-3566>; Kuzmina L.A., <http://orcid.org/0000-0001-6201-6276>; Galtseva I.V., <http://orcid.org/0000-0002-8490-6066>, Scopus Author ID: 6506926619; Vasileva V.A., <http://orcid.org/0000-0003-0904-7385>; Mikhaltsova E.D., <http://orcid.org/0000-0002-9372-5400>; Koroleva O.M., <http://orcid.org/0000-0001-9859-2849>; Dubnyak D.S., <http://orcid.org/0000-0002-2253-9870>; Savchenko V.G., <http://orcid.org/0000-0003-2935-4040>.

полная клинико-гематологическая ремиссия (ПР) основного заболевания.

В качестве источника трансплантата у 23 (85,2%) больных использовали гемопоэтические стволовые клетки крови от неродственного донора, у 4 (14,8%) – костный мозг от родственного донора.

Для установления диагноза и стадирования острой реакции «трансплантат против хозяина» (ОРТПХ) использовали модифицированные критерии Глюксберга [15].

При определении субпопуляции Т-рег у больных после алло-ТКМ учитывали тот факт, что больные в ранние сроки после трансплантации находятся в цитопении, в том числе и лимфопении, а кроме того, для определения статистической значимости качественной оценки субпопуляции Т-лимфоцитов (определения содержания гранзима В) требуется просчет достаточно большого числа событий.

Перед проведением окраски моноклональными антителами (мкАТ) после забора венозной крови в транспортную пробирку с этилендиаминтетрауксусной кислотой (ЭДТА) в объеме 5 мл из данного объема крови методом разделения клеток в градиенте плотности с помощью фиколла (плотность 1,077 г/мл), согласно стандартному протоколу, получали клетки мононуклеары. Далее проводили окраску клеточной суспензии с помощью мкАТ по стандартному протоколу фирмы “Beckton Dickinson” (США) [16].

Учитывая крайне малое число Fc-рецепторов на поверхности лимфоцитов, а также использование градиента плотности и растворов, содержащих бычий сывороточный альбумин, изотипический контроль для определения неспецифичного связывания антител не ставили.

Для определения фракции CD4⁺/CD25^{high} в пуле мононуклеарных клеток периферической крови (ПК) использовали мкАТ для поверхностных антигенов CD4 и CD25. В качестве внутреннего отрицательного контроля выступала CD4-популяция. Она была использована с целью отделить CD25^{high} популяцию CD4⁺-клеток. Стратегия гейтирования была описана ранее S. Clark и соавт. [17] и была следующей: сначала фракцию CD4⁺-клеток выделяли на точечной диаграмме SSC/CD4-APC, затем выставляли гейт на точечной диаграмме FSC/SSC для исключения клеточного дебриса и более четкой характеристики CD4⁺-лимфоцитов.

ФохРЗ как маркер Т-рег не использовали, так как по современным данным ФохРЗ у людей в отличие от мышей [18] не является линейноспецифическим маркером для Т-рег. Также недавно было открыто несколько его изоформ [19], что затрудняет использование анти-ФохРЗ мкАТ. А тот факт что, ФохРЗ может транзитивно экспрессироваться при активации клеток [20] наряду с вышеупомянутыми данными не дал возможности использовать его в качестве маркера, особенно при анализе образцов от больных с аллоиммунными осложнениями, такими как ОРТПХ.

Именно эти недавние открытия в области исследования экспрессии ФохРЗ, который широко использовали ранее для определения Т-рег, могут быть причиной получения противоречивых данных о количестве Т-рег при развитии РТПХ у больных хроническим миелолейкозом после алло-ТКМ, когда вопреки логике уровень Т-рег повышается [21].

Определение внутриклеточного уровня гранзима В

После окрашивания поверхностных антигенов проводили окрашивание внутриклеточных антигенов – гранзима В. Окраску выполняли согласно стандартному протоколу производителя [16] для внутриклеточного окрашивания фирмы “Beckton Dickinson” (США) с использованием растворов Cytofix/Cytoperm (“Beckton Dickinson”, США).

Все полученные данные приведены в виде средних со стандартной ошибкой, в скобках указан диапазон значений. Для определения статистических различий использовали *t*-критерий Стьюдента. Анализ проводили с помощью статистического программного обеспечения SPSS версии 21.0 (“SPSS Inc.”, Чикаго, Иллинойс, США).

Результаты и обсуждение

Доля гранзим В⁺ Т-рег в зависимости от диагноза до проведения ТКМ

У больных в ПР независимо от диагноза (ОМЛ или ОЛЛ) доля гранзим В⁺ клеток среди Т-рег была сопоставима с донорскими показателями и составляла $1,9 \pm 0,57\%$ (0,2–4,6) для доноров, $2,61 \pm 1,02\%$ (0,2–10,4) и $2,54 \pm 1,12\%$ (0–8,3) для больных ОЛЛ и ОМЛ в ПР. У больных же вне ремиссии, и при ОМЛ и при ОЛЛ, число гранзим В⁺ Т-рег снижено. К сожалению, анализируемые группы невелики, поэтому значимых различий не получено.

У 2 больных лимфомами в ПР доля гранзим В⁺ Т-рег одинакова в сравнении с донорами и больными острыми лейкозами в ПР и составила $1,2 \pm 0,57\%$ (0,8–1,6). Таким образом, до ТКМ у больных независимо от диагноза при отсутствии ремиссии отмечалось меньшее число гранзим В⁺-клеток среди популяции CD4⁺CD25^{high}.

Доля гранзим В⁺ Т-рег у больных после алло-ТКМ от родственного и неродственного донора

При анализе тенденций в динамике количества гранзим В⁺-клеток среди CD4⁺CD25^{high} популяции клеток у больных после ТКМ при использовании различных источников трансплантата статистически значимые различия были выявлены на ранних сроках, а именно на +30-й день после алло-ТКМ ($p = 0,04$). Доля гранзим В⁺ CD4⁺CD25^{high} событий при алло-ТКМ от неродственного донора составило на +30-й день $6,23 \pm 2,46\%$ (0–30). В то время как при алло-ТКМ от родственного донора процент событий составил $12,83 \pm 4,28\%$ (6,8–18,9). В другие контрольные дни эти значения составили $12,7 \pm 7,2\%$ (2,1–22,4) для алло-ТКМ от родственного донора на +60-й день и $5,71 \pm 1,81\%$ (0–25,7) при алло-ТКМ от неродственного донора соответственно. На +90-й день доля составила $3,95 \pm 1,52\%$ (1,1–6,9) и $3,14 \pm 0,95\%$ (0–14,3) соответственно.

Учитывая, что многие иммуносупрессанты могут модулировать количество гранзим В⁺ событий, что было показано в работе [22], использование более массивной иммуносупрессивной терапии при трансплантации от неродственного донора, а именно большие дозы антигитотимочного глобулина (АТГ) и микофенолата мофетил, которые напрямую действуют на Т-клеточное звено иммунной системы, может объяснить факт заметно более низкой доли гранзим В⁺-клеток в CD4⁺CD25^{high} популяции на +30-й день после алло-ТКМ при трансплантации от неродственного донора.

Доля гранзим В⁺ Т-рег у больных после алло-ТКМ с кондиционированием в миелоаблативном режиме и режиме пониженной интенсивности

С момента внедрения алло-ТКМ в клиническую практику считается, что ее выполнение невозможно без проведения предварительного предтрансплантационного кондиционирования, целью которого является как миело-, так и иммуносупрессия. В настоящее время режимы кондиционирования подразделяют на три основные группы: миелоаблативные, немиелоаблативные и режимы пониженной интенсивности/токсичности.

По мнению экспертов International Bone Marrow Transplant Registry (IBMTR) [23], любой режим кондиционирования, который включает дозу тотального облучения менее 500 сГр (единовременно) или менее 800 сГр фракционированно, бусульфан в дозе менее 9 мг/кг, мелфалан менее 140 мг/м², тиотепа менее 10 мг/кг, можно отнести к режимам пониженной интенсивности.

На первых этапах своего становления трансплантацию применяли лишь в качестве терапии спасения при рефрактерных опухолях, и именно миелоаблативные режимы до недавнего времени использовали при ТКМ. Трансплантацию без кондиционирования до недавнего времени выполняли лишь детям с врожденными иммунодефицитами, в настоящее время ее широко используют лишь в детской трансплантологии [24–25]. Ранее мы описали [26] проведение алло-ТКМ без предварительного предтрансплантационного кондиционирования у взрослого больного гемобластомом.

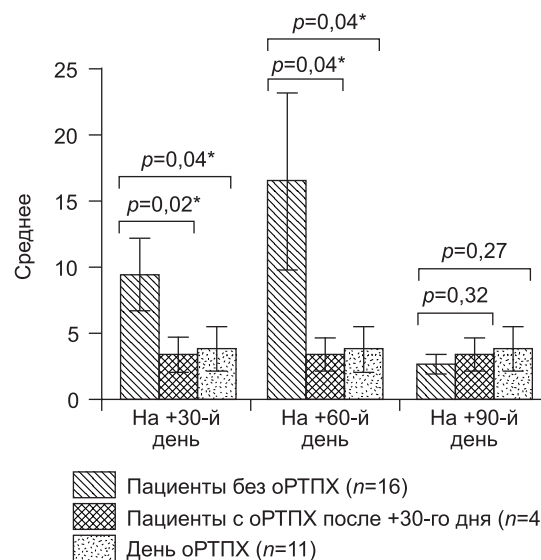
В данном исследовании миелоаблативное кондиционирование (МАК) выполнили 10 больным, режим пониженной интенсивности (РИС) – 17 больным. Показанием для использования режима МАК был молодой возраст до 45 лет, а также отсутствие серьезной сопутствующей патологии в анамнезе (грибковая инфекция, алло- или ауто-ТКМ в анамнезе). В остальных случаях использовали режим пониженной интенсивности. У больных вне ремиссии, при наличии бластных клеток в костном мозге более 5%, использовали протокол FLAMSA (модифицированный).

При анализе данных, полученных у больных, получивших различные режимы кондиционирования, различия в доле гранзим В⁺ CD4⁺CD25^{high} не выявлено. Для МАК доля гранзим В⁺ CD4⁺CD25^{high} клеток составила 5,37 ± 2,31% (0–18,9), 4,98 ± 2,74% (0–22,4), 3,49 ± 1,21% (0–9,9) против 6,87 ± 2,61% (0–30), 13,69 ± 6,62% (0–97,9), 3,15 ± 1,14% (0,2–14,3) в случае РИС на +30, +60 и +90-й день соответственно.

Доля гранзим В⁺ Т-рег у больных после алло-ТКМ, у которых диагностирована оРТПХ

Чтобы оценить роль экспрессии гранзима В в различных клетках в момент развития оРТПХ, использовали метод "landmark"-анализа. В 1-ю группу больных ($n = 16$) «без оРТПХ» включили всех пациентов независимо от диагноза и режима кондиционирования, у которых с 0 до +90-го дня не было констатировано развития оРТПХ. Во 2-ю группу ($n = 4$) были включены больные, у которых оРТПХ развилась на более чем +30-й день, из них у 2 – после 60-го дня и у 2 – более чем на +60-й день. У 7 больных оРТПХ развилась до +30-го дня, так как у них время оценки популяции было в день диагностики оРТПХ, а в контрольные сроки (на +30, +60 и +90-й день) у всех этих пациентов была эскалирована иммуносупрессивная терапия.

Доля гранзим В⁺-клеток в популяции CD4⁺CD25^{high} в 1-й группе была более высокой на +30 и +60-й день (см. рисунок) при отсутствии оРТПХ за время наблюдения и по сравнению со 2-й группой больных с развившейся оРТПХ в период с 30-го по 90-й день.



Доля гранзим В⁺ CD4⁺CD25^{high}-клеток на +30, +60 и +90-й день после алло-ТКМ у больных без оРТПХ за период наблюдения, больных, у которых она развивается после +30-го дня, а также в день констатации оРТПХ (среднее значение ± стандартная ошибка).

Доля гранзим В⁺ CD4⁺CD25^{high} событий у больных без оРТПХ (1-я группа) составила 9,49 ± 2,79% (0–30) и 16,56 ± 6,98% (0–97,9) на +30-й и +60-й дни, что было значимо выше, чем во 2-й группе с оРТПХ ($p = 0,02$), развившейся после +30-го дня – 3,38 ± 1,47% (0–6,1). Этот факт позволяет предполагать вероятность развития оРТПХ при обследовании в контрольные сроки, что открывает перспективу проведения превентивной терапии оРТПХ.

Была исследована доля гранзим В⁺ Т-рег и у больных, у которых развилась оРТПХ до 30-го дня (первой контрольной точки после ТКМ), и этот показатель измеряли в день развития оРТПХ (3-я группа). Он составил 3,8 ± 1,78% (0–16,8). Этот показатель был значимо ниже показателей в контрольные сроки (+30-й день) у больных из 1-й группы, у которых оРТПХ вообще не развилась ($p = 0,04$) (см. рисунок). В целом, доля гранзим В⁺ клеток в CD4⁺CD25^{high}-клетках в день развития РТПХ у всех 11 больных (медиана 26 день) была существенно ниже в сравнении с показателями на +30-й и +60-й дни в 1-й группе. Различия в доле клеток являлись значимыми. Доля гранзим В⁺ Т-рег составила 3,8 ± 1,78% (0–16,8) в день развития оРТПХ и 9,49 ± 2,79% (0–30) на +30-й день и 16,56 ± 6,98% (0–97,9) на +60-й день у больных из 1-й группы. К +90-му дню данные различия становились незначимыми. Это объясняет тот факт, что развитие оРТПХ после +100-го дня, так называемой «поздней» оРТПХ, является редким событием. По-видимому, приобретение достаточного контроля со стороны Т-рег над эффекторной популяцией приводит к резкому снижению частоты оРТПХ после +100-го дня.

Все эти данные также подтверждаются полученными результатами, в которых доля гранзим В⁺ CD4⁺CD25^{high}-клеток служила предиктором развития оРТПХ, и его более низкий уровень задолго до развития оРТПХ свидетельствовал о развитии оРТПХ в будущем.

Таким образом, у больных после алло-ТКМ малое количество гранзим В⁺ CD4⁺CD25^{high}-клеток определяло высокую вероятность развития оРТПХ. Или наоборот, чем больше было количество гранзим В⁺ CD4⁺CD25^{high}-клеток, тем меньше была вероятность развития оРТПХ в будущем, а своего минимального значения этот показатель достигал в день установления диагноза оРТПХ.

Таким образом, регуляция Т-клеточного звена иммунной системы представляет собой сложнейший каскад, состоящий как из клеточных, так и гуморальных механизмов. Гранзим В в субпопуляции Т-рег играет важную роль в процессе регуляции иммунного ответа и модулировании оРТПХ после алло-ТКМ. Возможность оценить эти механизмы регуляции и позволяет определить степень значимости этого фактора и использовать его в качестве возможного предиктора в развитии оРТПХ.

Эта работа является первой, посвященной изучению экспрессии гранзима В в Т-рег у больных после алло-ТКМ. Полученные нами результаты совпадают с экспериментальными данными, представленными в публикациях [27], и подтверждают, что гранзим В является важным участником регуляции РТПХ в моделях алло-ТКМ. Следует учитывать и то, что Т-рег являются одним из главных компонентов, обеспечивающих периферическую толерантность за счет делеции аллореактивных клонов [28]. Поэтому небольшое число клеток с гранзимом В среди популяции Т-рег, у которых впоследствии развилась оРТПХ, представляется вполне логичным. Более высокое содержание гранзима В позволяет Т-рег ограничивать популяцию цитотоксических лимфоцитов, которые участвуют не только в противоопухолевом и противовирусном звене иммунной системы [28], но и являются эффекторным звеном оРТПХ [28].

Проведенный анализ результатов показал, что доля экспрессирующих гранзим В-клеток в популяции CD4⁺CD25^{high} была более высокой на всех контрольных сроках (на +30-й и +60-й дни) при отсутствии РТПХ за время наблюдения в сравнении с долей таких же клеток в день развития оРТПХ, а также в сравнении с долей гранзим В⁺ CD4⁺CD25^{high}-клеток у больных у которых оРТПХ разовьется после +30-го дня (см. рисунок).

Несмотря на малую выборку, очевидно, что гранзим В оказывает существенное влияние на развитие оРТПХ. Таким образом, выявленные изменения свидетельствуют о необходимости продолжения целенаправленного изучения роли количественных соотношений гранзима В⁺ CD4⁺CD25^{high}-клеток в качестве маркера-предиктора развития оРТПХ.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование было выполнено в рамках темы НИР «Разработка новых технологий профилактики и лечения аллоиммунных осложнений после трансплантации аллогенных стволовых гемопоэтических клеток у больных с лейкозами» в ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России (Москва).

ЛИТЕРАТУРА

26. Дроков М.Ю., Паровичникова Е.Н., Кузьмина Л.А., Васильева В.А., Урнова Е.С., Троицкая В.В. и др. Трансплантация аллогенного костного мозга без проведения предтрансплантационного кондиционирования с использованием циклофосфамида и мезенхимальных стромальных клеток в качестве

индукции толерантности. *Гематология и трансфузиология*. 2014; 1: 42–6.

Остальные источники литературы см. в References

REFERENCES

1. Masson D., Tschopp J. A family of serine esterases in lytic granules of cytolytic T lymphocytes. *Cell*. 1987; 49(5): 679–85.
2. Lobe C.G., Finlay B.B., Paranchych W., Paetkau V.H., Bleackley R.C. Novel serine proteases encoded by two cytotoxic T lymphocyte-specific genes. *Science*. 1986; 232(4752): 858–61.
3. Trapani J.A., Browne K.A., Dawson M., Smyth M.J. Immunopurification of functional Asp-ase (Natural Killer cell Granzyme B) using a monoclonal antibody. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1993; 195(2): 910–20.
4. Risssoan M.C., Duhon T., Bridon J.M., Bendriss-Vermare N., Péronne C., de Saint Vis B., et al. Subtractive hybridization reveals the expression of immunoglobulin-like transcript 7, Eph-B1, granzyme B, and 3 novel transcripts in human plasmacytoid dendritic cells. *Blood*. 2002; 100(9): 3295–303.
5. Heibei J.A., Barry M., Motyka B., Bleackley R.C. Granzyme B-induced loss of mitochondrial inner membrane potential (Delta Psi m) and cytochrome c release are caspase independent. *J. Immunol.* 1999; 163(9): 4683–93.
6. Shi L., Kraut R.P., Aebersold R., Greenberg A.H. A natural killer cell granule protein that induces DNA fragmentation and apoptosis. *J. Exp. Med.* 1992; 175(2): 553–66.
7. Motyka B., Korbitt G., Pinkoski M.J., Heibei J.A., Caputo A., Hobman M., et al. Mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor is a death receptor for granzyme B during cytotoxic T cell-induced apoptosis. *Cell*. 2000; 103(3): 491–500.
8. Chinnaiyan A.M., Hanna W.L., Orth K., Duan H., Poirier G.G., Froelich C.J., et al. Cytotoxic T-cell-derived granzyme B activates the apoptotic protease ICE-LAP3. *Curr. Biol.* 1996; 6(7): 897–9.
9. Yang X., Stennicke H.R., Wang B., Green D.R., Jänicke R.U., Srinivasan A., et al. Granzyme B mimics apical caspases. Description of a unified pathway for trans-activation of executioner caspase-3 and -7. *J. Biol. Chem.* 1998; 273(51): 34278–83.
10. Barry M., Heibei J.A., Pinkoski M.J., Lee S.F., Moyer R.W., Green D.R., et al. Granzyme B short-circuits the need for caspase 8 activity during granule-mediated cytotoxic T-lymphocyte killing by directly cleaving. *Bid. Mol. Cell Biol.* 2000; 20(11): 3781–94.
11. Adrain C., Duriez P.J., Brumatti G., Delivani P., Martin S.J. The cytotoxic lymphocyte protease, granzyme B, targets the cytoskeleton and perturbs microtubule polymerization dynamics. *J. Biol. Chem.* 2006; 281(12): 8118–25.
12. Loeb C.R.K., Harris J.L., Craik C.S. Granzyme B proteolyzes receptors important to proliferation and survival, tipping the balance toward apoptosis. *J. Biol. Chem.* 2006; 281(38): 28326–35.
13. Thomas H.E., Trapani J.A., Kay T.W.H. The role of perforin and granzymes in diabetes. *Cell Death Differ.* 2010; 17(4): 577–85.
14. Blanco P., Pitard V., Viallard J.F., Taupin J.L., Pellegrin J.L., Moreau J.F. Increase in activated CD8+ T lymphocytes expressing perforin and granzyme B correlates with disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. *Arth. Rheum.* 2005; 52(1): 201–11.
15. Przepiorka D., Weisdorf D., Martin P., Klingemann H.G., Beatty P., Hows J., Thomas E.D. 1994 Consensus Conference on Acute GVHD Grading. *Bone Marrow Transplant.* 1995; 15(6): 825–8.
16. Andersson J., Abrams J., Björk L., Funa K., Litton M., Agren K., et al. Concomitant in vivo production of 19 different cytokines in human tonsils. *Immunology* 1994; 83(1): 16–24.
17. Clarke S.L., Betts G.J., Plant A., Wright K.L., El-Shanawany T.M., Harrop R., et al. CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells suppress anti-tumor immune responses in patients with colorectal cancer. *PLoS One*. 2006; 1(1): 2–7.
18. Ziegler S.F. FOXP3: not just for regulatory T cells anymore. *Eur. J. Immunol.* 2007; 37(1): 21–3.
19. Allan S.E., Passerini L., Bacchetta R., Crellin N., Dai M., Orban P.C., et al. The role of 2 FOXP3 isoforms in the generation of human CD4+ Tregs. *J. Clin. Invest.* 2005; 115(11): 3276–84.
20. Wang J., Ioan-Facsinay A., van der Voort E.I.H., Huizinga T.W.J., Toes R.E.M. Transient expression of FOXP3 in human activated nonregulatory CD4+ T cells. *Eur. J. Immunol.* 2007; 37(1): 129–38.
21. Beres A.J., Drobyski W.R. The role of regulatory T cells in the biology of graft versus host disease. *Front. Immunol.* 2013; 4: 163. doi: 10.3389/fimmu.2013.00163

22. Efimova O.V., Kelley T.W. Induction of granzyme B expression in T-cell receptor/CD28-stimulated human regulatory T cells is suppressed by inhibitors of the PI3K-mTOR pathway. *BMC Immunol.* 2009; 10: 59.
23. Maziarz R.T., Slater S., eds. *Blood and Marrow Transplant Handbook*. New York: Springer; 2011.
24. Cancrini C., Ferrua F., Scarselli A., Brigida I., Romiti M.L., Barera G., et al. Role of reduced intensity conditioning in T-cell and B-cell immune reconstitution after HLA-identical bone marrow transplantation in ADA-SCID. *Haematologica*. 2010; 95(10): 1778–82.
25. Gaspar H.B., Aiuti A., Porta F., Candotti F., Herschfield M.S., Notarangelo L.D. How I treat ADA deficiency. *Blood*. 2009; 114(17): 3524–32.
26. Drovok M.Yu., Parovichnikova E.N., Kuzmina L.A., Vasileva V.A., Urnova E.S., Troitskaya V.V., et al. Allogeneic bone marrow transplantation without pretransplantation conditioning and tolerance induction by cyclophosphamide and mesenchymal stromal cells. *Hematology and Transfusiology. Russian journal (Gematologiya i transfuziologiya)*. 2014; 1: 42–6. (in Russian)
27. Cao X., Cai S.F., Fehniger T., Song J., Collins L.I., Piwnicka-Worms D.R., Ley T.J. Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance. *Immunity*. 2007; 27(4): 635–46.
28. Vignali D.A., Collison L.W., Workman C.J. How regulatory T cells work. *Nat. Rev. Immunol.* 2009; 8(7): 523–32.

Поступила 05.10.15

Принята к печати 11.02.16

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 616.155-006.04-06:616.24-002-022.6]-02

Тихомиров Д.С., [Гаранжа Т.А.], Туполева Т.А., Троицкая В.В., Галстян Г.М., Филатов Ф.П.

ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА ЧАСТОТУ ВОЗНИКНОВЕНИЯ ВИРУСНЫХ ПНЕВМОНИЙ У ОНКОГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ

ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России, 126167, г. Москва, Россия

Проанализирована частота выявления и концентрация ДНК герпес-вирусов в бронхоальвеолярной лаважной жидкости больных заболеваниями системы крови при развитии пневмонии на фоне или после курсов полихимиотерапии основного заболевания. Лаважную жидкость исследовали на наличие ДНК цитомегаловируса, ДНК вируса простого герпеса 1-го и 2-го типов, ДНК вируса Эпштейна–Барр и ДНК вируса герпеса человека 6-го типа. Также оценены факторы, потенциально увеличивающие частоту реактивации эндогенных герпесвирусов: возраст старше 50 лет, наличие клинико-лабораторных признаков иммунодефицита (агранулоцитоз и/или гипогаммаглобулинемия), а также тяжесть состояния, требующая перевода в реанимационное отделение. Показано, что наиболее часто выявляемым вирусом является вирус простого герпеса 1-го и 2-го типов. Определенные закономерности обнаружены только при анализе частоты выявления и концентрации его ДНК. В подавляющем большинстве положительных образцов концентрация ДНК этого вируса находилась в области высоких значений (до 10^7 копий/мл). Возраст старше 50 лет, а также лабораторные признаки иммунодефицита не оказывали существенного влияния на частоту развития герпес-вирус-ассоциированной пневмонии. Также нет данных, оценивающих тяжесть течения вирус-ассоциированной пневмонии на фоне иммунодефицита.

Ключевые слова: герпес-вирусы; вирус-ассоциированная пневмония; онкогематологические больные.

Для цитирования: Тихомиров Д.С., Гаранжа Т.А., Туполева Т.А., Троицкая В.В., Галстян Г.М., Филатов Ф.П. Факторы, влияющие на частоту возникновения вирусных пневмоний у онкогематологических больных. *Гематология и трансфузиология*. 2016; 61(1): 37–42. DOI 10.18821/0234-5730-2016-61-1-37-42

Tikhomirov D.S., [Garanzha T.A.], Tupoleva T.A., Troitskaya V.V., Galstyan G.M., Filatov F.P.

FACTORS AFFECTING THE INCIDENCE OF VIRAL PNEUMONIA IN PATIENTS WITH HEMATOLOGICAL MALIGNANCIES

National Research Center for Hematology, Moscow, 125167, Russian Federation

The aim of the study was to analyze clinical significance of herpes viruses DNA monitoring in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) of patients with hematological malignancies and pneumonia during or after chemotherapy. Samples of 171 enrolled patients were tested for human cytomegalovirus (CMV) DNA, herpes simplex virus I and II types (HSV) DNA, Epstein-Barr virus (EBV) DNA and human herpes virus 6 type (HV6) DNA. Viral load in BALF was also measured. Factors potentially increasing the rate of reactivation of endogenous herpes viruses have been evaluated. Among them: age of 50 years and over, laboratory signs of immunodeficiency like neutropenia and/or hypogammaglobulinemia, severity of condition/need for admission to ICU.

Results. HSV DNA proved the highest detection in BALF frequency. Statistically significant difference for HSV DNA detection rate was obtained (Chi-sq. = 7.65; $p = 0.022$) for patients with all evaluated factors. HSV 1 and 2 of types were shown to be the most frequently identified viruses. In majority of samples HSV viral load in BALF lies within high values such as 30% and above of ICU patient's BALF samples. In the vast majority of positive samples of DNA the concentration of this virus was in the area of high values (up to 10^7 copies/ml). Age over 50 years, and also such laboratory signs of immunodeficiency as neutropenia and/or hypogammaglobulinemia had no significant effect on the incidence rate of the development of herpes virus-associated pneumonia. There are no data evaluating the severity of virus-associated pneumonia against the background of immunodeficiency. There is no data describing the severity of the course of herpes virus associated pneumonia in patients with hematological malignancies.

Key words: herpes viruses; virus associated pneumonia; hematological malignancies.

For citation: Tikhomirov D.S., Garanzha T.A., Tupoleva T.A., Troitskaya V.V., Galstyan G.M., Filatov F.P. Factors affecting the incidence of viral pneumonia in patients with hematological malignancies. *Hematology and Transfusiology, Russian journal (Gematologiya i transfuziologiya)*. 2016; 61(1): 37–42. (in Russian). DOI: 10.18821/0234-5730-2016-61-1-37-42

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

Funding. The study had no sponsorship.

Received 08 November 2015

Accepted 11 February 2016