

11. Loges S., Heil G., Bruweleit M., Schoder V., Butzal M., Fischer U., et al. Analysis of concerted expression of angiogenic growth factors in acute myeloid leukemia: expression of angiopoietin-2 represents an independent prognostic factor for overall survival. *J. Clin. Oncol.* 2005; 23(6): 1109–17.
12. Perez-Atayde A.R., Sallan S.E., Tedrow U., Connors S., Alred E., Folkman J. Spectrum of tumor angiogenesis in the bone marrow of children with acute lymphoblastic leukemia. *Am. J. Pathol.* 1997; 150(3): 815–21.
13. Mirshahi P., Rafii A., Vincent L., Berthaut A., Varin R., Kalantar G., et al. Vasculogenic mimicry of acute leukemic bone marrow stromal cells. *Leukemia.* 2009; 23(6): 1039–48.
14. Colmone A., Amorim M., Pontier A.L., Wang S., Jablonski E., Sipkins D.A. Leukemic cells create bone marrow niches that disrupt the behavior of normal hematopoietic progenitor cells. *Science.* 2008; 322(5909): 1861–5.
15. Corre J., Mahtouk K., Attal M., Gadelorge M., Huynh A., Fleury-Cappellesso S., et al. Bone marrow mesenchymal stem cells are abnormal in multiple myeloma. *Leukemia.* 2007; 21(5): 1079–88.
16. Roela R.A., Carraro D.M., Brentani H.P., Kaiano J.H., Simao D.F., Guarnieiro R., et al. Gene stage-specific expression in the micro-environment of pediatric myelodysplastic syndromes. *Leuk. Res.* 2007; 31(5): 579–89.
17. Frisch B.J., Ashton J.M., Xing L., Becker M.W., Jordan C.T., Calvi L.M. Functional inhibition of osteoblastic cells in an in vivo mouse model of myeloid leukemia. *Blood.* 2012; 119(2): 540–50. doi: 10.1182/blood-2011-04-348151.
18. Krevvata M., Silva B.C., Manavalan J.S., Galan-Diez M., Kode A., Matthews B.G., et al. Inhibition of leukemia cell engraftment and disease progression in mice by osteoblasts. *Blood.* 2014; 124(18): 2834–46.
19. Geyh S., Rodríguez-Paredes M., Jager P., Khandanpour C., Cadeddu R.P., Gutekunst J., et al. Functional inhibition of mesenchymal stromal cells in acute myeloid leukemia. *Leukemia.* 2016; 30(3): 683–91.
20. Hanoun M., Zhang D., Mizoguchi T., Pinho S., Pierce H., Kunisaki Y., et al. Acute myelogenous leukemia-induced sympathetic neuropathy promotes malignancy in an altered hematopoietic stem cell niche. *Cell Stem Cell.* 2014; 15(3): 365–75.
21. Huan J., Hornick N.L., Shurtleff M.J., Skinner A.M., Goloviznina N.A., Roberts C.T., et al. RNA trafficking by acute myelogenous leukemia exosomes. *Cancer Res.* 2013; 73(2): 918–29.
22. Calkoen F.G., Vervat C., Eising E., Vijfhuizen L.S., 't Hoen P.B., van den Heuvel-Eibrink M.M., et al. Gene-expression and in vitro function of mesenchymal stromal cells are affected in juvenile myelomonocytic leukemia. *Haematologica.* 2015; 100(11): 1434–41. doi: 10.3324/haematol.2015.126938.
23. Mudry R.E., Fortney J.E., York T., Hall B.M., Gibson L.F. Stromal cells regulate survival of B-lineage leukemic cells during chemotherapy. *Blood.* 2000; 96(5): 1926–32.
24. Ayala F., Dewar R., Kieran M., Kalluri R. Contribution of bone microenvironment to leukemogenesis and leukemia progression. *Leukemia.* 2009; 23(12): 2233–41.
25. Blau O. Bone marrow stromal cells in the pathogenesis of acute myeloid leukemia. *Front. Biosci. (Landmark Ed.)* 2014; 19: 171–80.
26. Konopleva M., Zhao S., Hu W., Jiang S., Snell V., Weidner D., et al. The anti-apoptotic genes Bcl-X(L) and Bcl-2 are over-expressed and contribute to chemoresistance of non-proliferating leukaemic CD34+ cells. *Br. J. Haematol.* 2002; 118(2): 521–34.
27. Konopleva M., Konoplev S., Hu W., Zaritskey A.Y., Afanasiev B.V., Andreeff M. Stromal cells prevent apoptosis of AML cells by up-regulation of anti-apoptotic proteins. *Leukemia.* 2002; 16(9): 1713–24.

Поступила 10.05.16

Принята к печати 17.07.16

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 616.419-085.361.4-013.3-076.5:577.2.08

Баторов Е.В., Тихонова М.А., Крючкова И.В., Сергеевичева В.В., Сизикова С.А., Баторова Д.С., Ушакова Г.Ю., Гилевич А.В., Останин А.А., Черных Е.Р.

ВОССТАНОВЛЕНИЕ CD4⁺ Т-КЛЕТОК, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ МОЛЕКУЛУ CD31, У БОЛЬНЫХ ЛИМФОПРОЛИФЕРАТИВНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ПОСЛЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», 630099, г. Новосибирск, Россия

Цель работы – исследование динамики восстановления CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺ Т-клеток и ранее не описанной субпопуляции CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺ Т-клеток у больных лимфопролиферативными заболеваниями после высокодозной химиотерапии с трансплантацией аутологичных гемопоэтических стволовых клеток (ауто-ТГСК). В исследование вошли 87 больных. Методом проточной цитометрии оценивали количество CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺ и CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺ Т-клеток перед ауто-ТГСК, на день выхода из лейкопении, через 6 и 12 мес после ТГСК. Относительное количество CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺ Т-клеток значимо повышено у больных по сравнению со здоровыми лицами и восстанавливается после ауто-ТГСК до исходных показателей ко дню выхода из лейкопении. Посттрансплантационная лучевая терапия на область средостения приводит к значимому снижению количества CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺ Т-клеток и удлиняет период их восстановления. Облучение мягких тканей не приводит к значимому снижению этой субпопуляции клеток. При изучении восстановления CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺ Т-клеток методом проточной цитометрии нужно исключить из исследования CD31⁺ Т-клетки памяти.

К л ю ч е в ы е с л о в а: тимопоэз; CD31; трансплантация гемопоэтических стволовых клеток; восстановление лимфоцитов.

Для цитирования: Баторов Е.В., Тихонова М.А., Крючкова И.В., Сергеевичева В.В., Сизикова С.А., Баторова Д.С., Ушакова Г.Ю., Гилевич А.В., Останин А.А., Черных Е.Р. Восстановление CD4⁺ Т-клеток, экспрессирующих молекулу CD31, у больных лимфопролиферативными заболеваниями после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток. *Гематология и трансфузиология.* 2016; 61(3): 133-137. DOI: 10.18821/0234-5730-2016-61-3-133-137

Batorov E.V., Tikhonova M.A., Kryuchkova I.V., Sergeevicheva V.V., Sizikova S.A., Batorova D.S., Ushakova G.Yu., Gilevich A.V., Ostaniin A.A., Chernykh E.R.

RECOVERY OF CD4⁺ CD31⁺ T-CELL IN PATIENTS WITH LYMPHOPROLIFERATIVE DISORDERS FOLLOWING HEMATOPOIETIC STEM CELL TRANSPLANTATION

Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, 630090, Russian Federation

We have evaluated the dynamics of post-transplant recovery of CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺ T cells and CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺ T-cells in patients with lymphoproliferative diseases after high-dose chemotherapy with autologous stem cell transplantation (auto-HSCT). 87 patients were included in the study. The content of circulating CD4⁺CD31⁺ naïve and memory T-cells has been assessed with the use of flow cytometry before auto-HSCT, at the day of engraftment, and in 6 and 12 months. Relative amount of CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺ T-cells in patients was elevated in comparison with healthy controls, restored rapidly following auto-HSCT and reached initially high level at the day of engraftment. Post-transplant mediastinal radiotherapy significantly reduced counts of CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺

T-cells and extended recovery period compared to the non-irradiated patient level. Non-thymic tissue irradiation reduced this subset slightly and non-significantly. The study of the recovery of CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺T-cells by virtue of flow cytometry required an accurate gating strategy to exclude CD31⁺T memory cells.

К е у о р д с : thymopoiesis; CD31; hematopoietic stem cell transplantation; lymphocyte recovery.

For citation: Batorov E.V., Tikhonova M.A., Kryuchkova I.V., Sergeevicheva V.V., Sizikova S.A., Batorova D.S., Ushakova G.Yu., Gilevich A.V., Ostanin A.A., Chernykh E.R. Recovery of CD4⁺ CD31⁺ T-cell in patients with lymphoproliferative disorders following hematopoietic stem cell transplantation. *Hematology and Transfusiology. Russian Journal (Gematologiya i transfusiologya)*. 2016; 61(3): 133-137. (in Russian). DOI: 10.18821/0234-5730-2016-61-3-133-137

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

Funding. The study had no sponsorship.

Received 14 Oct 2015

Accepted 17 July 2016

Высокодозная химиотерапия с трансплантацией аутологичных гемопоэтических стволовых клеток (ауто-ТГСК) является одним из методов лечения лимфопролиферативных заболеваний (ЛПЗ). Восстановление субпопуляционного состава Т-клеток после высокодозной химиотерапии определяет эффективность адаптивного иммунного ответа после ТГСК.

Одним из механизмов реконституции Т-клеток является тимопоз [1]. Несмотря на значительную возрастную и индуцированную повреждениями (в том числе лучевой и химиотерапией) инволюцию, тимус сохраняет способность к регенерации и вносит определенный вклад в количественное восстановление пула периферических Т-клеток и обновление репертуара Т-клеточных рецепторов [2–5]. При этом минимальные уровни Т-клеток, несущих маркеры, недавно покинувших тимус и мигрировавших на периферию, обнаруживаются через 3–6 мес после аллогенной и ауто-ТГСК [6–9]. Позднее накопление на периферии наивных Т-клеток, недавно покинувших тимус, обусловлено как его индуцированной инволюцией, так и недостатком поступающих из костного мозга клеток-предшественников.

Функциональную активность тимуса оценивают по содержанию периферических Т-клеток с признаками недавно произошедшей реранжировки Т-клеточного рецептора, то есть содержащих в цитоплазме кольцевые молекулы ДНК, состоящие из фрагментов генов Т-клеточного рецептора (T cell receptor excision circles, TREC), методом полимеразной цепной реакции [10]. Помимо высокого содержания TREC мигрирующие из тимуса наивные CD4⁺ Т-клетки несут молекулу CD31 (т.е. имеют фенотип CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺) и отличаются большей длиной теломера и повышенной теломеразной активностью [11].

Исследования [12, 13] показали, что CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺ Т-клетки в присутствии интерлейкина-7 (ИЛ-7) способны пролиферировать без потери экспрессии CD31, что снижает диагностическую значимость CD31. Однако благодаря относительной простоте определения CD31 этот метод часто применяют для ориентировочной оценки восстановления тимопоза после ауто-ТГСК и аллогенной ТГСК при гематологических и аутоиммунных заболеваниях [6–9, 11]. Поскольку доля CD4⁺CD45RO⁺CD31⁺ Т-клеток памяти у здоровых доноров не превышает 5–10% в популяции CD4⁺ Т-лимфоцитов [14–16], отдельными исследователями рассматривается возможность оценки экспрессии CD31 в популяциях CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток без учета их разделения на наивные клетки и клетки памяти [14, 17].

Ранее мы показали [15], что у больных ЛПЗ на фоне низкого количества CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺ Т-клеток выявляется более высокое по сравнению со здоровыми лицами относительное содержание CD4⁺CD45RA⁺ Т-клеток, экспрессирующих молекулу CD31 (~20%). Данных об экспрессии CD31 Т-клетками памяти у больных гемобластомами, в том числе после высокодозной химиотерапии с ауто-ТГСК, в доступной литературе не обнаружено.

Цель работы – изучение динамики восстановления CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺ Т-клеток и ранее не описанной субпопуляции CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺ Т-клеток у больных ЛПЗ после высокодозной химиотерапии с ТГСК.

Для корреспонденции:

Баторов Егор Васильевич, кандидат мед. наук, научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», 630099, г. Новосибирск, Россия. E-mail: Ebatorov@mail.ru.

For correspondence:

Batorov Egor V., MD, PhD, researcher of the Laboratory of Cellular Immunotherapy of the Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, 630090, Russia. E-mail: Ebatorov@mail.ru.

Information about authors:

Batorov E.V., <http://orcid.org/0000-0003-2902-9336>, Scopus Author ID 35768879800; Chernykh E.R., <http://orcid.org/0000-0003-2346-6279>, Researcher ID: K-1052-2014.

Материал и методы

В исследование были включены 87 больных (41 мужчина и 46 женщин) в возрасте от 19 до 62 лет (медиана 37 лет), которым в период с января 2010 по июнь 2015 г. была проведена высокодозная химиотерапия с ауто-ТГСК на базе клиники иммунопатологии НИИФКИ. Неходжжкинские лимфомы (НХЛ) были диагностированы у 21, лимфома Ходжкина (ЛХ) – у 30 и множественная миелома (ММ) – у 36 больных. Забор крови и все иммунологические исследования проводили после получения письменного информированного согласия пациентов. В качестве группы сравнения были обследованы 19 здоровых доноров, сопоставимых по полу и возрасту.

Мобилизацию CD34⁺CD45⁺ гемопоэтических стволовых клеток проводили с помощью разных режимов химиотерапии (ХТ) с последующим введением препаратов гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (Г-КСФ, 5–10 мкг/кг в день). Процедуру афереза проводили на сепараторах клеток крови ASTEC 204 (Fresenius) и Spectra LRS 07 (COBE) после достижения в периферической крови концентрации 1×10^4 CD34⁺CD45⁺ клеток/мл и продолжали до получения $\geq 2 \times 10^6$ CD34⁺CD45⁺ клеток/кг. Больные НХЛ и ЛХ ($n = 51$) получали режим кондиционирования BEAM, больные ММ ($n = 36$) высокодозный мелфалан (140–200 мг/м²). Средняя доза трансплантированных гемопоэтических стволовых клеток составила $5,9 \pm 0,4 \times 10^6$ клеток/кг ($2,5–25 \times 10^6$ клеток/кг).

Исследование Т-клеточных субпопуляций проводили у пациентов до ауто-ТГСК (перед началом кондиционирования, $n = 61$), после ТГСК в день выхода из лейкопении (лейкоциты более 1×10^9 /л, в среднем на 13-й день, $n = 47$), через 6 ($n = 48$) и 12 мес ($n = 37$). Число больных на контрольных точках варьировало в связи с невозможностью в ряде случаев получить образцы крови. В исследование не были включены данные пациентов, которым после ауто-ТГСК проводили ХТ или

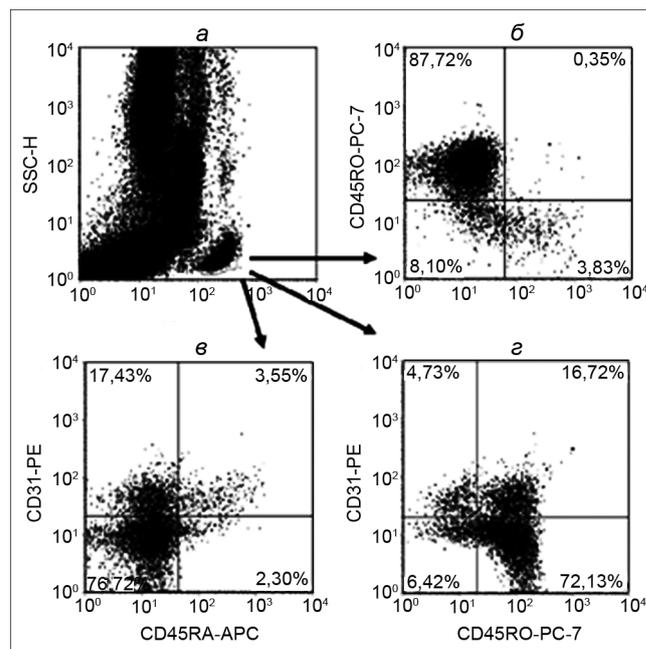


Рис. 1. Цитометрическая характеристика CD4⁺CD31⁺ Т-лимфоцитов.

Показана область гейтирования CD4⁺ Т-лимфоцитов (а), в которой определяли экспрессию на клетках CD45RA, CD45RO, CD31. Показано отсутствие одновременной экспрессии молекул CD45RA и CD45RO на CD4⁺ Т-клетках (б). Относительное содержание CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺-клеток (в) (17,43%) сопоставимо со значением CD4⁺CD45RO⁺CD31⁺-клеток (з) (16,72%).

Представлены данные репрезентативного пациента. Здесь и на рис. 2–4: относительное содержание, % от CD4⁺ Т-клеток.

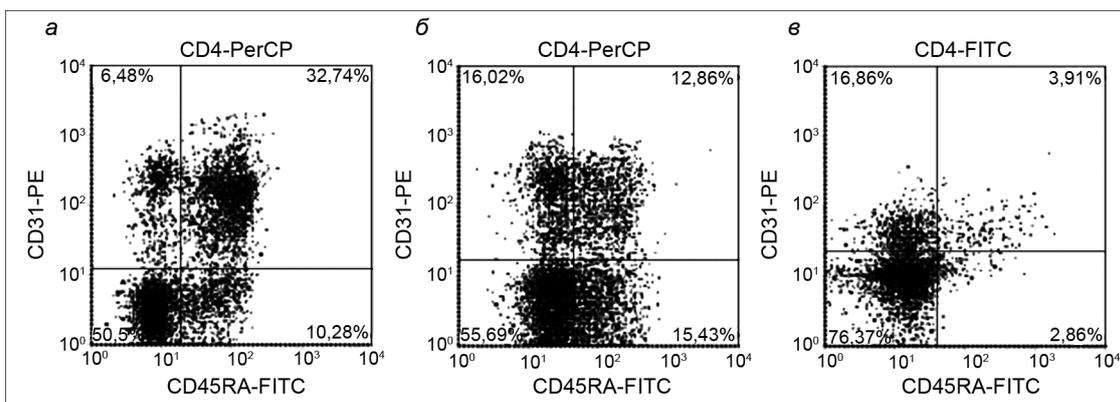


Рис. 2. Цитометрическая характеристика CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺ T-клеток.

Показана экспрессия молекулы CD31 на CD45RA⁺ (верхние правые квадранты) и CD45RA⁻ (верхние левые квадранты) CD4⁺ T-клетках здорового донора (а) и больного перед ТГСК (б) и в день выхода из лейкопении (в). Представлены данные репрезентативных донора и пациента.

повторную ауто-ТГСК. Монотерапия бортезомибом у больных ММ после ауто-ТГСК к исключению из исследования не приводила.

Общий анализ крови оценивали на автоматическом гематологическом анализаторе Nema-Screen 18 ("Hospitex Diagnostics", Италия). Методом проточной цитометрии оценивали относительное содержание CD45RA⁺CD31⁺, CD45RA⁻CD31⁺ и CD45RO⁺CD31⁺ T-клеток периферической крови в гейте CD4⁺ лимфоцитов, используя анти-CD4 (FITC, «Сорбент-сервис», Россия; PerCP, "BD Biosciences", США), анти-CD45RA (FITC, "BD Biosciences", США; APC, "Beckman Coulter", Франция), анти-CD45RO (PC7, "Beckman Coulter", Франция), анти-CD31 (PE, "BD Biosciences", США) моноклональные антитела в соответствии с инструкциями производителей. Исследование проводили по общепринятой методике с использованием параметров прямого и бокового светорассеяния и флуоресценции по каналам FL-1 (FITC), FL-2 (PE), FL-3 (PerCP, PC7), FL-4 (APC) ("BD FACSCalibur", США). В тексте относительное содержание описываемых субпопуляций представлено в виде процента от CD4⁺ T-клеток.

Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета программ Statistica 6.0 ("StatSoft"). Для оценки значимости различий между группами больных использовали непараметрический U-критерий Манна-Уитни для непрерывных переменных. Различия считали статистически значимыми при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты

Для изучения динамики восстановления CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺ и CD4⁺CD45RA⁻CD31⁺ T-клеток у больных ЛПЗ был проведен сравнительный анализ относительного и абсолютного количества этих клеток до ТГСК, на момент выхода из лейкопении, через 6 и 12 мес после ТГСК.

Для подтверждения соответствия популяции CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺ T-хелперов клеткам памяти у произвольно взятых пациентов методом проточной цитометрии оценили содержание CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺ и CD4⁺CD45RO⁺CD31⁺ T-клеток, при этом было показано отсутствие одновременной экспрессии молекул CD45RA и CD45RO в исследуемой популяции (рис. 1). Сравнение относительного содержания этих субпопуляций в группе из 45 пациентов подтвердило соответствие CD45RA⁺ T-лимфоцитов CD45RO⁺ клеткам памяти: $18,5 \pm 2$ и $17,1 \pm 2,1\%$ соответственно.

У больных перед ТГСК относительное количество CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺ T-клеток было ниже по сравнению с донорами (см. рис. 2, а, б; таблицу). На день выхода из лейкопении после ауто-ТГСК содержание циркулирующих CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺

T-клеток было значимо ниже исходных значений (см. рис. 2, б, в; таблицу). Через 6 мес после ТГСК относительное количество этой субпопуляции восстанавливалось до исходного, через 12 мес достигало значений здоровых доноров (см. таблицу).

В отличие от CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺ T-клеток доля CD4⁺CD45RA⁻CD31⁺ T-клеток больных перед ауто-ТГСК была значимо выше показателей доноров (см. рис. 1, а, б; таблицу). Относительное количество клеток этой субпопуляции быстро восстанавливалось после ауто-ТГСК, значимо не отличаясь от исходных значений уже на день выхода из лейкопении (см. рис. 1, б, в), и оставалось на одном уровне в течение года. На всех исследуемых временных точках относительное содержание CD4⁺CD45RA⁻CD31⁺ T-клеток было значимо выше показателей доноров (см. таблицу).

Динамика восстановления абсолютного количества CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺ T-клеток в целом соответствовала изменениям их относительного содержания. По сравнению с уровнем этих клеток до ауто-ТГСК количество CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺ T-клеток на день выхода из лейкопении было ниже такового к 6 мес и значимо выше – через 12 мес. В течение всего периода наблюдения абсолютные показатели CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺ T-клеток были ниже значений здоровых доноров (см. таблицу).

Абсолютное количество CD4⁺CD45RA⁻CD31⁺ T-клеток было значимо ниже предтрансплантационного уровня к моменту выхода из лейкопении и не отличалось от него через 6 и 12 мес. При этом длительная лимфопения у больных до и после ауто-ТГСК обуславливала сохранение низкого абсолютного содержания CD4⁺CD45RA⁻CD31⁺ T-клеток на день выхода из лейкопении и отсутствие различий с содержанием до ауто-ТГСК и через 6 мес по сравнению со здоровыми донорами (см. таблицу). Восстановление пула лимфоцитов через 12 мес после ауто-ТГСК приводило к значимому увеличению абсолютного количества этих клеток (см. таблицу).

У 17 больных ЛХ и НХЛ была проведена лучевая терапия (ЛТ) на остаточную опухоль в первые 6 мес после ауто-ТГСК, из них у 11 – на область средостения, у 6 – на лимфатические узлы шеи и образования мягких тканей. Медиана времени от даты ауто-ТГСК до окончания ЛТ составила 2,9 мес, медиана суммарной очаговой дозы – 30 Гр. Для оценки динамики реконструкции исследуемых субпопуляций в условиях нарушенного тимопоэза данные этих больных на этапе 6 и 12 мес представлены отдельно. Также отдельно описаны показатели пациента, которому до ауто-ТГСК была проведена тимомэктомию.

Относительное и абсолютное содержание субпопуляций CD4⁺CD31⁺ T-клеток у больных ЛПЗ до и после ТГСК

Субпопуляция клеток	Здоровые доноры (n = 19)	До ТГСК (n = 50)	Выход из лейкопении (n = 38)	+6 мес (n = 36)	+12 мес (n = 24)
Лимфоциты, $\times 10^9/\text{л}$	1,9 (1,5–2,3)	1,2 (0,8–1,6)*	0,7 (0,6–0,9) ***	1,4 (1,0–2,2)*	1,7 (1,3–2,4) **
CD4 ⁺ CD45RA ⁺ CD31 ⁺ T-клетки, %	27,5 (22–38,1)	16,5 (6,1–27) *	1,9 (1,4–3) ***	13,7 (6,7–23)*	22,2 (12,5–31,5)
CD4 ⁺ CD45RA ⁻ CD31 ⁺ T-клетки, %	9 (7–10)	20 (10,5–27,4)*	15 (8,8–18,8) *	18,3 (14,9–23,3) *	18,5 (12–23,7)*
CD4 ⁺ CD45RA ⁺ CD31 ⁺ T-клетки, клеток/мм ³	198 (137–319)	54 (24–128)*	6 (3–9)***	43 (18–76) *	95 (56–176) ***
CD4 ⁺ CD45RA ⁻ CD31 ⁺ T-клетки, клеток/мм ³	58 (45–81)	72 (36–149)	31 (21–59) ***	46 (36–82)	94 (58–112) *

Примечание. Данные представлены в виде: медиана (нижняя квартиль – верхняя квартиль); Me (LQ–UQ). Относительное содержание в виде процента от CD4⁺ T-клеток.

Представлены данные больных, которым не проводили лучевую терапию после ТГСК: * $p_U < 0,01$ – по сравнению с соответствующими значениями здоровых доноров; ** $p_U < 0,05$ – по сравнению с соответствующими значениями больных до ТГСК.

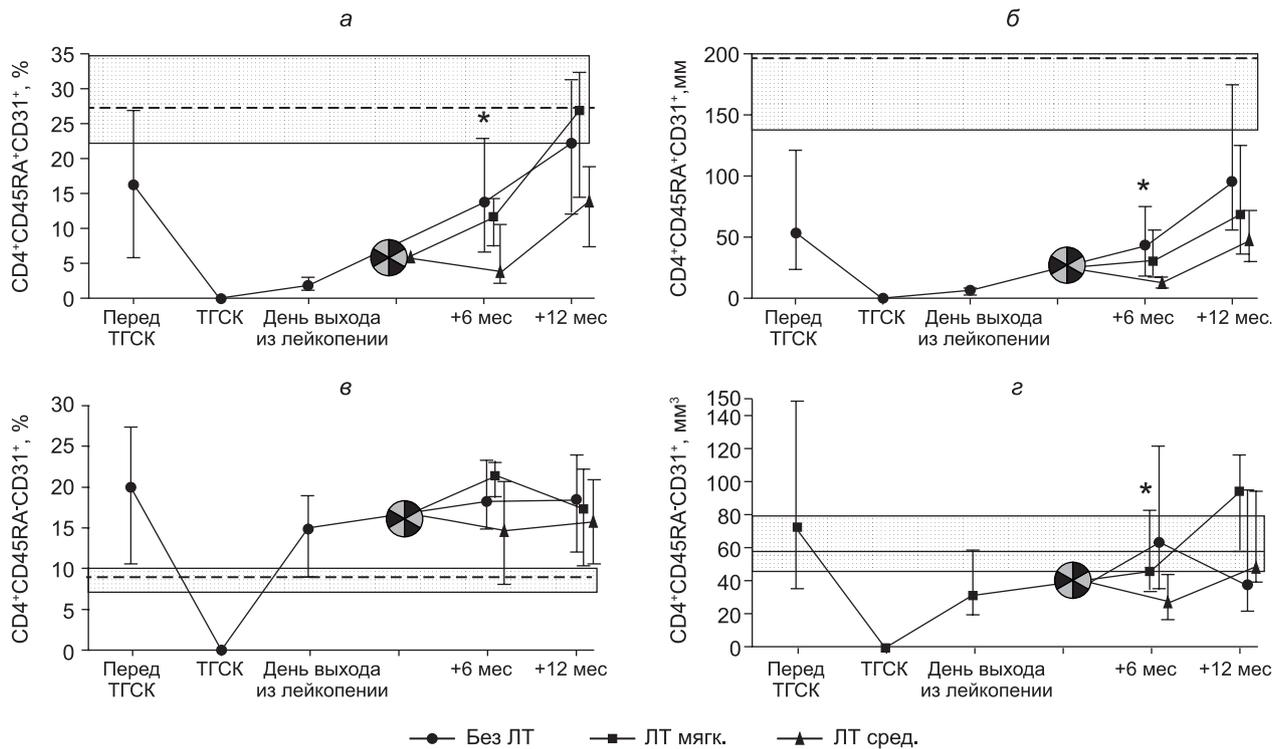


Рис. 3. Влияние лучевой терапии после ТГСК на динамику восстановления $CD4^+CD45RA^+CD31^+$ и $CD4^+CD45RA^-CD31^+$ Т-клеток. Схематично представлена динамика восстановления относительного (а, в) и абсолютного (б, г) количества $CD4^+CD45RA^+CD31^+$ (а, б) и $CD4^+CD45RA^-CD31^+$ (в, г) Т-клеток больных ЛПЗ без лучевой терапии (сплошная линия), с лучевой терапией на область средостения (штрихпунктирная линия) или мягких тканей (штриховая линия) после ТГСК.

ЛТ – лучевая терапия, мягк. – мягкие ткани, сред. – средостение. Пунктирной линией обозначены медианы соответствующих значений здоровых доноров, серой зоной – их интерквартильные диапазоны (а, б – частично). Данные в виде Me (LQ–UQ). * $p_U < 0,05$ в сравнении с соответствующими значениями у больных, которым проводили лучевую терапию на область средостения после ТГСК. Символом обозначена медиана времени окончания лучевой терапии.

У больных после ЛТ на область средостения было отмечено более низкое относительное содержание $CD4^+CD45RA^+CD31^+$ Т-клеток после ауто-ТГСК, чем у больных оппоритной группы: через 6 мес – 4% (2,4–10%); $p_U = 0,0081$, через 12 мес – 14% (7,4–19%); $p_U = 0,069$ (рис. 3, а). Различия сохранялись и для абсолютных значений: 13 клеток/ mm^3 (9–17 клеток/ mm^3); $p_U = 0,018$ и 48 клеток/ mm^3 (33–72 клеток/ mm^3); $p_U = 0,066$ соответственно (рис. 3, б).

Содержание $CD4^+CD45RA^+CD31^+$ Т-клеток у больных после ЛТ мягких тканей не различалось от такового у больных с ЛТ на область средостения и у больных, не получавших ЛТ, занимающих промежуточное положение между указанными группами. Через 6 и 12 мес относительное количество этих клеток составило 11,5% (7,6–14,1%) и 27% (15,8–32,5%), абсолютное – 31 клеток/ mm^3 (17–55 клеток/ mm^3) и 70 клеток/ mm^3 (38–125 клеток/ mm^3) соответственно (рис. 3, а, б).

Относительное количество $CD4^+CD45RA^-CD31^+$ Т-клеток через 6 и 12 мес у больных, которым была проведена ЛТ на область средостения, составило 14,7% (8–21%) и 15,8% (10,7–20,8%), у больных

после ЛТ мягких тканей – 21,4% (18,8–23%) и 17,3% (10,3–21,8%) соответственно. Значимого снижения данной субпопуляции у больных после ЛТ по сравнению с оппоритной группой не наблюдалось (рис. 3, в).

Абсолютное содержание $CD4^+CD45RA^-CD31^+$ Т-клеток через 6 и 12 мес у больных, которым была проведена ЛТ на область средостения, составило 28 клеток/ mm^3 (18–44 клетки/ mm^3) и 48 клеток/ mm^3 (39–94 клетки/ mm^3), у больных после ЛТ мягких тканей – 64 клеток/ mm^3 (38–121 клетка/ mm^3) и 38 клеток/ mm^3 (23–95 клеток/ mm^3) соответственно. Абсолютное содержание $CD4^+CD45RA^-CD31^+$ Т-клеток у больных после ЛТ на область средостения было значительно ниже такового в группе больных без ЛТ через 6 мес после ауто-ТГСК ($p_U = 0,047$) (рис. 3, г). Вероятно, это было связано с тенденцией к более низкому содержанию лимфоцитов у больных после ЛТ, чем у больных оппоритной группы в эти сроки (1,05 против $1,4 \times 10^9/l$; $p_U = 0,097$).

Отдельно мы представили показатели больного ЛХ, которому в дебюте заболевания (2008) была проведена тимомэктомию.

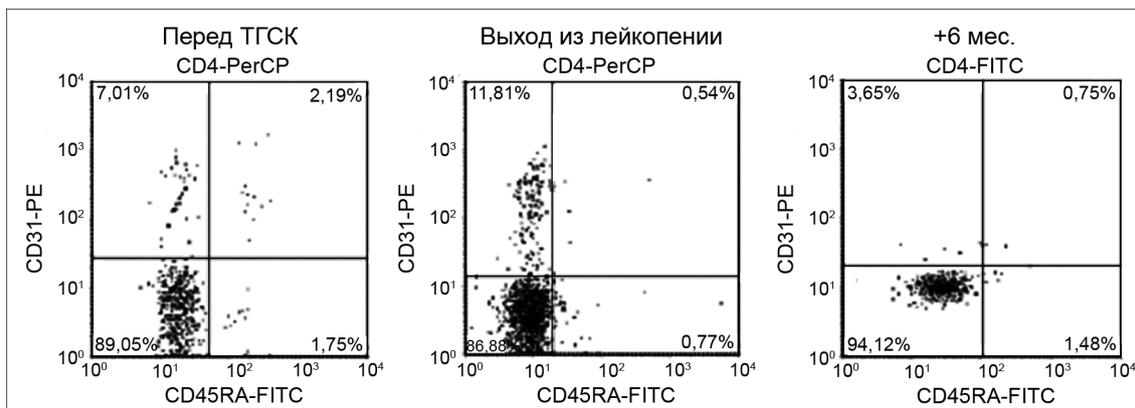


Рис. 4. Цитометрическая характеристика $CD4^+CD45RA^+CD31^+$ Т-клеток у больного после тимомэктомию.

Показана экспрессия молекулы CD31 на $CD45RA^+$ (верхние правые квадранты) и $CD45RA^-$ (верхние левые квадранты) $CD4^+$ Т-клетках больного после тимомэктомию перед ТГСК (а), в день выхода из лейкопении (б) и через 6 мес после ТГСК (в).

Перед ауто-ТГСК относительное содержание CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺ Т-клеток составляло 2,19%, после ауто-ТГСК эти клетки практически не определялись: на день выхода из лейкопении – 0,54%, через 6 мес – 0,75% (рис. 4). Абсолютное содержание CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺ Т-клеток составило 11 клеток/мм³ до ауто-ТГСК, 3 клетки/мм³ на день выхода из лейкопении и 3 клетки/мм³ – через 6 мес.

Относительное количество CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺ Т-клеток перед ауто-ТГСК также было ниже, чем у больных в целом, и составило 7,01%. На день выхода из лейкопении содержание этой субпопуляции увеличивалось до 11,81%, а через 6 мес после ауто-ТГСК снижалось до 3,65% (см. рис. 4). Соответственно, абсолютные значения этой субпопуляции перед ауто-ТГСК составили 36 клеток/мм³, на день выхода из лейкопении – 74 клетки/мм³, через 6 мес – 16 клеток/мм³.

Обсуждение

Учитывая важную роль наивных Т-лимфоцитов, отвечающих за многообразие Т-клеточных рецепторов, в противоионфекционном и противоопухолевом иммунном ответе [13–15], настоящая работа была посвящена изучению динамики восстановления CD4⁺CD31⁺ Т-клеток у больных ЛПЗ после высокодозной химиотерапии с ауто-ТГСК.

Описанные изменения относительного и абсолютного количества CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺ Т-клеток, их длительное постепенное восстановление после высокодозной химиотерапии с ТГСК и после ЛТ соответствуют данным литературы [6–9]. Выраженное снижение этой субпопуляции у больных после ЛТ на область средостения и практически полное их отсутствие у больного после тимомэктомии косвенно подтверждают тимическое происхождение этих клеток.

Некоторое снижение популяции CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺ Т-клеток у больных после ЛТ мягких тканей, т.е. не повреждавшей ткани средостения, может быть связано с действием локального облучения на данную субпопуляцию на периферии [18, 19]. Известно, что наивные Т-лимфоциты более радиочувствительны, чем клетки памяти. S. Yovino и соавт. [18] ранее отмечали, что локальная ЛТ в суммарной очаговой дозе 20 Гр приводит к облучению 61,5% общего объема крови дозой ≥ 0,5 Гр, при этом *in vitro* было показано, что для эрадикации 50% популяции лимфоцитов достаточно дозы ~2 Гр.

Большой интерес представляет анализ экспрессии молекулы CD31 в популяции CD4⁺ Т-клеток памяти у больных ЛПЗ. Быстрое восстановление количества CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺ (CD4⁺CD45RO⁺CD31⁺) Т-клеток после ауто-ТГСК до исходных значений свидетельствует об отсутствии прямой связи этой субпопуляции с недавно мигрировавшими из тимуса в периферическое русло CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺ Т-клетками. Длительное критически сниженное содержание CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺ Т-клеток после ауто-ТГСК ограничивает возможность массовой прямой дифференцировки наивных лимфоцитов в клетки памяти с сохранением экспрессии молекулы CD31. Это подтверждается также отсутствием значимого снижения относительного содержания CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺ Т-клеток после ЛТ и сохранением этой субпопуляции после тимомэктомии. Вероятно, часть Т-лимфоцитов (у больных ЛПЗ до 20% CD4⁺ Т-клеток) экспрессирует молекулу CD31 *de novo* после дифференцировки в клетки памяти, однако биологический смысл, а также стимулирующие факторы в настоящее время остаются неясными и требуют дальнейшего изучения.

Ранее было показано [11, 20], что молекулу CD31 (тромбоцитарная/эндотелиальная молекула адгезии 1, platelet/endothelial cell adhesion molecule 1, PECAM-1) экспрессируют эндотелиальные клетки, тромбоциты, гранулоциты, наивные Т-клетки, моноциты и дендритные клетки. Функции этого маркера на наивных CD4⁺ Т-клетках многообразны и не до конца изучены [11–13, 20]. Гомофильное связывание молекул CD31 играет роль в трансэндотелиальной миграции. Описана возможность пролиферации CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺ Т-клеток без потери экспрессии CD31 при стимуляции ИЛ-7 – основным цитокином, инициирующим и поддерживающим гомеостатическую пролиферацию CD4⁺ Т-клеток [12, 13]. Кроме того, в эксперименте было показано, что на ранних стадиях активации стимуляция CD31 повышает порог чувствительности Т-клеточного рецептора и обеспечивает контролируемую активацию наивных Т-клеток и соответственно их выживаемость [20].

Необходимо отметить, что относительно большой процент CD4⁺ Т-клеток памяти, экспрессирующих CD31, требует аккуратности при интерпретации цитометрических данных относительно восстановления тимопоэза в раннем посттрансплантационном периоде, в частности, необходимости определения экспрессии CD31 именно в популяции CD4⁺CD45RA⁺ Т-клеток, а не в общей популяции CD4⁺ Т-лимфоцитов.

Полученные данные позволяют сделать несколько заключений:

- Восстановление наивных CD4⁺ Т-клеток за счет CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺ Т-клеток происходит в сроки через 6–12 мес

после ауто-ТГСК. ЛТ на область средостения у больных ЛПЗ после высокодозной химиотерапии с ауто-ТГСК значительно уменьшает относительное и абсолютное количество CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺ Т-клеток. Облучение иных областей не приводит к значимому снижению этой субпопуляции клеток. Это свидетельствует о зависимости CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺ Т-клеток от повреждающих тимус воздействий и об удлинении периода восстановления этих клеток при проведении ЛТ в посттрансплантационном периоде.

- Относительное количество CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺ Т-клеток значимо повышено у больных ЛПЗ, чем у здоровых людей. Их быстрое восстановление после ауто-ТГСК и отсутствие связи с изменениями количества CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺ Т-клеток свидетельствуют об экспрессии CD31 молекулы CD4⁺ Т-клетками памяти *de novo*, однако ее функциональное значение на сегодняшний день не изучено.

- При оценке реконституции CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺ Т-клеток после ауто-ТГСК методом проточной цитометрии необходимо учитывать возможность экспрессии CD31 на CD4⁺CD45RA⁺ Т-клетках и во избежание завышения результатов следует определять количество CD31-экспрессирующих клеток в субпопуляции CD4⁺CD45RA⁺ Т-клеток.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

- Хайдуков С.В. Малые субпопуляции Т-хелперов (Th наивные тимические, Th наивные центральные, Th9, Th22 и CD4⁺CD8⁺ дважды положительные Т-клетки. *Медицинская иммунология*. 2013; 15(6): 503–12.
- Баторов Е.В., Блинова Е.А., Тихонова М.А., Лопатникова Ю.А., Крючкова И.В., Баторова Д.С. и др. Влияние клинических факторов на показатели функциональной активности тимуса у больных гемобластозами. *Гематология и трансфузиология*. 2014; 59(3): 16–21.

Остальные источники литературы см. в References

REFERENCES

- Mackall C.L., Hakim F.T., Gress R.E. Restoration of T-cell homeostasis after T-cell depletion. *Semin. Immunol.* 1997; 9(6): 339–46.
- Goronzy J.J., Lee W.W., Weyand C.M. Aging and T-cell diversity. *Exp. Gerontol.* 2007; 42(5): 400–6.
- Poulin J.F., Viswanathan M.N., Harris J.M., Komanduri K.V., Wieder E., Ringuelet N., et al. Direct evidence for thymic function in adult humans. *J. Exp. Med.* 1999; 190(4): 479–86.
- Sfikakis P.P., Gourgoulis G.M., Mouloupoulos L.A., Kouvatseas G., Theofilopoulos A.N., Dimopoulos M.A. Age-related thymic activity in adults following chemotherapy-induced lymphopenia. *Eur. J. Clin. Invest.* 2005; 35(6): 380–7.
- Qi Q., Liu Y., Cheng Y., Glanville J., Zhang D., Lee J.Y., et al. Diversity and clonal selection in the human T-cell repertoire. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2014; 111(36): 13139–44.
- Ringhoffer S., Rojewski M., Döhner H., Bunjes D., Ringhoffer M. T-cell reconstitution after allogeneic stem cell transplantation: assessment by measurement of the sTREC/βTREC ratio and thymic naive T cells. *Haematologica*. 2013; 98(10): 1600–8.
- Sairafi D., Mattsson J., Uhlén M., Uzunel M. Thymic function after allogeneic stem cell transplantation is dependent on graft source and predictive of long term survival. *Clin. Immunol.* 2012; 142(3): 343–50.
- Alexander T., Thiel A., Rosen O., Massenkeil G., Sattler A., Kohler S., et al. Depletion of autoreactive immunologic memory followed by autologous hematopoietic stem cell transplantation in patients with refractory SLE induces long-term remission through de novo generation of a juvenile and tolerant immune system. *Blood*. 2009; 113(1): 214–23.
- Khaydukov S.V. Minor subsets of T-helper cells (Th thymic naive, Th central naive, Th9, Th22 and CD4⁺CD8⁺ double positive T-cells. *Medical immunology. Russian journal (Meditsinskaya immunologiya)*. 2013; 15(6): 503–12. (in Russian)
- Hazenbergh M.D., Verschuren M.C., Hamann D., Miedema F., van Dongen J.J. T cell receptor excision circles as markers for recent thymic emigrants: basic aspects, technical approach, and guidelines for interpretation. *J. Mol. Med. (Berl)*. 2001; 79(11): 631–40.
- Köhler S., Thiel A. Life after the thymus: CD31⁺ and CD31⁻ human naive CD4⁺ T-cell subsets. *Blood*. 2009; 113(4): 769–74.
- Chu Y.W., Memon S.A., Sharrow S.O., Hakim F.T., Eckhaus M., Lucas P.J., et al. Exogenous IL-7 increases recent thymic emigrants in peripheral lymphoid tissue without enhanced thymic function. *Blood*. 2004; 104(4): 1110–9.
- Azevedo R.L., Soares M.V., Barata J.T., Tendeiro R., Serra-Caetano A., Victorino R.M., et al. IL-7 sustains CD31 expression in human naive CD4⁺ T cells and preferentially expands the CD31⁺ subset in a PI3K-dependent manner. *Blood*. 2009; 113(13): 2999–3007.
- Junge S., Kloeckener-Gruissem B., Zufferey R., Keisker A., Salgo B., Fauchere J.C., et al. Correlation between recent thymic emigrants and CD31⁺(PECAM-1) CD4⁺ T cells in normal individuals during aging and in lymphopenic children. *Eur. J. Immunol.* 2007; 37(11): 3270–80.
- Batorov E.V., Блинова Е.А., Тихонова М.А., Лопатникова Ю.А., Крючкова И.В., Баторова Д.С., et al. Relationship between clinical factors and functional activity of the thymus in patients with hematological malignancies. *Hematology and Transfusiology. Russian journal (Gematologiya i transfuziologiya)*. 2014; 59(3): 16–21. (in Russian)
- Ruiz-Hernandez R., Jou A., Cabrera C., Noukve F., de Haro J., Borrás F., et al. Distribution of CD31 on CD4 T-cells from cord blood, peripheral blood and tonsil at different stages of differentiation. *Open. Immunol. J.* 2010; 3 (1): 19–26.
- Nausch N., Bourke C.D., Appleby L.J., Rujević N., Lantz O., Trottein F., et al. Proportions of CD4⁺ memory T cells are altered in individuals chronically infected with *Schistosoma haematobium*. *Sci. Rep.* 2012; 2: 472. doi:10.1038/srep00472.
- Yovino S., Kleinberg L., Grossman S.A., Narayanan M., Ford E. The etiology of treatment-related lymphopenia in patients with malignant gliomas: modeling radiation dose to circulating lymphocytes explains clinical observations and suggests methods of modifying the impact of radiation on immune cells. *Cancer Invest.* 2013; 31(2): 140–4.
- Koukourakis G.V., Zambis H., Zacharias G.A., Koukourakis M.J. Post-surgical irradiation causes cellular immune suppression in patients with breast cancer. *Eur. J. Cancer Care (Engl)*. 2009; 18(3): 306–12.
- Marelli-Berg F.M., Clement M., Mauro C., Caligiuri G. An immunologist's guide to CD31 function in T-cells. *J. Cell Sci.* 2013; 126(Pt 11): 2343–52. doi: 10.1242/jcs.124099.

Поступила 14.10.15
Принята к печати 17.07.16