

ОЛИГОКЛОНАЛЬНОСТЬ И СУБПОПУЛЯЦИОННЫЙ СОСТАВ Т-КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА У БОЛЬНЫХ АПЛАСТИЧЕСКОЙ АНЕМИЕЙ

Абрамова А. В.^{*}, Гальцева И. В., Михайлова Е. А., Капранов Н. М., Давыдова Ю. О., Фидарова З. Т., Троицкая В. В., Паровичникова Е. Н., Савченко В. Г.

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 125167, Москва, Россия

РЕЗЮМЕ

Ведение. Основным патогенетическим механизмом развития апластической анемии (АА) считается нарушение иммунной регуляции кроветворения.

Цель: изучить субпопуляционный состав Т-клеток и репертуар Т-клеточного рецептора у больных АА.

Методы. С 2018 по 2020 г. в исследование были включены больные АА ($n = 40$) до начала иммуносупрессивной терапии. Исследование субпопуляционного состава Т-клеток и олигоклональности Т-клеточного рецептора по семействам V β (ТКР-V β) образцов костного мозга проводили с помощью метода проточной цитометрии.

Результаты. Выявлены наиболее характерные особенности Т-клеточных субпопуляций у всех больных АА в образцах костного мозга: увеличение количества цитотоксических Т-клеток, эффекторных CD4⁺ и CD8⁺ клеток, CD4⁺ клеток памяти, что может подтверждать наличие длительной антигенной стимуляции с последующей активацией этих субпопуляций клеток, в результате которой происходит гиперэкспрессия провоспалительных цитокинов. Уменьшение наивных CD4⁺ и CD8⁺ клеток, регуляторных Т-клеток, двойных негативных Т-клеток может указывать на снижение контроля за цитокинпродуцирующими Т-клетками. Установлена связь между степенью тяжести АА и количеством эффекторных Т-клеток, Т-регуляторных клеток, двойных негативных Т-клеток и PD-1-позитивных Т-клеток. Самое большое количество потенциально цитокинпродуцирующих Т-клеток и минимальное количество клеток, участвующих в регуляции Т-клеточной активности, было выявлено у больных сверхтяжелой АА. При анализе репертуара ТКР-V β была обнаружена олигоклональная экспансия преимущественно в субпопуляции цитотоксических Т-клеток.

Заключение. Обогащение определенных семейств V β свидетельствует о наличии аутореактивного Т-клеточного клона и подтверждает иммунный механизм развития АА. Динамическое исследование ТКР-V β -репертуара может быть предложено в качестве мониторинга течения заболевания. Метод проточной цитофлуориметрии помогает выявить значимые биомаркеры для мониторинга клонов Т-клеток при АА с целью наиболее точной оценки активности патологического процесса при АА.

Ключевые слова: апластическая анемия, субпопуляции лимфоцитов, Т-клетка, Т-клеточный рецептор, олигоклональность, проточная цитометрия

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование: финансовая поддержка при подготовке статьи оказана фармацевтической компанией Novartis.

Для цитирования: Абрамова А.В., Гальцева И.В., Михайлова Е.А., Капранов Н.М., Давыдова Ю.О., Фидарова З.Т., Троицкая В.В., Паровичникова Е.Н., Савченко В.Г. Олигоклональность и субпопуляционный состав Т-клеток костного мозга у больных апластической анемией. Гематология и трансфузиология. 2020; 65(4): 417–430. <https://doi.org/10.35754/0234-5730-2020-65-4-417-430>

OLIGOCLONALITY AND SUBPOPULATION STRUCTURE OF BONE MARROW T-CELLS IN PATIENTS WITH APLASTIC ANAEMIA

Abramova A. V. *, Galtseva I. V., Mikhailova E. A., Kapranov N. M., Davydova Yu. O., Fidarova Z. T., Troitskaya V. V., Parovichnikova E. N., Savchenko V. G.

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

ABSTRACT

Introduction. The main pathogenetic mechanism of the development of aplastic anemia (AA) is a violation of the immune regulation of hematopoiesis.

Aim: to study of the subpopulation composition of T-cells and the repertoire of the T-cell receptor in AA patients.

Patients and Methods. The study included AA patients (n = 40) without prior immunosuppressive therapy in 2018–2020. The T-cell subpopulation structure and T-cell receptor V β -family (TCR-V β) oligoclonality were studied in samples of bone marrow using flow cytometry.

Results. We report characteristic properties of T-cell subpopulations of bone marrow in all AA patients: elevated counts of cytotoxic T-cells, effector CD4⁺ and CD8⁺ cells, CD4⁺ memory cells, which may suggest a long-term antigenic stimulation with subsequent activation of these cell subpopulations resulting in hyperexpression of pro-inflammatory cytokines. Diminishing of naive CD4⁺ and CD8⁺ cells, regulatory and double negative T-cells may indicate a relaxing control of cytokine-producing T-cells. A relationship has been established between the AA severity and counts of effector, regulatory, double negative and PD-1 positive T-cells. A highest count of potentially cytokine-producing T-cells and lowest count of cells involved in T-cell activity regulation were observed in very severe AA patients. Studies of the TCR-V β repertoire revealed oligoclonal expansion in the cytotoxic T-cell subpopulation.

Conclusion. Enrichment in selected V β families suggests autoreactive T-cell clonality and attests to the immune nature of AA. A dynamic TCR-V β repertoire assay may be recommended in the disease monitoring. Flow cytometry helps identify valuable biomarkers for T-cell clone monitoring in AA and a better assessment of the disease progression.

Keywords: aplastic anaemia, lymphocyte subpopulations, T-cell, T-cell receptor, oligoclonality, flow cytometry

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

Financial disclosure: the work was supported by the Novartis company.

For citation: Abramova A.V., Galtseva I.V., Mikhailova E.A., Kapranov N.M., Davydova Yu.O., Fidarova Z.T., Troitskaya V.V., Parovichnikova E.N., Savchenko V.G. Oligoclonality and subpopulation structure of bone marrow T-cells in patients with aplastic anaemia. Russian Journal of Hematology and Transfusiology (Gematologiya i transfuziologiya). 2020; 65(4): 417–430 (in Russian). <https://doi.org/10.35754/0234-5730-2020-65-4-417-430>

Введение

Апластическая анемия (АА) — это редко встречающееся заболевание системы крови, характеризующееся тяжелой костномозговой недостаточностью с истощением пула гемопоэтических стволовых клеток (ГСК). Исследования, посвященные изучению АА, свидетельствуют об аутоиммунном механизме развития заболевания [1–3]. Главную роль в развитии аутоиммунных реакций при АА играют активированные цитотоксические Т-клетки, распознающие аутоантигены, представленные на гемопоэтических стволовых клетках с помощью молекул HLA (Human Leukocyte Antigens) класса I [4, 5]. Результаты исследований указывают на наличие антигенного стимула, который приводит к патологической активации и дисрегуляции CD4⁺ Т-клеток в костном мозге (КМ) и повышенной секреции провоспалительных цитокинов, основными из которых являются интерферон- γ (ИФН- γ) и фактор некроза опухоли- α [3, 6, 7]. Пусковой фактор активации иммунной системы неизвестен. Поэтому более детальное понимание иммунных механизмов развития болезни необходимо при разработке долгосрочного эффективного лечения.

ИФН- γ регулирует взаимодействие клеток, участвующих в иммунном ответе. Являясь продуктом Т-хелперов 1-го типа, он вместе с другими провоспалительными цитокинами активирует цитотоксические Т-лимфоциты (CD8⁺) и усиливает фагоцитарные и цитотоксические реакции в очаге воспаления, которым в данном случае является КМ [8]. В КМ больных АА выявляется выраженная качественная и количественная недостаточность регуляторных Т-клеток (T-reg), которые в нормальных условиях подавляют аутореактивность других популяций Т-клеток, в частности в отношении к ГСК [9, 10]. Особую роль в иммунном ответе при АА играют Т-хелперы, которые при активации начинают секретировать интерлейкин-2, что обеспечивает пролиферацию цитотоксических Т-лимфоцитов, которые, в свою очередь, являются источником продукции провоспалительных цитокинов [11].

Иммунный ответ и регуляцию активности Т-клеточного звена контролируют костимуляторные молекулы, которые в условиях активации Т-клеток способствуют ингибированию пролиферации, эффекторной функции (секреция цитокинов) и индукции апоптоза Т-клеток [12]. В нормальных условиях этот механизм ингибирования предотвращает чрезмерную активацию популяций Т-клеток, например нежелательные аутоиммунные реакции, поддерживая периферическую иммунную толерантность. Одной из таких костимуляторных молекул является PD-1 (Programmed cell death-1) — костимуляторный рецептор семейства CD28, который, взаимодействуя со своим лигандом PD-L1/PD-L2, ингибирует сигнальный путь, вовлеченный в активацию Т-клеток

и тем самым способствует подавлению активности Т-клеток и индукции апоптоза [13]. Блокировка либо PD-1, либо его лигандов способствует развитию системных и органоспецифических аутоиммунных заболеваний, что подтверждено в экспериментах на животных [14]. Результаты немногочисленных исследований показали повышенную экспрессию PD-1-рецептора на поверхности Т-клеток больных АА, что, вероятно, связано с aberrантной регуляцией активации Т-клеток при данном заболевании [15, 16]. Однако связь между высокой экспрессией PD-1 и АА не изучена.

Имеются данные о том, что у больных АА в КМ происходит пролиферация аутореактивных клонов цитотоксических Т-лимфоцитов. Этот процесс называют также олигоклональным обогащением (расширением) или экспансией Т-клеток [5, 10].

Аутоантиген потенциально может быть распознан Т-клеткой с определенным вариантом Т-клеточного рецептора (ТКР). Взаимодействие ТКР с антигеном ведет к активации Т-лимфоцита и является ключевым событием в запуске иммунного ответа [17]. ТКР состоит из двух субъединиц — α и β либо γ и δ . В каждой субъединице расположены два домена — константный (C), который закрепляет рецептор в плазматической мембране Т-лимфоцита, и переменный (V), который непосредственно отвечает за распознавание антигена. Узнавание Т-клеточным рецептором обширного спектра разнообразных антигенов достигается путем перегруппировки и рекомбинации V(D)J (V — variable, D — diversity и J — joining) участков генов переменных частей α - и β -цепей ТКР. Наибольшая изменчивость ТКР сосредоточена в участке CDR3 (complementarity determining region, CDR), который и определяет связывание рецептора с антигеном [18]. Именно этот участок представляет основной интерес при исследовании репертуара ТКР. Анализ перестройки ТКР обычно используется в диагностике лимфоидных злокачественных новообразований и может быть важным инструментом в изучении Т-клеточных реакций на патогены, и в том числе при аутоиммунных заболеваниях [19, 20].

При АА происходит нарушение иммунной регуляции и срыв толерантности к собственным антигенам, что приводит к пролиферации аутореактивных клонов Т-клеток [21–23]. Учитывая разнообразие спектра распознавания ТКР, идентификация иммунодоминантных клонов остается сложной задачей. Изучение Т-клеток и их клонального состава представляется актуальным в исследовании иммуноопосредованных гематологических заболеваний, так как может помочь в отслеживании активности заболевания, прогнозировании ответа на иммуносупрессивную терапию (ИСТ) и рецидива.

Известно несколько методических подходов к изучению клонального состава Т-клеток: определение клональности по реаранжировкам генов ТКР с помощью фрагментного анализа, секвенирование нового поколения или количественное определение Т-клеток с конкретным типом вариабельного домена β -цепи ТКР (репертуар ТКР-V β) методом проточной цитофлуориметрии. Существует 65 V β -сегментов в β -локусе ТКР, которые можно сгруппировать в 25 семейств (22 функциональных семейства), причем каждый член данного семейства имеет более 75 % гомологии на уровне нуклеотидов по меньшей мере с одним из других членов того же семейства [24]. Созданы моноклональные антитела, специфично связывающиеся с ТКР, принадлежащим к определенному V β -семейству. Частота встречаемости различных ТКР-V β -семейств отличается между собой, изучена и известна у здоровых людей в периферической крови. Увеличение доли какого-либо из V β -семейств выше верхней границы нормы может свидетельствовать о наличии Т-клеточного клона в пределах данного семейства [25]. Многоцветная проточная цитометрия позволяет также изучать функциональные подгруппы Т-клеток и маркеры активации [26]. Данные подходы дают детальное представление о характере Т-клеточного ответа и могут быть использованы для изучения иммунного механизма развития АА.

Целью исследования было изучение субпопуляционного состава Т-клеток и репертуара Т-клеточного рецептора у больных АА.

Материалы и методы

В исследование были включены больные АА ($n = 40$), обследовавшиеся в ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России до начала ИСТ с 2018 по 2020 г. и подписавшие информированное согласие на включение в исследование. Соотношение мужчин и женщин составило 1 : 1,2, медиана возраста — 25 (17–60) лет. Диагноз АА устанавливался на основании следующих критериев: трехростковая цитопения, малоклеточный КМ, отсутствие мегакариоцитов по данным миелограммы, аплазия при гистологическом исследовании КМ, отсутствие цитогенетических аномалий. Больные были разделены на три группы в зависимости от степени тяжести: нетяжелая АА (НАА) ($n = 23$), тяжелая АА (ТАА) ($n = 11$) и сверхтяжелая АА (СТАА) ($n = 6$). Основным критерием тяжести АА являлось количество гранулоцитов в периферической крови в дебюте заболевания (нейтрофилы более $0,5 \times 10^9/\text{л}$ — для НАА, $0,2\text{--}0,5 \times 10^9/\text{л}$ — для ТАА и менее $0,2 \times 10^9/\text{л}$ — для СТАА). Материал для исследования — первая порция аспирата КМ, полученная во время диагностических стерильных пункций. В качестве контрольной группы для определения субпопуляций Т-клеток и экспансии клонов V β Т-клеток использовали КМ 23 здоровых доноров КМ, подписавших информирован-

ное согласие на включение в исследование. Медиана возраста доноров составила 31 (19–52) год.

Определение субпопуляционного состава Т-лимфоцитов проводили с помощью метода проточной цитофлуориметрии. Для этого была разработана панель моноклональных антител к антигенам дифференцировки человека, меченых различными флуорохромными красителями, представленная в таблице 1. Использование данной панели моноклональных антител позволяет определить относительное количество Т-клеточных субпопуляций, представленных в таблице 2.

Для анализа ТКР-V β -репертуара Т-лимфоцитов КМ больных ($n = 39$) (данные одного пациента были удалены из исследования вследствие ошибки подготовки пробы) был использован коммерческий набор IOtest Beta Mark ТКР-V β Repertoire (Beckman Coulter, Майами, Флорида, США), позволяющий оценить следующие семейства ТКР-V β : V β 1, V β 2, V β 3, V β 4, V β 5.1, V β 5.2, V β 5.3, V β 7.1, V β 7.2, V β 8, V β 9, V β 11, V β 12, V β 13.1, V β 13.2, V β 13.6, V β 14, V β 16, V β 17, V β 18, V β 20, V β 21.3, V β 22 и V β 23. Данный набор включает 8 смесей моноклональных антител — каждая содержит антитела против 3 различных областей ТКР-V β -семейств, охватывающих 24 антигена ТКР-V β , что соответствует приблизительно 70 % нормального репертуара ТКР-V β человека [27].

Изучали репертуар ТКР-V β для Т-хелперов и Т-цитотоксических клеток отдельно. Система IOtest Beta Mark была адаптирована для исследования образцов КМ здоровых доноров и больных АА. Поскольку в литературе указаны референсные значения для ТКР-V β только в периферической крови, необходимо было уточнить референсные границы для ТКР-V β в КМ. Обогащенным считали семейство V β , если оно выходило за верхнюю границу уточненного референсного интервала. Если все значения ТКР-V β находились в пределах референсных интервалов доноров, то такие значения считали поликлональными. Олигоклональный результат определяли при наличии преобладания одного и более обогащенных V β -семейств, без поликлонального фона.

Статистическая обработка. Статистическая обработка выполнена с помощью R 3.6.3, GraphPad PRISM 8.0. Границы референсных интервалов для каждого из 24 клонов были рассчитаны на основании анализа КМ доноров и включали значения от 2,5 до 97,5 процентиля после исключения выбросов. Если у больного доля клеток с определенным семейством V β превышала референсное значение, то делали вывод о том, что у больного выявляется клон с данным ТКР-V β -семейством. Для определения соответствия распределения нормальному использовали критерий Шапиро — Уилка. Для определения отличий в долях различных субпопуляций Т-клеток у больных и доноров использовали

Таблица 1. Моноклональные антитела к антигенам дифференцировки человека, использованные в исследовании
Table 1. Monoclonal antibodies to human differentiation antigens used in the study

№	Антигенная специфичность <i>Antigenic specificity</i>	Флуорохром <i>Fluorochrome</i>	Клон <i>Clone</i>
1	CD3	FITC — флуоресцеин изотиоцианат <i>fluorescein isothiocyanate</i>	SK7
2	CD4	APC-Су7 — аллофикоцианин-цианин 7 <i>allophycocyanin-cyanine 7</i>	SK3
3	CD8	PerCP-Су5.5 — перидинин-хлорофилл протеин-цианин 5.5 <i>peridinin-chlorophyll protein-cyanine 5.5</i>	SK1
4	CD127	PE — фикоэритрин <i>phycoerythrin</i>	A019D5
5	CD56	PE — фикоэритрин <i>phycoerythrin</i>	MY31
6	CD25	FITC — флуоресцеин изотиоцианат <i>fluorescein isothiocyanate</i>	2A3
7	CD95	PE-Су7 — фикоэритрин-цианин 7 <i>phycoerythrin-cyanine 7</i>	DX2
8	CD274 (PD-L1)	PE-Су7 — фикоэритрин-цианин 7 <i>phycoerythrin-cyanine 7</i>	MIH1
9	CD28	APC — аллофикоцианин <i>allophycocyanin</i>	CD28.2
10	CD279 (PD-1)	APC — аллофикоцианин <i>allophycocyanin</i>	MIH4

Таблица 2. Основные Т-клеточные субпопуляции и фенотип клеток, определяемые в исследовании
Table 2. Main T-cell subpopulations and phenotypes defined in the study

Т-клетки <i>T-cells</i>	Фенотип клеток <i>Cell phenotype</i>	Популяция Т-клеток, относительно которой определяли долю <i>Reference T-cells</i>
Двойные негативные Т-клетки <i>Double-negative T-cells</i>	CD3 ⁺ CD4 ⁻ CD8 ⁻	CD3 ⁺ клетки CD3 ⁺ cells
Двойные позитивные Т-клетки <i>Double-positive T-cells</i>	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁺	CD3 ⁺ клетки CD3 ⁺ cells
Т-хелперы <i>T-helper cells</i>	CD3 ⁺ CD4 ⁺	CD3 ⁺ клетки CD3 ⁺ cells
Цитотоксические Т-клетки <i>Cytotoxic T-cells</i>	CD3 ⁺ CD8 ⁺	CD3 ⁺ клетки CD3 ⁺ cells
TNK-клетки <i>TNK cells</i>	CD3 ⁺ CD56 ⁺	CD3 ⁺ клетки CD3 ⁺ cells
В популяциях CD4⁺ и CD8⁺ клеток <i>CD4⁺ and CD8⁺ populations</i>		
Эффекторные Т-клетки <i>Effector T-cells</i>	CD28 ⁻ CD95 ⁺	CD28 ⁻ CD95 ⁺
Активированные Т-клетки <i>Activated T-cells</i>	CD25 ⁺	CD25 ⁺
Т-клетки «памяти» <i>Memory T-cells</i>	CD28 ⁺ CD95 ⁺	CD28 ⁺ CD95 ⁺
Регуляторные Т-клетки <i>Regulatory T-cells</i>	CD25 ⁺ CD127 ⁻	—
PD-1-позитивные клетки <i>PD-1 positive cells</i>	CD279 ⁺	CD279 ⁺
PD-L1-позитивные клетки <i>PD-L1 positive cells</i>	CD274 ⁺	CD274 ⁺
Наивные Т-клетки <i>Naive T-cells</i>	CD28 ⁺ CD95 ⁻	CD28 ⁺ CD95 ⁻

Т-критерий Стьюдента, если данные были распределены нормально, и критерий Манна — Уитни — в случае ненормальных распределений. Сравнение субпопуляций Т-клеток у больных АА с различной степенью тяжести и доноров осуществлялось с помощью критерия Краскела — Уоллиса с поправкой на множественные сравнения Данна. Для всех использованных критериев значимым был выбран уровень $p < 0,05$. Данные в таблицах представлены в виде среднего \pm стандартной ошибки среднего.

Результаты

Субпопуляционный состав Т-клеток костного мозга больных АА и доноров. При анализе субпопуляционного состава Т-клеток у больных АА выявлена достоверно ($p < 0,05$) большая доля $CD4^+$ и $CD8^+$ эффекторных клеток, $CD4^+$ клеток «памяти», $CD4^+PD-1^+$ и $CD8^+PD-1^+$, а количество субпопуляций $CD4^+$ и $CD8^+$ наивных клеток, $CD4^+PD-L1^+$ было достоверно ($p < 0,05$) меньше по сравнению с аналогичными субпопуляциями доноров (рис. 1). Субпопуляции $CD4^+$, $CD8^+$, $CD3^+CD4^+CD8^+$ (двойные позитивные Т-клетки), $CD3^+CD4^-CD8^-$ (двойные негативные Т-клетки), $CD8^+$ клеток «памяти», регуляторных Т-клеток, активированных $CD4^+$ и $CD8^+$, $CD8^+PD-L1^+$ клеток больных достоверно не отличались от аналогичных субпопуляций доноров (табл. 3).

Субпопуляционный состав Т-клеток костного мозга больных АА в зависимости от степени тяжести заболевания. При сравнении основных субпопуляций Т-клеток у больных в зависимости от степени тяжести АА достоверные отличия ($p < 0,05$) были получены только в популяции двойных негативных ($CD3^+CD4^-CD8^-$) Т-клеток (табл. 3). Однако у больных СТАА количество цитотоксических Т-клеток, эффекторных $CD4^+$ и $CD8^+$ клеток было больше, а количество Т-хелперов, наивных $CD4^+$ и $CD8^+$ клеток, $CD8^+$ клеток «памяти» и регуляторных Т-клеток меньше, чем у больных НАА и ТАА (рис. 1). Эти отличия не были достоверными, вероятно, вследствие малого числа больных.

Сравнение субпопуляционного состава Т-клеток костного мозга доноров и больных АА в зависимости от степени тяжести заболевания. При сравнении каждой группы тяжести АА (НАА, ТАА, СТАА) с референсными значениями, полученными у доноров, были обнаружены достоверные отличия ($p < 0,05$) по следующим субпопуляциям Т-клеток: в группе НАА выявлено большее количество $CD4^+$ клеток «памяти», эффекторных $CD8^+$ клеток и меньшая доля наивных $CD4^+$ и $CD8^+$ клеток; в группе СТАА выявлено большее количество эффекторных $CD4^+$ и $CD8^+$ клеток, $PD-1^+CD4^+$ клеток и меньшее количество $PD-L1^+CD4^+$ и $PD-L1^+CD8^+$ клеток. Таким образом, более выраженные отличия субпопуляционного состава Т-клеток были получены у больных НАА и СТАА

(рис. 1). Достоверных различий между остальными исследуемыми субпопуляциями не было выявлено, что может быть связано с небольшой выборкой больных в каждой группе.

Определение олигоклональности ТКР-V β -семейств у больных АА. При исследовании Т-клеточного репертуара V β -семейств Т-хелперов у больных АА величина определяемого клона не превышала 10 % по сравнению с референсными значениями доноров (рис. 2А). При анализе цитотоксических Т-клеток были определены клоны с преобладающими семействами, величина которых достигала 35 % по сравнению с референсными значениями (рис. 2Б).

В популяции Т-хелперов у больных наиболее часто встречались обогащенные семейства — V β 5.2 ($n = 5$), V β 16 ($n = 5$), V β 13.2 ($n = 6$), V β 8 ($n = 8$), V β 1 ($n = 9$), V β 20 ($n = 12$), V β 17 ($n = 14$). Четыре клона (V β 3, 5.3, 9, 23) из 24 V β -клонов не превышали референсных значений у всех больных АА. Только у 3 больных НАА не было выявлено клонов V β .

В популяции Т-хелперов был проведен анализ количества клонов V β в зависимости от степени тяжести АА. У 3 больных НАА не было выявлено расширения по ТКР-V β , а у 20 больных НАА количество обогащенных семейств V β варьировало от 1 до 6. У всех больных ТАА было обнаружено обогащение как минимум одного семейства V β . У всех больных СТАА были обнаружены клоны ТКР-V β , однако их количество не превышало трех (рис. 2В, табл. 4).

В популяции $CD8^+$ Т-клеток у больных наиболее часто встречались клоны — V β 1 ($n = 5$), V β 23 ($n = 5$), V β 16 ($n = 7$), V β 18 ($n = 7$), V β 7.2 ($n = 9$), V β 11 ($n = 10$), V β 17 ($n = 12$). Два V β -семейства (V β 5.1, 5.3) не превышали референсных значений ни у одного больного. При анализе $CD8^+$ Т-клеток у двоих больных НАА и ТАА не было выявлено обогащенных семейств V β . У больных СТАА выявлялись ТКР-V β -клоны, и их количество варьировало от 1 до 4 (рис. 2Г, табл. 4).

Обсуждение

Настоящее исследование посвящено изучению субпопуляционного состава Т-клеток и исследованию репертуара Т-клеточного рецептора у больных АА с помощью метода проточной цитофлуориметрии. Количества $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток достоверно не отличались у больных и доноров. При детальном исследовании субпопуляционного состава Т-клеток выявлено, что у больных АА наблюдался сдвиг в сторону терминальных эффекторных клеток. Субпопуляции Т-клеток памяти, обладающие эффекторной способностью, наряду с цитотоксическими клетками, могут быть источником продукции ИФН- γ при АА, который является негативным регулятором гемопоэза. Меньшая доля «наивных» $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток может свидетельствовать об истощении этих субпопуляций вследствие длительной антигенной

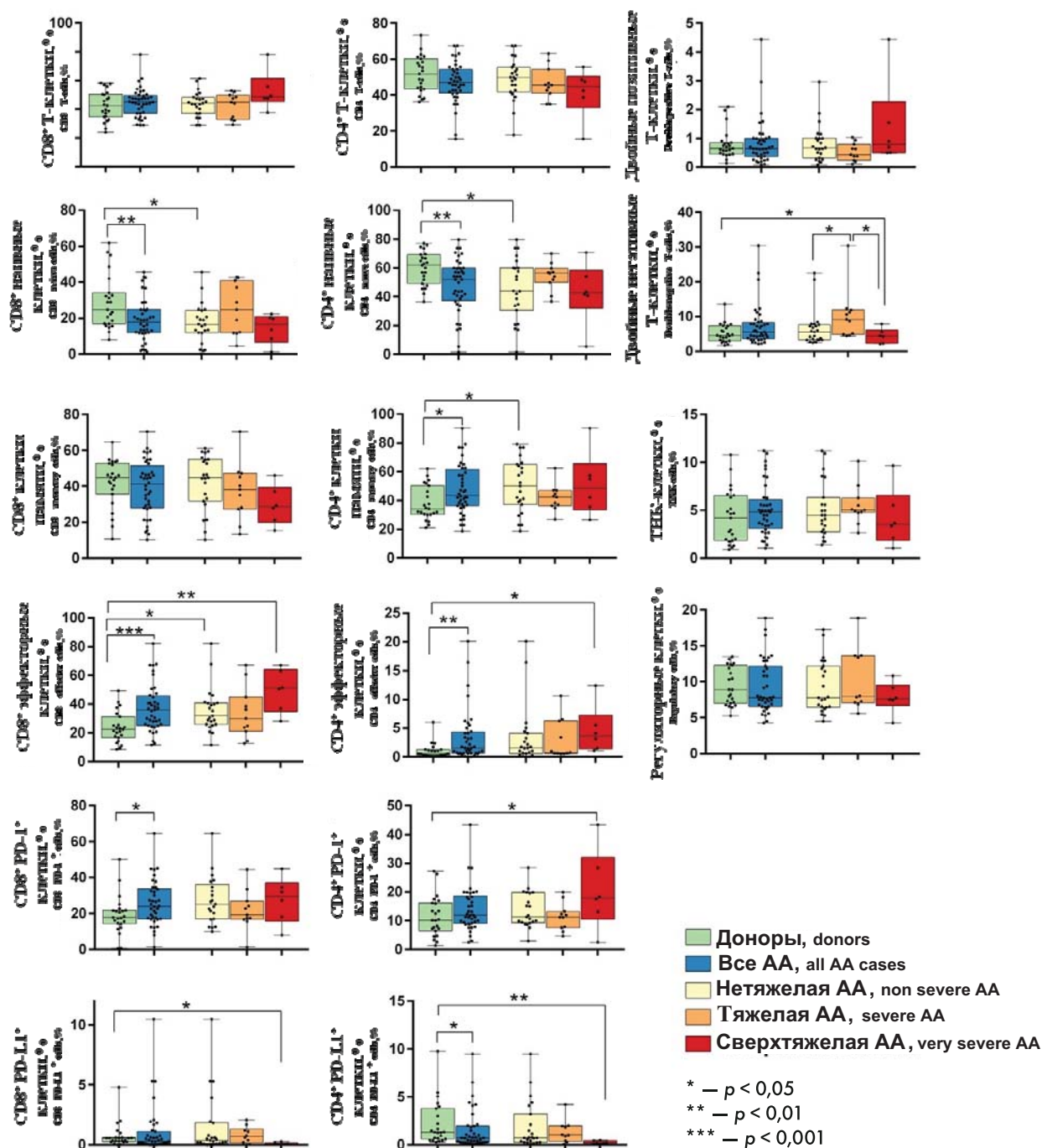


Рисунок 1. Субпопуляции Т-лимфоцитов у больных АА в сравнении с донорами и в зависимости от степени тяжести АА (Т-хелперы, цитотоксические клетки, наивные и Т-клетки «памяти», эффекторные Т-клетки, TNK-клетки, регуляторные Т-клетки, двойные позитивные и двойные негативные Т-клетки, доля PD-1- и PD-L1-позитивных клеток среди популяции Т-хелперов и цитотоксических Т-клеток)

Figure 1. T-lymphocyte subpopulations in AA patients compared to donors and relative to AA severity (T-helper cells, cytotoxic cells, naive and memory T-cells, effector T-cells, TNK cells, regulatory T-cells, double positive and double negative T-cells, portions of PD-1 and PD-L1 positive cells in T-helper cells and cytotoxic T-cell populations)

стимуляции. Кроме того, у больных АА выявлена большая доля PD-1⁺ Т-клеток, а, как известно, PD-1-путь вовлечен в процесс активации Т-лимфоцитов, которые оказывают регуляторное воздействие на все этапы кроветворения [28].

Наиболее значительные различия были получены при анализе результатов в зависимости от степени тяжести АА. У больных ТАА и НАА все исследуемые субпопуляции Т-лимфоцитов были сопоставимы. У больных СТАА изменения субпопуляционного

состава были наиболее выраженными. У этих больных была выявлена наименьшая доля двойных негативных Т-клеток (CD3⁺CD4⁺CD8⁻). Известно, что двойные негативные Т-клетки могут выступать в роли регуляторных клеток, предотвращая развитие аутоиммунных заболеваний [29]. Кроме того, у больных СТАА определялась наименьшая доля регуляторных Т-клеток, хотя эти отличия были недостоверными, что может быть связано с недостаточным числом больных. Считают, что Т-рег играют ключевую

Таблица 3. Относительное количество субпопуляций Т-клеток у больных АА и доноров КМ**Table 3.** Relative T-cell subpopulation counts in AA patients and bone marrow donors

Субпопуляция лимфоцитов Lymphocyte subpopulation	Доноры Donors	Все случаи АА All AA types	НАА Non severe AA	ТАА Severe AA	СТАА Very severe AA
Т-хелперы, % (от лимфоцитов) <i>T-helper cells, % of lymphocytes</i>	51,67 ± 2,1	47,03 ± 1,79	48,67 ± 2,41	46,66 ± 2,72	41,42 ± 5,67
Цитотоксические Т-клетки, % (от лимфоцитов) <i>Cytotoxic T-cells, % of lymphocytes</i>	42,36 ± 2,13	44,9 ± 1,55	43,97 ± 1,76	42,55 ± 2,64	52,73 ± 5,6
НКТ-клетки, % (от лимфоцитов) <i>NKT-cells, % of lymphocytes</i>	4,28 ± 0,58	5,04 ± 0,42	5,03 ± 0,6	5,5 ± 0,6	4,24 ± 1,25
CD3⁺CD4⁺CD8⁻ клетки, % (от лимфоцитов) <i>CD3⁺CD4⁺CD8⁻ cells, % of lymphocytes</i>	5,18 ± 0,57	7,24 ± 0,92	6,53 ± 1,07	10,27 ± 2,22**	4,42 ± 0,87
CD3⁺CD4⁺CD8⁺ клетки, % (от лимфоцитов) <i>CD3⁺CD4⁺CD8⁺ cells, % of lymphocytes</i>	0,79 ± 0,1	0,83 ± 0,13	0,83 ± 0,13	0,52 ± 0,09	1,43 ± 0,62
Эффекторные CD4⁺ клетки, % (от Т-хелперов) <i>Effector CD4⁺ cells, % of T-helper cells</i>	1,04 ± 0,27	3,39 ± 0,71*	3,3 ± 1,05	2,88 ± 1,04	4,66 ± 1,7
Наивные CD4⁺ клетки, % (от Т-хелперов) <i>Naive CD4⁺ cells, % of T-helper cells</i>	59,73 ± 2,41	47,56 ± 2,97*	45,65 ± 4,41	54,2 ± 2,87	42,72 ± 8,78
CD4⁺ клетки «памяти», % (от Т-хелперов) <i>Memory CD4⁺ cells, % of T-helper cells</i>	37,99 ± 2,46	47,99 ± 2,71*	50,1 ± 3,86	41,83 ± 2,74	51,18 ± 9,15
Эффекторные CD8⁺ клетки, % (от Т-цитотоксических клеток) <i>Effector CD8⁺ cells, % of cytotoxic T-cells</i>	23,78 ± 2,22	37,26 ± 2,61*	35,61 ± 3,22	33,98 ± 5,38	49,6 ± 6,09
Наивные CD8⁺ клетки, % (от Т-цитотоксических клеток) <i>Naive CD8⁺ cells, % of cytotoxic T-cells</i>	28,8 ± 3,13	18,77 ± 1,91*	16,91 ± 2,32	25,09 ± 4,28	14,31 ± 3,34
CD8⁺ клетки «памяти», % (от Т-цитотоксических клеток) <i>Memory CD8⁺ cells, % of cytotoxic T-cells</i>	41,92 ± 2,77	39,15 ± 2,41	42,5 ± 3,17	37,36 ± 4,79	29,61 ± 4,48
Регуляторные Т-клетки, % (от Т-хелперов) <i>Regulatory T-cells, % of T-helper cells</i>	9,36 ± 0,54	9,31 ± 0,59	9,28 ± 0,76	10,25 ± 1,37	7,84 ± 0,88
Активированные CD4⁺ клетки, % (от Т-хелперов) <i>Activated CD4⁺ cells, % of T-helper cells</i>	17,44 ± 2,63	20,93 ± 2,07	21,97 ± 3,09	20,12 ± 3,39	18,33 ± 3,63
CD4⁺PD-1⁺ клетки, % (от Т-хелперов) <i>CD4⁺PD-1⁺ cells, % of T-helper cells</i>	11,42 ± 1,45	14,03 ± 1,27*	13,59 ± 1,33	11,3 ± 1,42	20,54 ± 5,69
CD4⁺PD-L1⁺ клетки, % (от Т-хелперов) <i>CD4⁺PD-L1⁺ cells, % of T-helper cells</i>	2,22 ± 0,48	1,52 ± 0,33*	1,91 ± 0,51	1,38 ± 0,39	0,27 ± 0,06
CD8⁺PD-1⁺ клетки, % (от Т-цитотоксических клеток) <i>CD8⁺PD-1⁺ cells, of% cytotoxic T-cells</i>	19,05 ± 2,22	25,73 ± 2,03*	27,27 ± 2,9	21,83 ± 3,31	27,48 ± 5,29
CD8⁺PD-L1⁺ клетки, % (от Т-цитотоксических клеток) <i>CD8⁺PD-L1⁺ cells, of% cytotoxic T-cells</i>	0,76 ± 0,21	0,76 ± 0,21	1,46 ± 0,53	0,81 ± 0,22	0,1 ± 0,04

Примечание. * — достоверные различия между больными АА и здоровыми донорами ($p < 0,05$); ** — достоверные различия между больными АА в зависимости от степени тяжести заболевания ($p < 0,05$).

Note. * — significant differences in AA patients vs. healthy donors ($p < 0.05$); ** — significant differences between AA patients relative to the disease severity ($p < 0.05$).

роль в механизмах иммунной толерантности [30]. Основными функциями Т-рег является их выраженная способность подавлять активацию Т-эффекторов или клеток «памяти», а также регулировать аутореактивность Т-клеток [31]. Уменьшенное количество Т-рег не в состоянии подавить функцию активированных Т-клеток, которые повреждают кроветворные клетки в КМ. Также можно предположить, что даже при «нормальном» количестве Т-рег их функциональные свойства могут быть нарушены у больных АА. В работе S. Kordasti и соавт. [7] показано, что Т-рег, выделенные

у больных АА, крайне слабо подавляют секрецию ИФН- γ и фактора некроза опухоли- β , что является их функциональным дефектом.

Также обнаружено, что наибольшая доля PD-1-позитивных Т-клеток выявлялась у больных СТАА. В норме связывание PD-1 его лигандами PD-L1 и PD-L2 подавляет пролиферацию Т-клеток и продукцию цитокинов [14]. Аберрантная высокая экспрессия костимуляторных молекул, включая PD-1, возможно связана с постоянной активацией аутореактивных Т-клеток при АА. Повышенная экспрессия PD-1

Таблица 4. Количественное обогащение семейств $V\beta$ в общей группе больных АА, а также в зависимости от степени тяжести АА
Table 4. Quantitative enrichment of $V\beta$ families in all patients and AA severity groups

Т-хелперы ($CD4^+$ клетки) <i>T-helper cells ($CD4^+$ cells)</i>					Цитотоксические клетки ($CD8^+$ клетки) <i>Cytotoxic T-cells ($CD8^+$ cells)</i>			
количество обогащенных $V\beta$ -семейств, превышающих референсные значения <i>number of enriched $V\beta$ families exceeding reference values</i>	TAA SAA (n = 11)	HAA Non SAA (n = 22)	CTAA Very SAA (n = 6)	больные АА с обогащением $V\beta$ семейств <i>number of AA patients with $V\beta$ enrichment</i>	TAA SAA (n = 11)	HAA Non SAA (n = 22)	CTAA Very SAA (n = 6)	больные АА с обогащением $V\beta$ -семейств <i>number of AA patients with $V\beta$ enrichment</i>
0	–	3	–	3	1	1	–	2
1	4	5	2	11	1	7	1	9
2	2	5	1	8	4	7	2	13
3	4	6	3	13	5	4	2	11
4	1	2	–	3	–	2	1	3
5	–	–	–	–	–	1	–	1
6	–	1	–	1	–	–	–	–

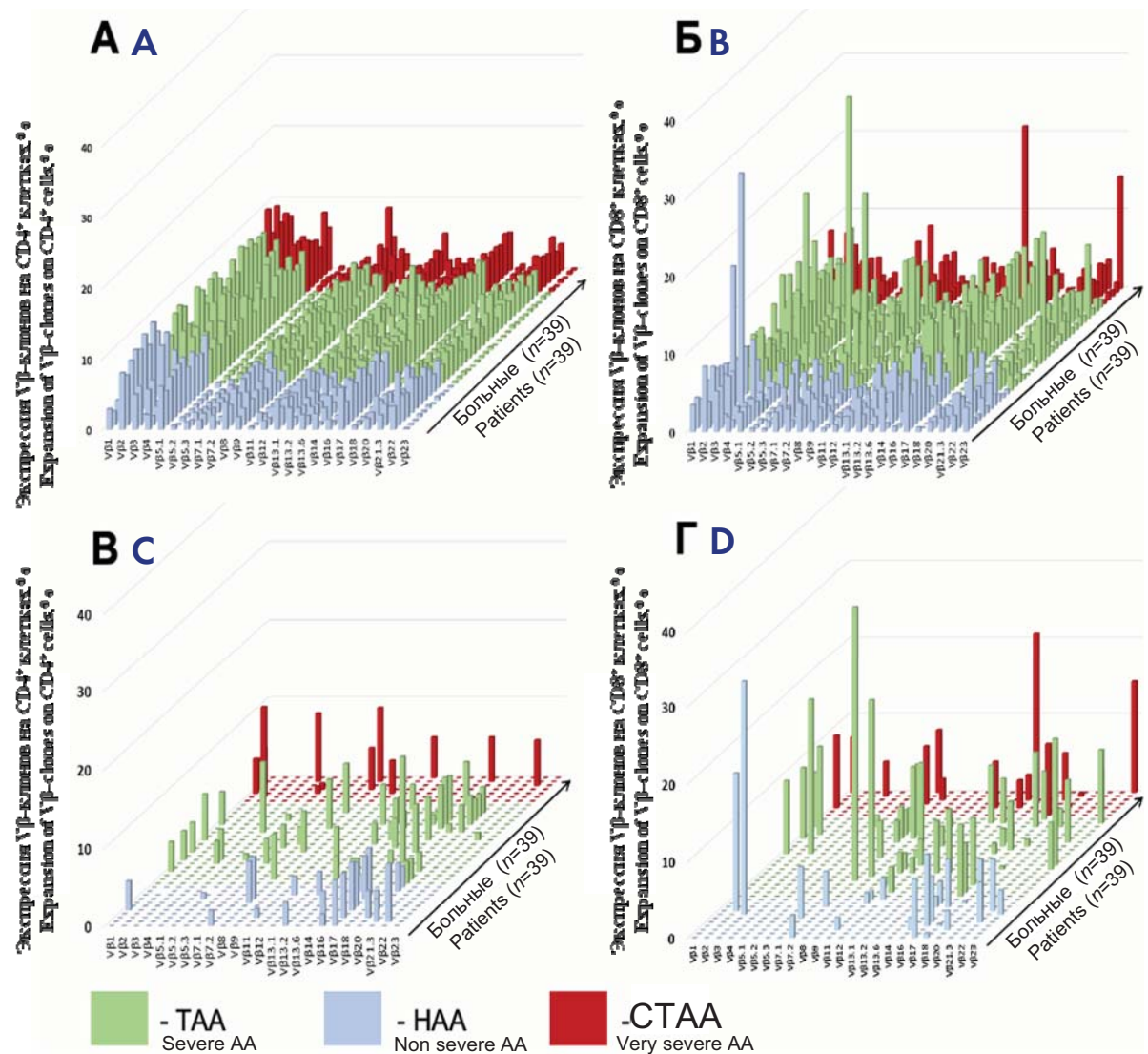


Рисунок 2. Распределения $V\beta$ -семейств в популяциях $CD3^+CD8^+$ и $CD3^+CD4^+$ клеток больных АА ($n = 39$). А — все $V\beta$ -семейства, экспрессируемые на $CD3^+CD4^+$ клетках больных АА. Б — все $V\beta$ -семейства, экспрессируемые на $CD3^+CD8^+$ клетках больных АА. В — доля $V\beta$ -семейств в популяции $CD3^+CD4^+$ клеток, превышающих референсные значения. Г — доля $V\beta$ -семейств в популяции $CD3^+CD8^+$ клеток, превышающих референсные значения

Figure 2. Distribution of $V\beta$ families in $CD3^+CD8^+$ and $CD3^+CD4^+$ populations in AA patients ($n = 39$). А — total $CD3^+CD4^+$ -expressed $V\beta$ families in AA patients. Б — total $CD3^+CD8^+$ -expressed $V\beta$ families in AA patients. В — portion of $CD3^+CD4^+$ - $V\beta$ families exceeding reference values. Д — portion of $CD3^+CD8^+$ - $V\beta$ families exceeding reference values

на Т-клетках, обнаруженная в настоящем исследовании, по-видимому, не способствует подавлению функции Т-клеток. Однако механизм, лежащий в основе дисфункции PD-1, остается до сих пор неясным. Доля PD-1-позитивных Т-клеток может ассоциироваться со степенью тяжести АА. Таким образом, у больных СТАА определялся дефицит общего числа Т-хелперов и преобладание цитотоксических Т-клеток, значительное уменьшение количества регуляторных клеток, что согласуется с ранее опубликованными исследованиями [32–34].

Олигоклональная экспансия Т-клеток является ключевым событием в патогенезе АА. В многочисленных исследованиях показано обогащение V β -семейств в популяциях CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток. При этом изменения клонов V β в популяции Т-хелперов были значительно меньше, чем в популяции цитотоксических клеток [35–37]. Аналогичный результат получен в настоящем исследовании. При анализе репертуара ТКР-V β методом проточной цитофлуориметрии было обнаружено, что характер распределения семейств V β в Т-хелперах поликлонален (рис. 2А). Несмотря на поликлональную картину, у 92,3 % больных АА среди CD4⁺ клеток выявлялось, как минимум, одно семейство V β , размер которого не превышал референсный интервал более чем на 10 % (рис. 2В), что не является значительным отклонением от референсных значений доноров.

В отличие от Т-хелперов в популяции цитотоксических Т-клеток размер выявляемых клонов ТКР-V β был более выраженным с максимальным значением обогащенного семейства у одного больного до 35 % (рис. 2Б). У 2 больных (5 %) не было выявлено увеличения V β -семейств в популяции цитотоксических клеток. Количество клонов у каждого больного варьировало от 1 до 6, но с большей частотой определялось 1, 2 или 3 клон. Наиболее часто встречалось обогащение семейств V β 11, V β 17, V β 20, причем количество V β 17 было увеличено как среди Т-хелперов, так и среди цитотоксических клеток.

Определение репертуара ТКР-V β с помощью метода проточной цитофлуориметрии доступнее, быстрее и имеет меньшую стоимость по сравнению с секвенированием нового поколения и может быть выполнено с использованием коммерческого набора. Однако, используя данную методику, можно выявить только расширение определенного V β -семейства, что не эквивалентно понятию «клон», принятому в молекулярной биологии. Выявленные с помощью проточной цитофлуориметрии обогащенные V β -семейства у больных с АА могут быть использованы для оценки ответа на ИСТ и активности заболевания.

Таким образом, в настоящем исследовании проведен анализ значительного количества характери-

стик Т-лимфоцитов у большой группы больных АА. Были выявлены наиболее характерные особенности Т-клеточных субпопуляций у всех больных АА: увеличение количества цитотоксических Т-клеток, эффекторных CD4⁺ и CD8⁺ клеток, CD4⁺ клеток «памяти», что может подтверждать наличие длительной антигенной стимуляции с последующей активацией этих субпопуляций клеток, в результате которой происходит гиперэкспрессия провоспалительных цитокинов. Уменьшение «наивных» CD4⁺ и CD8⁺ клеток, регуляторных Т-клеток, двойных негативных Т-клеток (CD3⁺CD4⁺CD8⁺) доказывает снижение контроля за цитокинпродуцирующими Т-клетками.

Была установлена связь между степенью тяжести АА и количеством эффекторных Т-клеток, Т-регуляторных клеток, двойных негативных Т-клеток и PD-1-позитивных Т-клеток: самое большое количество потенциально цитокинпродуцирующих Т-клеток и минимальное количество клеток, участвующих в регуляции Т-клеточной активности, было выявлено у больных СТАА.

Сравнительный анализ проведен с использованием образцов КМ. В большинстве исследований анализ клеточных популяций у больных АА проводится на образцах периферической крови, однако в данной работе исследование КМ позволило получить более детальную информацию об изменениях Т-клеточных субпопуляций [7, 38, 39]. При анализе репертуара ТКР-V β была обнаружена олигоклональная экспансия преимущественно в субпопуляции цитотоксических Т-клеток. Можно предположить, что обогащение семейств V β свидетельствует о наличии аутореактивного Т-клеточного клона и подтверждает иммунный патогенез АА.

Требуется дальнейшее изучение многочисленных клеточных субпопуляций, участвующих в аномальном иммунном ответе при АА, так как ни аутоантигены, ни причины развития аутореактивности при АА не установлены. Подробное исследование субпопуляционного состава Т-клеток при этом заболевании необходимо для лучшего понимания патофизиологии АА, а также для поиска оптимальных программ лечения. Динамическое исследование ТКР-V β -репертуара может быть предложено в качестве мониторинга течения заболевания, учитывая, что доминантные клоны, выявляемые в дебюте болезни, могут вновь определяться перед рецидивом, являясь предвестником возврата болезни [23, 35]. Метод проточной цитофлуориметрии помогает выявлять значимые биомаркеры для мониторинга клонов Т-клеток при АА с целью наиболее точной оценки активности патологического процесса при АА, но для этого необходимы большая когорта больных и исследования на разных этапах терапии АА.

Литература

1. Михайлова Е.А., Фидарова З.Т., Устинова Е.Н. и др. Комбинированная иммуносупрессивная терапия больных апластической анемией: эффективность повторных курсов антилимфоцитарного глобулина. Гематология и трансфузиология. 2014; 50(7): 11–8.
2. Kulagin A., Lisukov I., Ivanova M. et al. Prognostic value of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria clone presence in aplastic anaemia patients treated with combined immunosuppression: Results of two-centre prospective study. Br J Haematol. 2014; 164(4): 546–54. DOI: 10.1111/bjh.12661.
3. Young N.S., Calado R.T., Scheinberg P. Current concepts in the pathophysiology and treatment of aplastic anemia. Blood. 2006; 108(8): 2509–19. DOI: 10.1182/blood-2006-03-010777.
4. Chen J., Ellison F.M., Eckhaus M.A. et al. Minor antigen H60-mediated aplastic anemia is ameliorated by immunosuppression and the infusion of regulatory T-cells. J Immunol. 2007; 178(7): 4159–68. DOI: 10.4049/jimmunol.178.7.4159.
5. Risitano A.M., Maciejewski J.P., Green S. et al. In vivo dominant immune responses in aplastic anaemia: Molecular tracking of putatively pathogenetic T-cell clones by TCR β -CDR3 sequencing. Lancet. 2004; 364(9431): 355–64. DOI: 10.1016/S0140-6736(04)16724-X.
6. Zeng W., Kajigaya S., Chen G. et al. Transcript profile of CD4⁺ and CD8⁺ T-cells from the bone marrow of acquired aplastic anemia patients. Exp Hematol. 2004; 32(9): 806–14. DOI: 10.1016/j.exphem.2004.06.004.
7. Kordasti S., Marsh J., Al-Khan S. et al. Functional characterization of CD4⁺ T-cells in aplastic anemia. Blood. 2012; 119(9): 2033–43. DOI: 10.1182/blood-2011-08-368308.
8. Tau G., Rothman P. Biologic functions of the IFN-gamma receptors. Allergy. 1999; 54(12): 1233–51. DOI: 10.1034/j.1398-9995.1999.00099.x.
9. Solomou E.E., Rezvani K., Mielke S. et al. Deficient CD4⁺CD25⁺ FOXP3⁺ T-regulatory cells in acquired aplastic anemia. Blood. 2007; 110(5): 1603–6. DOI: 10.1182/blood-2007-01-066258.
10. Shi J., Ge M., Lu S. et al. Intrinsic impairment of CD4⁺CD25⁺ regulatory T-cells in acquired aplastic anemia. Blood. 2012; 120(8): 1624–32. DOI: 10.1182/blood-2011-11-390708.
11. Zoumbos N.C., Ferris W.O., Hsu S.-M. et al. Analysis of lymphocyte subsets in patients with aplastic anaemia. Br J Haematol. 1984; 58(1): 95–105. DOI: 10.1111/j.1365-2141.1984.tb06063.x.
12. Ishida Y., Agata Y., Shibahara K. et al. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. EMBO J. 1992; 11(11): 3887–95. DOI: 10.1002/j.1460-2075.1992.tb05481.x.
13. Keir M.E., Liang S.C., Guleria I. et al. Tissue expression of PD-L1 mediates peripheral T-cell tolerance. J Exp Med. 2006; 203(4): 883–95. DOI: 10.1084/jem.20051776.
14. Fife B.T., Pauken K.E. The role of the PD-1 pathway in autoimmunity and peripheral tolerance. Ann N Y Acad Sci. 2011; 1217(1): 45–59. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2010.05919.x.
15. Zhao W., Zhang Y., Zhang P. et al. High programmed death 1 expression on T-cells in aplastic anemia. Immunol Lett. 2017; 183: 44–51. DOI: 10.1016/j.imlet.2017.01.016.
16. Wu H., Miao M., Zhang G. et al. Soluble PD-1 is associated with aberrant regulation of T-cells activation in aplastic anemia. Immunol Invest. 2009; 38(5): 408–21. DOI: 10.1080/08820130902912332.
17. Choo S.Y. The HLA system: genetics, immunology, clinical testing, and clinical implications. Yonsei Med J. 2007; 48(1): 11–23. DOI: 10.3349/ymj.2007.48.1.11.
18. Rudolph M.G., Stanfield R.L., Wilson I.A. How TCRs bind MHCs, peptides, and coreceptors. Annu Rev Immunol. 2006; 24(1): 419–66. DOI: 10.1146/annurev.immunol.23.021704.115658.

References

1. Mikhailova E.A., Fidarova Z.T., Ustinova E.N. et al. Combined immunosuppressive therapy for aplastic anaemia: efficacy of antithymocyte globulin repeated courses. Gematologiya i transfuziologiya. 2014; 50(7): 11–8 (In Russian).
2. Kulagin A., Lisukov I., Ivanova M. et al. Prognostic value of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria clone presence in aplastic anaemia patients treated with combined immunosuppression: Results of two-centre prospective study. Br J Haematol. 2014; 164(4): 546–54. DOI: 10.1111/bjh.12661.
3. Young N.S., Calado R.T., Scheinberg P. Current concepts in the pathophysiology and treatment of aplastic anemia. Blood. 2006; 108(8): 2509–19. DOI: 10.1182/blood-2006-03-010777.
4. Chen J., Ellison F.M., Eckhaus M.A. et al. Minor antigen H60-mediated aplastic anemia is ameliorated by immunosuppression and the infusion of regulatory T-cells. J Immunol. 2007; 178(7): 4159–68. DOI: 10.4049/jimmunol.178.7.4159.
5. Risitano A.M., Maciejewski J.P., Green S. et al. In-vivo dominant immune responses in aplastic anaemia: Molecular tracking of putatively pathogenetic T-cell clones by TCR β -CDR3 sequencing. Lancet. 2004; 364(9431): 355–64. DOI: 10.1016/S0140-6736(04)16724-X.
6. Zeng W., Kajigaya S., Chen G. et al. Transcript profile of CD4⁺ and CD8⁺ T-cells from the bone marrow of acquired aplastic anemia patients. Exp Hematol. 2004; 32(9): 806–14. DOI: 10.1016/j.exphem.2004.06.004.
7. Kordasti S., Marsh J., Al-Khan S. et al. Functional characterization of CD4⁺ T-cells in aplastic anemia. Blood. 2012; 119(9): 2033–43. DOI: 10.1182/blood-2011-08-368308.
8. Tau G., Rothman P. Biologic functions of the IFN-gamma receptors. Allergy. 1999; 54(12): 1233–51. DOI: 10.1034/j.1398-9995.1999.00099.x.
9. Solomou E.E., Rezvani K., Mielke S. et al. Deficient CD4⁺CD25⁺ FOXP3⁺ T-regulatory cells in acquired aplastic anemia. Blood. 2007; 110(5): 1603–6. DOI: 10.1182/blood-2007-01-066258.
10. Shi J., Ge M., Lu S. et al. Intrinsic impairment of CD4⁺CD25⁺ regulatory T-cells in acquired aplastic anemia. Blood. 2012; 120(8): 1624–32. DOI: 10.1182/blood-2011-11-390708.
11. Zoumbos N.C., Ferris W.O., Hsu S.-M. et al. Analysis of lymphocyte subsets in patients with aplastic anaemia. Br J Haematol. 1984; 58(1): 95–105. DOI: 10.1111/j.1365-2141.1984.tb06063.x.
12. Ishida Y., Agata Y., Shibahara K. et al. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. EMBO J. 1992; 11(11): 3887–95. DOI: 10.1002/j.1460-2075.1992.tb05481.x.
13. Keir M.E., Liang S.C., Guleria I. et al. Tissue expression of PD-L1 mediates peripheral T-cell tolerance. J Exp Med. 2006; 203(4): 883–95. DOI: 10.1084/jem.20051776.
14. Fife B.T., Pauken K.E. The role of the PD-1 pathway in autoimmunity and peripheral tolerance. Ann N Y Acad Sci. 2011; 1217(1): 45–59. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2010.05919.x.
15. Zhao W., Zhang Y., Zhang P. et al. High programmed death 1 expression on T-cells in aplastic anemia. Immunol Lett. 2017; 183: 44–51. DOI: 10.1016/j.imlet.2017.01.016.
16. Wu H., Miao M., Zhang G. et al. Soluble PD-1 is associated with aberrant regulation of T-cells activation in aplastic anemia. Immunol Invest. 2009; 38(5): 408–21. DOI: 10.1080/08820130902912332.
17. Choo S.Y. The HLA system: genetics, immunology, clinical testing, and clinical implications. Yonsei Med J. 2007; 48(1): 11–23. DOI: 10.3349/ymj.2007.48.1.11.
18. Rudolph M.G., Stanfield R.L., Wilson I.A. How TCRs bind MHCs, peptides, and coreceptors. Annu Rev Immunol. 2006; 24(1): 419–66. DOI: 10.1146/annurev.immunol.23.021704.115658.

19. Attygalle A., Al-Jehani R., Diss T.C. et al. Neoplastic T-cells in angioimmunoblastic T-cell lymphoma express CD10. *Blood*. 2002; 99(2): 627–33. DOI: 10.1182/blood.V99.2.627.
20. Cui J.H., Lin K.R., Yuan S.H. et al. TCR repertoire as a novel indicator for immune monitoring and prognosis assessment of patients with cervical cancer. *Front Immunol*. 2018; 9: 2729. DOI: 10.3389/fimmu.2018.02729.
21. Lundell R., Hartung L., Hill S. et al. T-cell large granular lymphocyte leukemias have multiple phenotypic abnormalities involving pan-T-cell antigens and receptors for MHC molecules. *Am J Clin Pathol*. 2005; 124(6): 937–46. DOI: 10.1309/PH7X78HF4FW4PRKW.
22. Kook H., Risitano A.M., Zeng W. et al. Changes in T-cell receptor VB repertoire in aplastic anemia: Effects of different immunosuppressive regimens. *Blood*. 2002; 99(10): 3668–75. DOI: 10.1182/blood.V99.10.3668.
23. Risitano A.M., Kook H., Zeng W. et al. Oligoclonal and polyclonal CD4 and CD8 lymphocytes in aplastic anemia and paroxysmal nocturnal hemoglobinuria measured by V β CDR3 spectratyping and flow cytometry. *Blood*. 2002; 100(1): 178–83. DOI: 10.1182/blood-2002-01-0236.
24. Rowen L., Koop B.F., Hood L. The complete 685-kilobase DNA sequence of the human β T-cell receptor locus. *Science*. 1996; 272(5269): 1755–62. DOI: 10.1126/science.272.5269.1755.
25. Tembhare P., Yuan C.M., Morris J.C. et al. Flow cytometric immunophenotypic assessment of T-cell clonality by V β repertoire analysis in fine-needle aspirates and cerebrospinal fluid. *Am J Clin Pathol*. 2012;137(2): 220–6. DOI: 10.1309/AJCPPT93VZMAREHK.
26. Cossarizza A., Chang H.D., Radbruch A. et al. Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies (second edition). *Eur J Immunol*. 2019; 49(10): 1457–973. DOI: 10.1002/eji.201970107.
27. Tembhare P., Yuan C.M., Xi L. et al. Flow cytometric immunophenotypic assessment of T-cell clonality by V β repertoire analysis: Detection of T-cell clonality at diagnosis and monitoring of minimal residual disease following therapy. *Am J Clin Pathol*. 2011; 135(6): 890–900. DOI: 10.1309/AJCPV2D1DDSGJDBW.
28. Cheng X., Veverka V., Radhakrishnan A. et al. Structure and interactions of the human programmed cell death 1 receptor. *J Biol Chem*. 2013; 288(17): 11771–85. DOI: 10.1074/jbc.M112.448126.
29. Juvet S.C., Zhang L. Double negative regulatory T-cells in transplantation and autoimmunity: Recent progress and future directions. *J Mol Cell Biol*. 2012; 4(1): 48–58. DOI: 10.1093/jmcb/mjr043.
30. Hall B.M. T-cells: Soldiers and spies — the surveillance and control of effector T-cells by regulatory T-cells. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2015; 10(11): 2050–64. DOI: 10.2215/CJN.06620714.
31. Okada R., Kondo T., Matsuki F. et al. Phenotypic classification of human CD4⁺ T-cell subsets and their differentiation. *Int Immunol*. 2008; 20(9): 1189–99. DOI: 10.1093/intimm/dxn075.
32. Young N.S., Scheinberg P., Calado R.T. Aplastic anemia. *Curr Opin Hematol*. 2008; 15(3): 162–8. DOI: 10.1097/MOH.0b013e3282fa7470.
33. Qi W., Ren Y., Fu R. et al. Detection and significance of CD4⁺CD25⁺CD127^{dim} regulatory T-cells in individuals with severe aplastic anemia. *Turkish J Hematol*. 2015; 32(3): 220–7. DOI: 10.4274/tjh.2013.0410.
34. Yan L., Fu R., Liu H. et al. Abnormal quantity and function of regulatory T-cells in peripheral blood of patients with severe aplastic anemia. *Cell Immunol*. 2015; 296(2): 95–105. DOI: 10.1016/j.cellimm.2015.04.001.
35. Giudice V., Feng X., Lin Z. et al. Deep sequencing and flow cytometric characterization of expanded effector memory CD8⁺CD57⁺ T-cells frequently reveals T-cell receptor V β oligoclonality and CDR3 homology in acquired aplastic anemia. *Haematologica*. 2018; 103(5): 759–69. DOI: 10.3324/haematol.2017.176701.
19. Attygalle A., Al-Jehani R., Diss T.C. et al. Neoplastic T-cells in angioimmunoblastic T-cell lymphoma express CD10. *Blood*. 2002; 99(2): 627–33. DOI: 10.1182/blood.V99.2.627.
20. Cui J.H., Lin K.R., Yuan S.H. et al. TCR repertoire as a novel indicator for immune monitoring and prognosis assessment of patients with cervical cancer. *Front Immunol*. 2018; 9: 2729. DOI: 10.3389/fimmu.2018.02729.
21. Lundell R., Hartung L., Hill S. et al. T-cell large granular lymphocyte leukemias have multiple phenotypic abnormalities involving pan-T-cell antigens and receptors for MHC molecules. *Am J Clin Pathol*. 2005; 124(6): 937–46. DOI: 10.1309/PH7X78HF4FW4PRKW.
22. Kook H., Risitano A.M., Zeng W. et al. Changes in T-cell receptor VB repertoire in aplastic anemia: Effects of different immunosuppressive regimens. *Blood*. 2002; 99(10): 3668–75. DOI: 10.1182/blood.V99.10.3668.
23. Risitano A.M., Kook H., Zeng W. et al. Oligoclonal and polyclonal CD4 and CD8 lymphocytes in aplastic anemia and paroxysmal nocturnal hemoglobinuria measured by V β CDR3 spectratyping and flow cytometry. *Blood*. 2002; 100(1): 178–83. DOI: 10.1182/blood-2002-01-0236.
24. Rowen L., Koop B.F., Hood L. The complete 685-kilobase DNA sequence of the human β T-cell receptor locus. *Science*. 1996; 272(5269): 1755–62. DOI: 10.1126/science.272.5269.1755.
25. Tembhare P., Yuan C.M., Morris J.C. et al. Flow cytometric immunophenotypic assessment of T-cell clonality by V β repertoire analysis in fine-needle aspirates and cerebrospinal fluid. *Am J Clin Pathol*. 2012;137(2): 220–6. DOI: 10.1309/AJCPPT93VZMAREHK.
26. Cossarizza A., Chang H.D., Radbruch A. et al. Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies (second edition). *Eur J Immunol*. 2019; 49(10): 1457–973. DOI: 10.1002/eji.201970107.
27. Tembhare P., Yuan C.M., Xi L. et al. Flow cytometric immunophenotypic assessment of T-cell clonality by V β repertoire analysis: Detection of T-cell clonality at diagnosis and monitoring of minimal residual disease following therapy. *Am J Clin Pathol*. 2011; 135(6): 890–900. DOI: 10.1309/AJCPV2D1DDSGJDBW.
28. Cheng X., Veverka V., Radhakrishnan A. et al. Structure and interactions of the human programmed cell death 1 receptor. *J Biol Chem*. 2013; 288(17): 11771–85. DOI: 10.1074/jbc.M112.448126.
29. Juvet S.C., Zhang L. Double negative regulatory T-cells in transplantation and autoimmunity: Recent progress and future directions. *J Mol Cell Biol*. 2012; 4(1): 48–58. DOI: 10.1093/jmcb/mjr043.
30. Hall B.M. T-cells: Soldiers and spies — the surveillance and control of effector T-cells by regulatory T-cells. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2015; 10(11): 2050–64. DOI: 10.2215/CJN.06620714.
31. Okada R., Kondo T., Matsuki F. et al. Phenotypic classification of human CD4⁺ T-cell subsets and their differentiation. *Int Immunol*. 2008; 20(9): 1189–99. DOI: 10.1093/intimm/dxn075.
32. Young N.S., Scheinberg P., Calado R.T. Aplastic anemia. *Curr Opin Hematol*. 2008; 15(3): 162–8. DOI: 10.1097/MOH.0b013e3282fa7470.
33. Qi W., Ren Y., Fu R. et al. Detection and significance of CD4⁺CD25⁺CD127^{dim} regulatory T-cells in individuals with severe aplastic anemia. *Turkish J Hematol*. 2015; 32(3): 220–7. DOI: 10.4274/tjh.2013.0410.
34. Yan L., Fu R., Liu H. et al. Abnormal quantity and function of regulatory T-cells in peripheral blood of patients with severe aplastic anemia. *Cell Immunol*. 2015; 296(2): 95–105. DOI: 10.1016/j.cellimm.2015.04.001.
35. Giudice V., Feng X., Lin Z. et al. Deep sequencing and flow cytometric characterization of expanded effector memory CD8⁺CD57⁺ T-cells frequently reveals T-cell receptor V β oligoclonality and CDR3 homology in acquired aplastic anemia. *Haematologica*. 2018; 103(5): 759–69. DOI: 10.3324/haematol.2017.176701.

36. Guan J., Sun Y., Fu R. et al. A cohort study of immune and hematopoietic functionality changes in severe aplastic anemia patients treated with immunosuppressive therapy. *Medicine*. 2019; 98(3): e14149. DOI: 10.1097/MD.00000000000014149.
37. Maciejewski J.P., Risitano A., Kook H. et al. Immune pathophysiology of aplastic anemia. *Int J Hematol*. 2002; 76 Suppl 1: 207–14. DOI: 10.1007/BF03165246.
38. Appay V., Van Lier R.A.W., Sallusto F. et al. Phenotype and function of human T lymphocyte subsets: Consensus and issues. *Cytom Part A*. 2008; 73(11): 975–83. DOI: 10.1002/cyto.a.20643.
39. Zhang H.F., Huang Z.D., Wu X.R. et al. Comparison of T lymphocyte subsets in aplastic anemia and hypoplastic myelodysplastic syndromes. *Life Sci*. 2017; 189: 71–5. DOI: 10.1016/j.lfs.2017.09.020.

Информация об авторах

Абрамова Анастасия Владимировна*, врач отделения высокодозной интенсивной химиотерапии гемобластозов и депрессий кроветворения с круглосуточным стационаром, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации,
e-mail: anastasia.abramova@list.ru
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8113-6115>

Гальцева Ирина Владимировна, кандидат медицинских наук, заведующая лабораторией иммунофенотипирования клеток крови и костного мозга, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации,
e-mail: galtseva.i@blood.ru
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8490-6066>

Михайлова Елена Алексеевна, доктор медицинских наук, профессор, ведущий научный сотрудник отделения высокодозной интенсивной химиотерапии гемобластозов и депрессий кроветворения с круглосуточным стационаром, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации,
e-mail: mikhailova.e@blood.ru
ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-2449-2682>

Капранов Николай Михайлович, медицинский физик лаборатории иммунофенотипирования клеток крови и костного мозга, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации,
e-mail: kapranov.n@blood.ru
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6512-910X>

Давыдова Юлия Олеговна, врач клинической лабораторной диагностики лаборатории иммунофенотипирования клеток крови и костного мозга, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации,
e-mail: juliya89mur@yandex.ru
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5932-0285>

36. Guan J., Sun Y., Fu R. et al. A cohort study of immune and hematopoietic functionality changes in severe aplastic anemia patients treated with immunosuppressive therapy. *Medicine*. 2019; 98(3): e14149. DOI: 10.1097/MD.00000000000014149.
37. Maciejewski J.P., Risitano A., Kook H. et al. Immune pathophysiology of aplastic anemia. *Int J Hematol*. 2002; 76 Suppl 1: 207–14. DOI: 10.1007/BF03165246.
38. Appay V., Van Lier R.A.W., Sallusto F. et al. Phenotype and function of human T lymphocyte subsets: Consensus and issues. *Cytom Part A*. 2008; 73(11): 975–83. DOI: 10.1002/cyto.a.20643.
39. Zhang H.F., Huang Z.D., Wu X.R. et al. Comparison of T lymphocyte subsets in aplastic anemia and hypoplastic myelodysplastic syndromes. *Life Sci*. 2017; 189: 71–5. DOI: 10.1016/j.lfs.2017.09.020.

Information about the authors

Anastasia V. Abramova*, Physician, Department of High-Dose Intensive Chemotherapy of Hemoblastosis and Bone Marrow Depression, National Research Center for Hematology,
e-mail: anastasia.abramova@list.ru
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8113-6115>

Irina V. Galtseva, Cand. Sci. (Med.), Head of the Laboratory of Blood and Bone Marrow Cell Immunophenotyping, National Research Center for Hematology,
e-mail: irinagaltseva@gmail.com
ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-8490-6066>

Elena A. Mikhailova, Dr. Sci. (Med.), Professor, Leading Researcher, Department of High-Dose Intensive Chemotherapy of Hemoblastosis and Bone Marrow Depression, National Research Center for Hematology,
e-mail: mikhailova.e@blood.ru
ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-2449-2682>

Nikolay M. Kapranov, Medical Physicist, Laboratory of Blood and Bone Marrow Cell Immunophenotyping, National Research Center for Hematology,
e-mail: kapranov.n@blood.ru
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6512-910X>

Yulia O. Davydova, Physician (clinical diagnostics), Laboratory of Blood and Bone Marrow Cell Immunophenotyping, National Research Center for Hematology,
e-mail: davydova.y@blood.ru
ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-5932-0285>

Фидарова Залина Таймуразовна, кандидат медицинских наук, заведующая отделением химиотерапии гемобластозов и депрессий кроветворения с дневным стационаром, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации,
e-mail: zalinafidarova@mail.ru
ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-0934-6094>

Троицкая Вера Витальевна, кандидат медицинских наук, заведующая отделением интенсивной высокодозной химиотерапии гемобластозов и депрессий кроветворения с круглосуточным стационаром; заместитель генерального директора по лечебной работе ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации,
e-mail: verat@blood.ru
ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-4827-8947>

Паровичникова Елена Николаевна, доктор медицинских наук, руководитель отдела химиотерапии гемобластозов, депрессий кроветворения и трансплантации костного мозга, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации,
e-mail: elenap@blood.ru
ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-6177-3566>

Савченко Валерий Григорьевич, доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, генеральный директор ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации,
e-mail: svg@blood.ru
ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-8188-5557>

*** Автор, ответственный за переписку**

Поступила: 15.07.2020

Принята в печать: 27.10.2020

Zalina T. Fidarova, Cand. Sci. (Med.), Head of the Department of High-Dose Intensive Chemotherapy of Hemoblastosis and Bone Marrow Depression, National Research Center for Hematology,
e-mail: zalinafidarova@mail.ru
ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-0934-6094>

Vera V. Troitskaya, Cand. Sci. (Med.), Head of the Department of Intensive High-dose Chemotherapy of Hemoblastosis and Bone Marrow Depression with All-Day Hospital; Deputy Director for Medical Affairs, National Research Center for Hematology,
e-mail: verat@blood.ru
ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-4827-8947>

Elena N. Parovichnikova, Dr. Sci. (Med.), Head of the Department of Chemotherapy of Hemoblastosis, Hematopoiesis Depression and Bone Marrow Transplantation, National Research Center for Hematology,
e-mail: parovichnikova.e@blood.ru
ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-6177-3566>

Valery G. Savchenko, Dr. Sci. (Med.), Full Member of the Russian Academy of Sciences, Professor, Director, National Research Center for Hematology,
e-mail: svg@blood.ru
ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-8188-5557>

*** Corresponding author**

Received 15 July 2020

Accepted 27 Oct 2020