

## ТРАНСПЛАНТАЦИЯ КОСТНОГО МОЗГА

## BONE MARROW TRANSPLANTATION

### Субпопуляционный состав Т-хелперов у больных острыми лейкозами после трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток

*Ю.О. Давыдова, Н.М. Капранов, К.А. Никифорова, О.С. Караваева, Д.В. Камельских, М.Ю. Дроков, Л.А. Кузьмина, Т.В. Гапонова, И.В. Гальцева, Е.Н. Паровичникова*

ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, Новый Зыковский пр-д, д. 4, Москва, Российская Федерация, 125167

### T-Helper Subpopulations in Acute Leukemia Patients After Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation

*YuO Davydova, NM Kapranov, KA Nikiforova, OS Karavaeva, DV Kamelskikh, MYu Drovkov, LA Kuzmina, TV Gaponova, IV Galtseva, EN Parovichnikova*

National Research Center for Hematology, 4 Novyi Zykovskii pr-d, Moscow, Russian Federation, 125167

#### РЕФЕРАТ

**Цель.** Выявить особенности субпопуляционного состава Т-хелперов у здоровых доноров и сравнить полученные данные с таковыми у пациентов с острыми лейкозами через 6 мес. после трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток (аллоТГСК).

**Материалы и методы.** В исследование включены 41 донор крови и 49 пациентов после проведения аллоТГСК. Медиана возраста доноров составила 36 лет (диапазон 20–60 лет), мужчин было 29, женщин — 12. Медиана возраста пациентов составила 37 лет (диапазон 19–62 года), мужчин было 18, женщин — 31. Острый миелоидный лейкоз диагностирован у 27 (55 %) пациентов, острый лимфобластный лейкоз/лимфома — у 22 (45 %). Миелоаблативное кондиционирование проведено у 4 (8 %) пациентов, кондиционирование со сниженной интенсивностью — у 45 (92 %). Субпопуляционный состав Т-хелперов изучен в крови у здоровых доноров и пациентов с острыми лейкозами после аллоТГСК. С помощью проточной цитометрии одновременно оценивали экспрессию маркеров CD3, CD4, CD8, CD25, CD45RA, CD197, CD28, CCR4, CCR6, CCR10, CXCR3, CXCR5 на Т-клетках.

**Результаты.** Показано, что число Т-хелперов, находящихся на разных стадиях дифференцировки (регуляторных, наивных Т-клеток, клеток памяти, эффекторных клеток), комплексно отличается здоровых доноров от пациентов. Кроме того, функциональный состав каждой из этих популяций отличается доноров от пациентов даже на +6-м месяце после аллоТГСК. Среди Т-хелперов центральной памяти число поляризованных клеток было выше у доноров. У пациентов оказалась выше доля Т-хелперов 1-го типа среди эффекторных клеток.

**Заключение.** Полученные результаты указывают на то, что анализ Т-клеток в комплексе параметров может быть применен для оценки иммунитета и описания его нарушений при различных патологических состояниях или после противоопухолевого лекарственного воздействия.

#### ABSTRACT

**Aim.** To identify the characteristics of T-helper subpopulations in healthy donors and to compare them with those reported in acute leukemia patients 6 months after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT).

**Materials & Methods.** The study enrolled 41 blood donors and 49 patients after-HSCT. The median age of donors was 36 years (range 20–60 years), 29 of them were men and 12 were women. The median age of patients was 37 years (range 19–62 years), 18 of them were men and 31 were women. Acute myeloid leukemia was diagnosed in 27 (55 %) patients and acute lymphoblastic leukemia/lymphoma in 22 (45 %) patients. Myeloablative conditioning was administered to 4 (8 %) patients and reduced intensity conditioning to 45 (92 %) patients. T-helper subpopulations were studied in the blood of healthy donors vs. acute leukemia patients after allo-HSCT. The flow cytometry analysis was conducted to simultaneously assess the expression of markers CD3, CD4, CD8, CD25, CD45RA, CD197, CD28, CCR4, CCR6, CCR10, CXCR3, and CXCR5 in T-cells.

**Results.** The study demonstrated that the count of T-helpers at different stages of differentiation (regulatory, naive T-cells, memory cells, and effector cells) comprehensively distinguishes healthy donors from patients. Moreover, the functional structure of each of these populations differ in donors vs. patients even on Month +6 after allo-HSCT. Donors appeared to have more polarized cells among the central memory T-helpers. The proportion of T-helpers type 1 among the effector cells was higher in patients.

**Conclusion.** The results of the study indicate that the T-cell parameter set can be analyzed to assess immunity and to describe its disorders in different pathologies or after drug chemotherapy.

**Ключевые слова:** проточная цитометрия, Т-клетки, Т-хелперы, доноры крови, субпопуляции лимфоцитов.

**Keywords:** flow cytometry, T-cells, T-helpers, blood donors, lymphocyte subpopulations.

**Получено:** 26 октября 2022 г.

**Принято в печать:** 10 марта 2023 г.

**Received:** October 26, 2022

**Accepted:** March 10, 2023

*Для переписки:* Юлия Олеговна Давыдова, канд. мед. наук, Новый Зыковский пр-д, д. 4, Москва, Российская Федерация, 125167; тел.: +7(499)612-62-21; e-mail: davydova.y@blood.ru

*Для цитирования:* Давыдова Ю.О., Капранов Н.М., Никифорова К.А. и др. Субпопуляционный состав Т-хелперов у больных острыми лейкозами после трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток. Клиническая онкогематология. 2023;16(2):137–45.

DOI: 10.21320/2500-2139-2023-16-2-137-145

*For correspondence:* Yuliya Olegovna Davydova, MD, PhD, 4 Novyi Zykovskii pr-d, Moscow, Russian Federation, 125167; Tel.: +7(499)612-62-21; e-mail: davydova.y@blood.ru

*For citation:* Davydova YuO, Kapranov NM, Nikiforova KA, et al. T-Helper Subpopulations in Acute Leukemia Patients After Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. Clinical oncohematology. 2023;16(2):137–45. (In Russ).

DOI: 10.21320/2500-2139-2023-16-2-137-145

## ВВЕДЕНИЕ

Понимание принципов функционирования иммунной системы и регуляции иммунного ответа необходимо для разработки и развития новых стратегий иммуноопосредованной терапии, вакцин и их адекватного применения. Современные методы исследования, в частности многоцветная проточная цитометрия, микрочипы, масс-спектрометрия, позволяют выделить сотни и тысячи параметров, анализировать которые становится все сложнее и сложнее. В таких трудных ситуациях оптимальной визуализации и анализу данных могут помочь специальные статистические программы с использованием методов кластеризации, таких как иерархическая кластеризация, метод k-средних, метод главных компонент (Principal Component Analysis, PCA) и др. [1].

Основным клеточным компонентом, который модулирует и регулирует иммунные реакции, является Т-хелперное звено. Т-хелперы по своему составу и функциям гетерогенны. Так, регуляторные Т-клетки (Treg) являются уникальной субпопуляцией Т-хелперов, которые поддерживают равновесие иммунной системы. Особенность Treg заключается в высокой экспрессии на их поверхности маркера CD25, который служит субъединицей рецептора интерлейкина-2 (ИЛ-2) [2].

Известно, что зрелые Т-клетки (и Т-хелперы, и цитотоксические Т-клетки) имеют иммунофенотипически различающиеся стадии дифференцировки в зависимости от факта взаимодействия со специфическим антигеном. До встречи с антигеном Т-клетка называется наивной (naive — NV) и характеризуется экспрессией рецепторов хоуминга в лимфатические узлы, таких как L-селектин (CD62L) и С-С хемокиновый рецептор 7 (CCR7, CD197), а также наличием CD28. Последний является костимуляторным рецептором и необходим для активации Т-клеток. После активации NV-клеток антигеном начинается их пролиферация, дифференцировка и переход в стадию эффекторных Т-клеток. При условии уничтожения патогена большинство эффекторных Т-клеток погибает, но часть из них превращается в Т-клетки памяти [3, 4].

Т-клетки памяти отличаются от NV-клеток тем, что при повторной встрече с антигеном они быстрее активируются и вновь превращаются в эффекторные, а это способствует быстрому избавлению от патогена. Характерной особенностью NV является отсутствие на них рецептора апоптоза FAS — CD95, который начинает экспрессироваться Т-клетками после их активации антигеном и необходим для регуляции Т-клеточного иммунитета. Кроме того, наивные, эффекторные и Т-клетки памяти отличаются по экспрессии CD45RA и CD45R0 (белков с высокой и низкой массой соответственно, продуктов альтернативного сплайсинга гена CD45): CD45RA чаще обнаруживается на NV, а CD45R0 — на Т-клетках памяти [3]. CD45 экспрессируется на всех лейкоцитах и является тирозиновой фосфатазой. Альтернативный сплайсинг CD45 строго регулируется и консервативен у позвоночных, но функция различных изоформ CD45 пока неясна. Для CD45 не было обнаружено специфического лиганда, хотя имеются данные о его взаимодействии с лектиноподобными молекулами [5].

Предполагается, что Т-клетки памяти гетерогенны и линейно дифференцируются после каждой встречи с антигеном, превращаясь сначала в эффекторные Т-клетки, фенотип которых динамичен и непредсказуем, а затем переходят в покоящуюся стадию с конкретным фенотипом. Выделяют следующие покоящиеся стадии Т-клеток памяти: стволовые клетки памяти (SCM — stem cell memory), клетки центральной памяти (CM — central memory), транзитной памяти (TM — transitional memory), эффекторной памяти (EM — effector memory) и стадия терминальных эффекторов (TE — terminal effectors). SCM составляют очень небольшую долю от всех Т-клеток памяти, и по иммунофенотипу они наиболее близки к NV-клеткам, отличаясь от них лишь наличием CD95. Профиль экспрессии генов в них объединяет черты Т-клеток NV и SCM [6]. Отличительной особенностью SCM является их высокий пролиферативный потенциал [6, 7].

Т-клетки CM, так же как и NV, экспрессируют CCR7 и CD28, способны мигрировать во вторичные лимфоидные ткани. Т-клетки EM CCR7- и CD28-негативные и способны быстро реализовывать эффекторные

функции. ТМ-клетки являются переходной стадией между Т-клетками СМ и ЕМ, характеризуются наличием экспрессии CD28 и потерей CCR7 [3].

Наиболее дифференцированные Т-клетки — ТЕ, не экспрессируют ни CCR7, ни CD28, но, так же как и NV-лимфоциты, экспрессируют CD45RA. Т-клетки ТЕ имеют самые короткие теломеры, а также низкий пролиферативный и функциональный потенциал [8].

Активированные Т-хелперы разделяют на типы в зависимости от продуцируемых цитокинов, фенотипа и выполняемых функций. Т-хелперы 1-го типа (Th1) опосредуют иммунные реакции при внутриклеточных вирусных инфекциях и продуцируют интерферон- $\gamma$  (ИФН- $\gamma$ ). Т-хелперы 2-го типа (Th2) секретируют ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-13 и обеспечивают защиту от гельминтов. Т-хелперы 17-го типа (Th17) вовлечены в иммунные реакции против внеклеточных патогенов и продуцируют ИЛ-17А, ИЛ-22 и гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор роста. Т-хелперы 22-го типа (Th22) секретируют ИЛ-22, ИЛ-26 и ИЛ-13 и, вероятно, участвуют в иммунных реакциях клеток кожи [9–14].

Разнообразие стадий дифференцировки и функциональных особенностей отдельных популяций Т-хелперов можно оценить с помощью многоцветной проточной цитометрии. Использование 10 и более флуоресцентных красителей одновременно, с одной стороны, позволяет определить множество минорных популяций, а с другой — анализ всей совокупности полученных данных может быть затруднен.

Трансплантация аллогенных гемопоэтических стволовых клеток (аллоТГСК) служит той лечебной стратегией, которая позволяет увеличить вероятность излечения от ряда заболеваний гемопоэтической и негемопоэтической природы. Риски, ассоциированные с аллоТГСК, могут быть связаны с аномальной реконституцией иммунных клеток, что увеличивает вероятность развития инфекционных осложнений, отторжения или неприживления трансплантата, развития рецидива, реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ). Большое число работ посвящено изучению роли Т-клеток в развитии различных осложнений после проведения аллоТГСК [15–17]. Однако работ с глубоким сравнительным анализом Т-клеток у здоровых лиц и пациентов после аллоТГСК немного [18, 19].

**Цель настоящего исследования** — выявить особенности Т-хелперного состава (количества Т-клеток памяти, Th1, Th2, Th17, Th22) у доноров и сравнить полученные данные с таковыми в группе пациентов с острыми лейкозами после аллоТГСК на сроке 6 мес. с помощью метода РСА.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование включены 41 донор крови и 49 пациентов после проведения аллоТГСК. Медиана возраста доноров составила 36 лет (диапазон 20–60 лет), мужчин было 29, женщин — 12. Медиана возраста пациентов составила 37 лет (диапазон 19–62 года), мужчин было 18, женщин — 31. Острый миелоидный лейкоз диагностирован у 27 (55 %) пациентов, острый

Таблица 1. Панель моноклональных антител

Антигенная принадлежность	Флуорохром	Клон
CD25	BB515	2A3
CD196 (CCR6)	PE	G034E3
CD183 (CXCR3)	PE-CF594	1C6/CXCR3
CD194 (CCR4)	PE-Cy7	L291H4
CCR10	APC	1B5
CD3	APC-A700	OKT3
CD4	APC-Fire750	SK3
CD185 (CXCR5)	BV421	RF8B2
CD8	BV510	RPA-T8
CD45RA	BV605	HI100
CD197 (CCR7)	BV650	G043H7
CD28	BV786	CD28.2

лимфобластный лейкоз/лимфома — у 22 (45 %). Миелоаблативное кондиционирование проведено у 4 (8 %) пациентов, кондиционирование со сниженной интенсивностью — у 45 (92 %). У 31 (63 %) больного аллоТГСК выполнена от гаплоидентичного родственного донора, у 13 (27 %) — от неродственного полностью совместимого донора и у 5 (10 %) — от неродственного частично совместимого донора. В качестве иммуносупрессивной терапии у 40 (82 %) пациентов в посттрансплантационный период применялся циклофосфамид в сочетании с циклоспорином А и мофетила микофенолатом; только у 1 пациента использовался циклофосфамид с рруксолитинибом. Процедуру деплеции Т-лимфоцитов  $\alpha\beta$  проводили 8 (16 %) пациентам по протоколу отдела оптимизации профилактики и лечения осложнений после аллоТГСК ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» МЗ РФ [20].

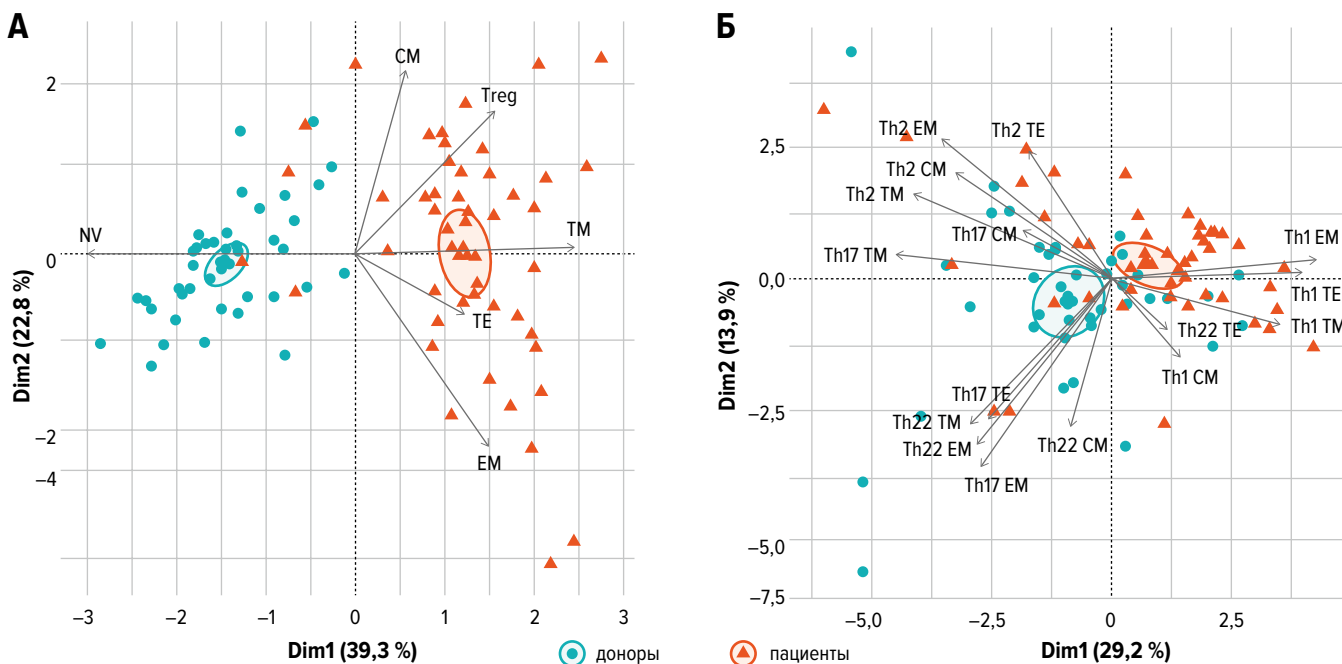
Исследование популяционного состава Т-хелперов выполняли методом многоцветной проточной цитометрии в образцах периферической крови с антикоагулянтом ЭДТА. У пациентов забор крови осуществлялся на +6-м месяце после аллоТГСК.

Моноуклеары получали при центрифугировании крови в градиенте плотности фиколла (1,077 г/см<sup>3</sup>). К 500–700 тыс. выделенных моноуклеарных клеток добавляли моноклональные антитела (табл. 1). После инкубации при комнатной температуре в течение 30 мин клетки отмывали от избытка несвязавшихся антител и добавляли 7-аминоактиномицин D (7-AAD). Далее пробу анализировали на проточном цитометре CytoFlex (Beckman Coulter, США). Гейтирование выполнялось в программном обеспечении Kaluza Analysis 2.1 (Beckman Coulter, США).

Гейтирование начинали с выделения жизнеспособных клеток, которые не окрашиваются 7-AAD, затем выделяли Т-клетки по наличию поверхностной экспрессии CD3, далее из них отбирали только Т-хелперы CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>. От всей популяции Т-хелперов отделяли Treg по высокой экспрессии CD25 и затем анализировали только популяцию конвенциональных Т-хелперов. Далее определяли доли NV, СМ, ТМ, ЕМ и ТЕ от всей популяции конвенциональных Т-клеток [3]. Популяция NV на самом деле включала и наивные Т-клетки, и клетки стволовой памяти, которые мы не могли разделить, т. к. в панели отсутствует антитело

Таблица 2. Иммунофенотип анализируемых популяций Т-хелперов

Популяция Т-хелперов	Иммунофенотип	Доля от
Регуляторные Т-клетки (Treg)	CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>high</sup>	Т-клеток
NV (NV + SCM)	CD45RA <sup>+</sup> CCR7 <sup>+</sup> CD28 <sup>+</sup>	Конвенциональных Т-хелперов
Центральной памяти (CM)	CD45RA <sup>-</sup> CCR7 <sup>+</sup> CD28 <sup>+</sup>	
Транзиторной памяти (TM)	CD45RA <sup>-</sup> CCR7 <sup>-</sup> CD28 <sup>+</sup>	
Эффекторной памяти (EM)	CD45RA <sup>-</sup> CCR7 <sup>-</sup> CD28 <sup>-</sup>	
Терминальные эффекторы (TE)	CD45RA <sup>+</sup> CCR7 <sup>-</sup> CD28 <sup>-</sup>	
Т-хелперы 1-го типа (Th1)	CCR6 <sup>-</sup> CXCR3 <sup>+</sup> CCR4 <sup>-</sup> CCR10 <sup>-</sup> CXCR5 <sup>-</sup>	Т-хелперов CM, TM, EM, TE
Т-хелперы 2-го типа (Th2)	CCR6 <sup>-</sup> CXCR3 <sup>-</sup> CCR4 <sup>+</sup> CCR10 <sup>-</sup> CXCR5 <sup>-</sup>	
Т-хелперы 17-го типа (Th17)	CCR6 <sup>+</sup> CXCR3 <sup>-</sup> CCR4 <sup>+</sup> CCR10 <sup>-</sup> CXCR5 <sup>-</sup>	
Т-хелперы 22-го типа (Th22)	CCR6 <sup>-</sup> CXCR3 <sup>-</sup> CCR4 <sup>+</sup> CCR10 <sup>-</sup> CXCR5 <sup>-</sup>	



**Рис. 1.** PCA-анализ субпопуляций Т-хелперов у доноров и пациентов с острыми лейкозами на +6-м месяце после аллотГСК: А — доля регуляторных Т-клеток (Treg), наивных Т-хелперов (NV), клеток центральной памяти (CM), транзиторной памяти (TM), эффекторной памяти (EM) и терминальных эффекторов (TE) от всех Т-хелперов; Б — доля Т-хелперов (Th1, Th2, Th17, Th22) от CM, TM, EM, TE Т-хелперов

**Fig. 1.** PCA analysis of T-helper subpopulations in donors vs. acute leukemia patients on Month +6 after allo-HSCT: А — the proportion of regulatory T-cells (Treg), naive T-helpers (NV), central memory (CM), transitional memory (TM), effector memory (EM), and terminal effector (TE) cells among all T-helpers; Б — the proportion of T-helpers (Th1, Th2, Th17, Th22) among CM, TM, EM, and TE T-helpers

против CD95. Однако, поскольку доля SCM мала [3], то упрощенно мы всю популяцию с иммунофенотипом CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> здесь и далее называем наивными Т-клетками (NV). От каждой из выделенных популяций Т-хелперов памяти определяли доли поляризованных Th1, Th2, Th17 и Th22. Поляризованные Т-хелперы идентифицировали по поверхностной экспрессии хемокиновых рецепторов [21]. Иммунофенотип определяемых популяций Т-хелперов представлен в табл. 2.

### Статистический анализ

Статистическая обработка данных и построение графиков выполнялись в программе R 3.6.3. Визуализация результатов анализа осуществлялась с помощью метода PCA. Анализ корреляционной взаимосвязи между параметрами выполнен методом Спирмена. Сравнение отдельных субпопуляций Т-хелперов у доноров и пациентов проведено с применением

критерия Манна—Уитни. Значимыми признавались различия при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Визуализацию полученных результатов анализа субпопуляционного состава Т-хелперов у доноров и пациентов после аллотГСК на +6-м месяце выполняли с помощью метода PCA (рис. 1). Суть метода заключается в аппроксимации всех данных на новые оси главных компонент. Осей главных компонент столько же, сколько изучаемых параметров, но первые оси описывают основную вариабельность данных. Это позволяет сократить размерность и перейти к анализу результатов в двухмерной системе координат [22].

На первом этапе исследования мы проанализировали Treg и основные популяции Т-хелперов

памяти (NV, CM, TM, EM и TE) с помощью метода PCA. Результаты отображены в новой системе осей главной компоненты Dim1, которая описывает 39,3 % всей вариабельности данных, и Dim2, описывающей 22,8 % вариабельности данных (см. рис. 1, А). В новой плоскости показаны также проекции осей значений Treg и субпопуляций Т-хелперов (NV, CM, TM, EM и TE). При этом, если угол между осями острый и стремится к 0°, это говорит о сильной прямой корреляции между этими данными, а если угол между осями приближается к 180°, то это свидетельствует о сильной обратной корреляции между данными. Так, на рис. 1 видно, что количество NV обратно связано с количеством TM (чем больше у пациента или донора среди Т-хелперов NV, тем меньше TM), а между TE и EM, наоборот, существует прямая связь (чем больше TE, тем больше EM). В целом количество разных субпопуляций Т-хелперов памяти взаимосвязано, т. к. сумма NV, CM, TM, EM и TE приближается к 100 %. В связи с этим, если уменьшается количество одной субпопуляции, возрастает доля других. Помимо осей в новой плоскости главных компонент показаны результаты PCA-анализа у доноров (голубые точки) и пациентов после аллоТГСК (оранжевые треугольники) (см. рис. 1, А). При этом видно, что группы доноров и пациентов образовали два отдельных, практически не пересекающихся кластера. Это свидетельствует о том, что состав Т-хелперов значительно отличается в этих двух группах. Расположение кластеров по отношению к осям говорит о том, что у доноров в составе Т-хелперов больше смещение в сторону NV, а у пациентов — в сторону более терминально дифференцированных Т-хелперов и Treg. Сравнение этих показателей с помощью критерия Манна—Уитни подтверждает, что у доноров выше доля NV, а у пациентов выше доля TM, EM, TE среди Т-хелперов и Treg (рис. 2, А–Д).

Следующий этап анализа включал изучение и сравнение поляризованных Т-хелперов у доноров и пациентов на +6-м месяце после аллоТГСК методом PCA. Поскольку доля NV была выше у доноров, чем у пациентов ( $p < 0,001$ ), мы оценивали долю Th1, Th2, Th17 и Th22 от отдельных популяций конвенциональных Т-хелперов памяти (CM, TM, EM, TE), а не от общей популяции этих клеток. При анализе плоскости первых двух главных компонент (см. рис. 1, Б) обращает на себя внимание, что проекции осей изучаемых параметров сформировали три группы клеток. Группа I включила все Т-хелперы 1-го типа (доли от CM, TM, EM и TE), а также Th22 от TE. Группа II объединила преимущественно доли Т-хелперов 2-го типа от CM, TM, EM и TE, а также Th17 от CM и TM. И, наконец, группа III включила оставшиеся показатели Th17 (от EM и TE) и Th22 (от CM, TM и EM). Вероятно, некоторые параметры, попавшие в отдельные группы, коррелируют друг с другом, а параметры I и II групп находятся в обратной взаимосвязи.

В связи с группировкой параметров в PCA мы провели корреляционный анализ (рис. 3). Как оказалось, Т-хелперы 1-го типа прямо взаимосвязаны только между собой: TM с CM ( $r = 0,5$ ;  $p < 0,001$ ) и EM ( $r = 0,4$ ;  $p = 0,002$ ), а также EM с TE ( $r = 0,9$ ;  $p < 0,001$ ). Многие параметры Th2, Th17 и Th22 также имеют значимую прямую связь. Наибольшие коэффициенты корреляции

получены в парах Th2 CM и Th2 TM ( $r = 0,8$ ;  $p < 0,001$ ), Th2 TE и Th2 EM ( $r = 0,6$ ;  $p < 0,001$ ), Th17 TM и Th2 TM ( $r = 0,6$ ;  $p < 0,001$ ), Th17 TM и Th22 TM ( $r = 0,5$ ;  $p < 0,001$ ), Th22 TM и Th22 CM ( $r = 0,6$ ;  $p < 0,001$ ). Доли Т-хелперов 1-го типа обратно взаимосвязаны с Th2, Th17 и в меньшей степени с Th22. Наименьшие коэффициенты корреляции получены между Th1 EM и Th2 TM ( $r = -0,6$ ;  $p < 0,001$ ), а также Th1 EM и Th17 TM ( $r = -0,7$ ;  $p < 0,001$ ) (см. рис. 3).

Доноры и пациенты после аллоТГСК также сформировали два кластера. Кластер пациентов смещен в правую сторону от центра координат плоскости первых двух главных компонент (оранжевые треугольники на рис. 1, Б), а кластер доноров — в левую сторону (голубые точки на рис. 1, Б). Таким образом, можно сделать вывод, что у пациентов и доноров распределение долей поляризованных Т-хелперов отличается.

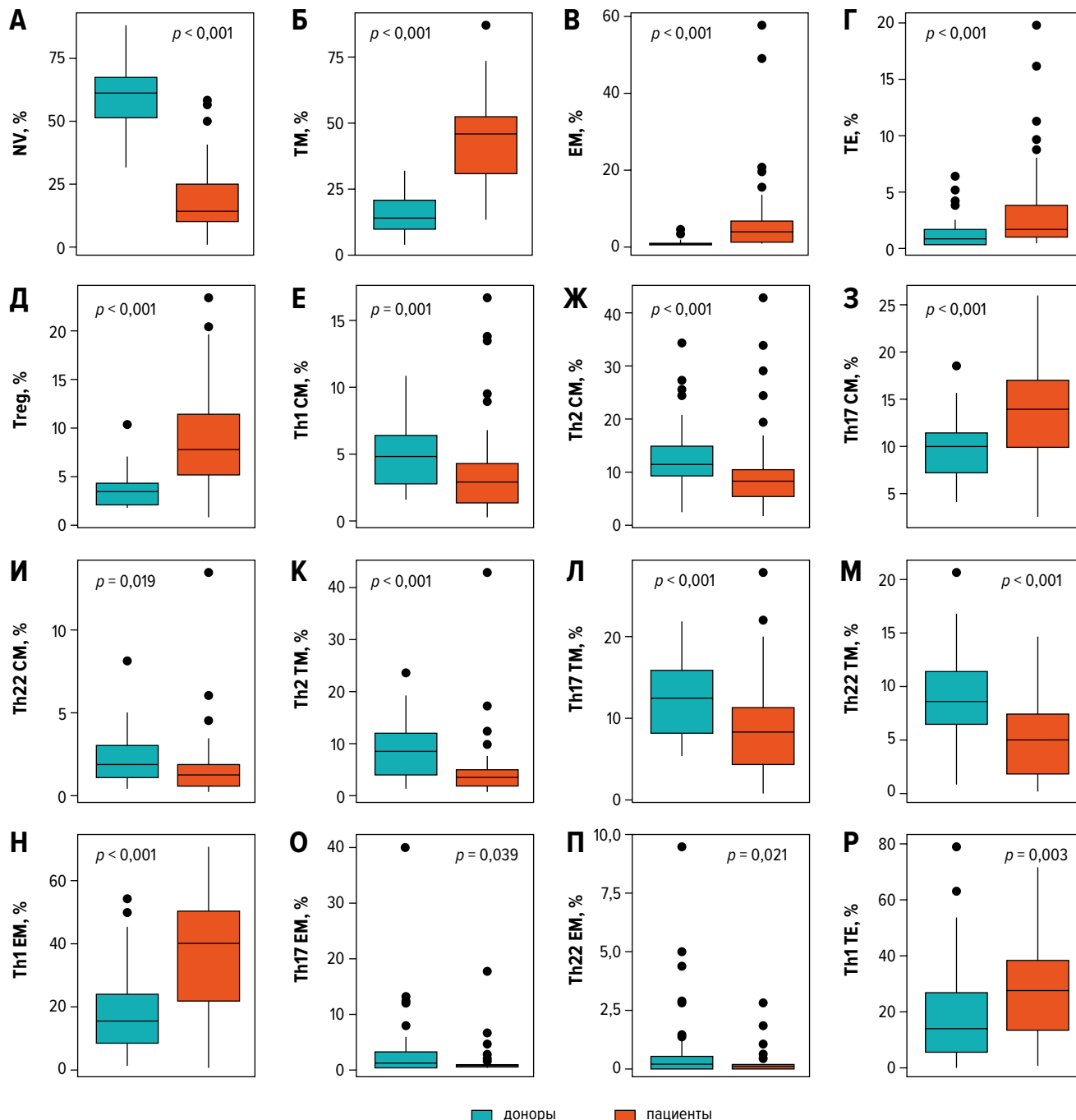
Статистически значимые отличия получены и при сравнении изучаемых параметров с помощью критерия Манна—Уитни. У доноров выше доли Th1 от CM, Th2 от CM и TM, Th17 от TM и EM, Th22 от CM, TM, EM, чем у пациентов. У больных выше доли Th1 от EM и TE, Th17 от CM (см. рис. 2, Е–Р).

## ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящем исследовании мы оценили и сравнили состав Т-хелперов у доноров и пациентов с острыми лейкозами на сроке +6 мес. после аллоТГСК методом многоцветной проточной цитометрии. Всего в анализ включен 21 параметр: доли NV-хелперов, разных стадий Т-хелперов памяти, Treg, а также доли Th1, Th2, Th17 и Th22 каждой стадии клеток памяти. Метод PCA позволил эффективно сократить размерность данных и перейти в плоскость всего двух компонент, где хорошо визуализируются и воспринимаются отличия состава Т-хелперов у доноров и пациентов (см. рис. 1). При применении же классических методов сравнения (например, критерий Манна—Уитни) и визуализации данных с помощью «ящиков с усами» (см. рис. 2) отличия хотя и обнаруживаются, но общую картину увидеть гораздо труднее. Кроме того, важно помнить о необходимости введения поправок на множественные сравнения при проверке множества гипотез. Преимуществом метода PCA является и то, что он позволяет выявить наличие корреляции между изучаемыми переменными, которую затем можно подтвердить классическими методами Спирмена или Пирсона.

Как известно, восстановление количества Т-клеток после аллоТГСК происходит двумя путями. Первый путь — это экспансия Т-клеток памяти донора из трансплантата, а второй — это образование Т-клеток донора из тимуса после заселения его донорскими предшественниками. В первые месяцы после аллоТГСК восстановление Т-клеток происходит преимущественно первым путем, т. к. для образования Т-клеток из тимуса требуется много времени [23–25].

Именно указанными фактами может объясняться то, что, по нашим данным, доля NV была выше у доноров, а доли TM, EM, TE среди Т-хелперов были выше у пациентов на +6-м месяце после аллоТГСК. NV-хелперы



**Рис. 2.** Субпопуляционный состав Т-хелперов у доноров и пациентов с острыми лейкозами на +6-м месяце после аллоТГСК:

А — доля наивных клеток (NV) от конвенциональных Т-хелперов; Б — доля клеток транзитной памяти (TM) от конвенциональных Т-хелперов; В — доля клеток эфektorной памяти (EM) от конвенциональных Т-хелперов; Г — доля терминальных эфektorов (TE) от конвенциональных Т-хелперов; Д — доля регуляторных Т-клеток (Treg) от Т-хелперов; Е — доля Т-хелперов 1-го типа (Th1) от конвенциональных Т-хелперов центральной памяти (CM); Ж — доля Т-хелперов 2-го типа (Th2) от CM; З — доля Т-хелперов 17-го типа (Th17) от CM; И — доля Т-хелперов 22-го типа (Th22) от CM; К — доля Th2 от TM; Л — доля Th17 от TM; М — доля Th22 от TM; Н — доля Th1 от EM; О — доля Th17 от EM; П — доля Th22 от EM; Р — доля Th1 от TE

**Fig. 2.** T-helper subpopulations in donors vs. acute leukemia patients on Month +6 after allo-HSCT:

A — naive (NV) cell proportion among conventional T-helpers; Б — transitional memory (TM) cell proportion among conventional T-helpers; В — effector memory (EM) cell proportion among conventional T-helpers; Г — terminal effector (TE) cell proportion among conventional T-helpers; Д — regulatory T-cell (Treg) proportion among T-helpers; Е — the proportion of T-helpers type 1 (Th1) among conventional central memory T-helpers (CM); Ж — the proportion of T-helpers type 2 (Th2) among CM; З — the proportion of T-helpers type 17 (Th17) among CM; И — the proportion of T-helpers type 22 (Th22) among CM; К — Th2 proportion among TM; Л — Th17 proportion among TM; М — Th22 proportion among TM; Н — Th1 proportion among EM; О — Th17 proportion among EM; П — Th22 proportion among EM; Р — Th1 proportion among TE

восстанавливаются очень медленно. Так, известно, что пул NV у пациентов меньше по сравнению с донорами даже через 10 лет после проведения высокодозной химиотерапии с последующей трансплантацией аутологичных гемопоэтических стволовых клеток [26].

Причины такого медленного восстановления NV-клеток неясны. Считается, что миелоаблативные режимы кондиционирования и проведение тотального облучения тела приводят к значительному повреждению тимуса и даже необратимой гибели

эпителиальных клеток этого органа [27, 28]. С другой стороны, имеются данные о том, что медленное восстановление NV является следствием нарушения их выживания, а не дисфункции тимуса [29].

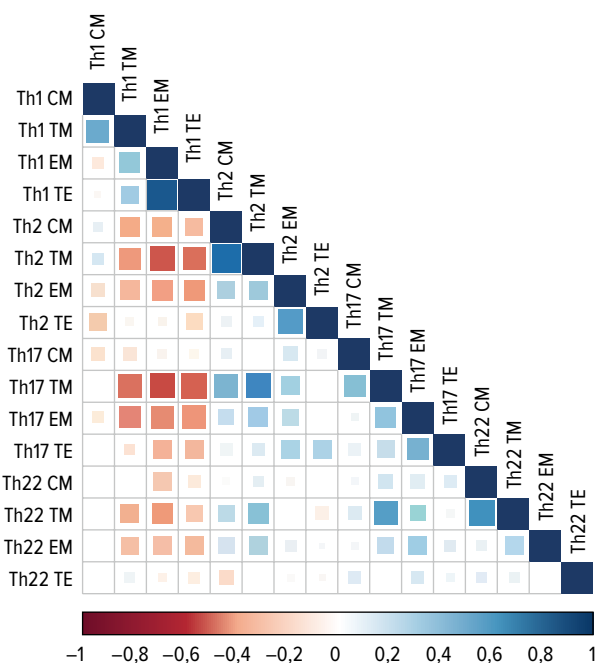
Известно, что именно NV, а не эффекторные клетки ответственны за развитие наиболее тяжелых форм РТПХ [17]. Возможно, именно они и обеспечивают самую надежную защиту от опухолевых клеток и от развития рецидива путем реализации реакции «трансплантат против опухоли».

В настоящем исследовании мы показали, что существует отчетливая прямая корреляция между долями Th1 от разных клеток памяти, а также между долями Th2, Th17, Th22 от некоторых Т-клеток памяти. При этом между долями Th1 и долями Th2, Th17, Th22 была обратная взаимосвязь. Кроме того, у пациентов на +6-м месяце после аллотГСК доли некоторых популяций памяти от Th2, Th17 и Th22 были ниже, а Th1 — выше, чем у доноров. Нам не удалось найти упоминания об аналогичных исследованиях в существующих отечественных и зарубежных публикациях.

Есть данные, что у пациентов с плохой функцией трансплантата доля активированных Т-хелперов и цитотоксических клеток, продуцирующих ИФН- $\gamma$ , в образцах костного мозга была выше, чем у доноров. Авторы этого исследования предположили, что начальная антигенная стимуляция (например, при РТПХ или вирусной инфекции) может поляризовать Т-хелперы в сторону ответа 1-го типа, что в конечном итоге приводит к разрушению гемопоэтических клеток-предшественниц [30]. С другой стороны, исследования на бестимусных мышах показали, что Т-клетки поддерживают гемопоэз. У таких мышей развивалась гранулоцитопения, а в костном мозге у них увеличивалось количество незрелых гранулоцитов. Нормальный гемопоэз и количество гранулоцитов в крови восстанавливались после трансплантации им тимуса или переливания Т-клеток CD4<sup>+</sup>, но не Т-клеток CD8<sup>+</sup>. Эти Т-клетки CD4<sup>+</sup> продуцировали преимущественно ИЛ-4 и ИФН- $\gamma$  [31–33].

Считается, что донорские Th1 инициируют острую РТПХ (оРТПХ) после распознавания аллоантигенов реципиента и миграции в ткани. С другой стороны, эксперименты на животных показали, что дефицит ИФН- $\gamma$  (который продуцируется Th1) может усугублять течение оРТПХ [34]. Возможно, дело в том, что ИФН- $\gamma$  повышает экспрессию ингибиторных молекул, например лиганда к молекуле программируемой гибели клетки (PD-L1) [35]. Н.Р.М. Brok и соавт. показали, что введение ИФН- $\gamma$  мышам в течение 5 нед. начиная с 1-го дня выполнения аллотГСК значимо снижало частоту развития оРТПХ. Однако, если ИФН- $\gamma$  начинали вводить на 3, 5, 10 или 14-й день после аллотГСК, то увеличивалось количество погибших мышей из-за развития оРТПХ [36].

Вероятно, и другие Т-хелперы также участвуют в развитии оРТПХ. Так, ИЛ-17, который секретируется Th17, инициирует оРТПХ кожи [37]. По результатам одного исследования показано, что Th1 было меньше в крови у пациентов с более тяжелой степенью оРТПХ. Авторы предположили, что это могло быть связано с миграцией эффекторных клеток из кровотока в ткани-мишени [35].



**Рис. 3.** Корреляционная матрица долей поляризованных Т-хелперов (Th) от Т-хелперов центральной памяти (CM), транзитной памяти (TM), эффекторной памяти (EM) и терминальных эффекторов (TE). Цветовая шкала отражает величину коэффициента корреляции Спирмена

**Fig. 3.** Correlation between the proportions of polarized T-helpers (Th) among central memory (CM), transitional memory (TM), effector memory (EM), and terminal effector (TE) T-helpers. The color scale shows the values of Spearman correlation coefficients

Можно предположить, что сдвиг Т-хелперов в сторону Th1 у пациентов после аллотГСК связан с постоянной и длительной стимуляцией Т-хелперов донора антигенами хозяина, которые можно отнести к внутриклеточным антигенам. Подобное изменение в соотношении Th1/Th2 обнаруживается при многих аутоиммунных заболеваниях, таких как рассеянный склероз, сахарный диабет 1-го типа, тиреоидит Хашимото и ревматоидный артрит [38].

Имеются ли различия в составе Т-хелперов у пациентов с острыми лейкозами после аллотГСК с развитием РТПХ, дисфункции трансплантата или рецидива, предстоит выяснить в будущих исследованиях.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Т-клетки являются основным компонентом адаптивной иммунной системы, а Т-хелперное звено модулирует и регулирует иммунные реакции. Изменение соотношения субпопуляций Т-хелперов и их неполная реконституция, возникающие после выполнения аллотГСК, могут лежать в основе различных осложнений, таких как инфекционные заболевания, РТПХ, отторжение трансплантата, а также развитие рецидива заболевания. В связи с этим изучение субпопуляций Т-хелперов после аллотГСК признается актуальной проблемой.

В настоящей работе мы провели оценку и сравнительный анализ субпопуляционного состава Т-хелперов (количества Т-клеток памяти, Th1, Th2, Th17,

Th22) у доноров и пациентов с острыми лейкозами на +6-м месяце после аллотГГСК с помощью статистического метода PCA. Как оказалось, состав Т-хелперов значительно отличался у доноров и пациентов. У доноров выше доля наивных Т-хелперов, а у пациентов — доля Т-клеток памяти и терминальных эффекторов. Кроме того, у пациентов на +6-м месяце после аллотГГСК доля некоторых популяций Т-клеток памяти от Th2, Th17 и Th22 была ниже, а Th1 — выше, чем у доноров, что, вероятно, связано с длительной стимуляцией Т-хелперов донора антигенами реципиента.

Таким образом, комплексная оценка Т-клеточного звена иммунитета может использоваться для описания нарушений иммунитета, возникающих при различных онкогематологических заболеваниях, а также после лекарственного противоопухолевого воздействия.

## КОНФЛИКТЫ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

## ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование не имело спонсорской поддержки.

## ВКЛАД АВТОРОВ

**Концепция и дизайн:** Л.А. Кузьмина, Т.В. Гапонова, И.В. Гальцева, Е.Н. Паровичникова.

**Сбор и обработка данных:** О.С. Караваева, К.А. Никифорова.

**Предоставление материалов исследования:** Д.В. Камельских, М.Ю. Дроков.

**Анализ и интерпретация данных:** Ю.О. Давыдова.

**Подготовка рукописи:** Ю.О. Давыдова, Н.М. Капранов.

**Окончательное одобрение рукописи:** все авторы.

## ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

- Lugli E, Pinti M, Nasi M, et al. Subject classification obtained by cluster analysis and principal component analysis applied to flow cytometric data. *Cytom Part A*. 2007;71(5):334–44. doi: 10.1002/CYTO.A.20387.
- Shevryev D, Tereshchenko V. Treg Heterogeneity, Function, and Homeostasis. *Front Immunol*. 2020;10:3100. doi: 10.3389/FIMMU.2019.03100/BIBTEX.
- Mahnke YD, Brodie TM, Sallusto F, et al. The who's who of T-cell differentiation: Human memory T-cell subsets. *Eur J Immunol*. 2013;43(11):2797–809. doi: 10.1002/eji.201343751.
- Hammarlund E, Lewis MW, Hansen SG, et al. Duration of antiviral immunity after smallpox vaccination. *Nat Med*. 2003;9(9):1131–7. doi: 10.1038/NM917.
- Dawes R, Petrova S, Liu Z, et al. Combinations of CD45 Isoforms Are Crucial for Immune Function and Disease. *J Immunol*. 2006;176(6):3417. doi: 10.4049/JIMMUNOL.176.6.3417.
- Gattinoni L, Lugli E, Ji Y, et al. A human memory T-cell subset with stem cell-like properties. *Nat Med*. 2011;17(10):1290. doi: 10.1038/NM2446.
- Lugli E, Dominguez MH, Gattinoni L, et al. Superior T memory stem cell persistence supports long-lived T cell memory. *J Clin Invest*. 2013;123(2):594. doi: 10.1172/JCI66327.
- Romero P, Zippelius A, Kurth I, et al. Four Functionally Distinct Populations of Human Effector-Memory CD8+ T Lymphocytes. *J Immunol*. 2007;178(7):4112–9. doi: 10.4049/JIMMUNOL.178.7.4112.
- Bonecchi R, Bianchi G, Bordignon PP, et al. Differential Expression of Chemokine Receptors and Chemotactic Responsiveness of Type 1 T Helper Cells (Th1s) and Th2s. *J Exp Med*. 1998;187(1):129–34. doi: 10.1084/JEM.187.1.129.

10. Duhon T, Geiger R, Jarrossay D, et al. Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells. *Nat Immunol*. 2009;10(8):857–63. doi: 10.1038/ni1767.

11. Rivino L, Messi M, Jarrossay D, et al. Chemokine Receptor Expression Identifies Pre-T Helper (Th)1, Pre-Th2, and Nonpolarized Cells among Human CD4+ Central Memory T Cells. *J Exp Med*. 2004;200(6):725–35. doi: 10.1084/JEM.20040774.

12. Acosta-Rodriguez EV, Rivino L, Geginat J, et al. Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nat Immunol*. 2007;8(6):639–46. doi: 10.1038/ni1467.

13. Zhang N, Pan HF, Ye DQ. Th22 in inflammatory and autoimmune disease: prospects for therapeutic intervention. *Mol Cell Biochem*. 2011;353(1):41–6. doi: 10.1007/S11010-011-0772-Y.

14. Bunjun R, Omondi FMA, Makatsa MS, et al. Th22 Cells Are a Major Contributor to the Mycobacterial CD4+ T Cell Response and Are Depleted During HIV Infection. *J Immunol*. 2021;207(5):1239–49. doi: 10.4049/JIMMUNOL.1900984.

15. Beilhack A, Schulz S, Baker J, et al. In vivo analyses of early events in acute graft-versus-host disease reveal sequential infiltration of T-cell subsets. *Blood*. 2005;106(3):1113–22. doi: 10.1182/blood-2005-02-0509.

16. Wysocki CA, Panoskaltis-Mortari A, Blazar BR, Serody JS. Leukocyte migration and graft-versus-host disease. *Blood*. 2005;105(11):4191–9. doi: 10.1182/blood-2004-12-4726.

17. Попова Н.Н., Савченко В.Г. Реконституция Т-клеточного звена иммунной системы у больных после трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток. *Гематология и трансфузиология*. 2020;65(1):24–38. doi: 10.35754/0234-5730-2020-65-1-24-38.

[Popova NN, Savchenko VG. Reconstitution of T-cell-mediated immunity in patients after allogeneic stem cell transplantation. *Russian journal of hematology and transfusiology*. 2020;65(1):24–38. doi: 10.35754/0234-5730-2020-65-1-24-38. (In Russ)]

18. Ringhoffer S, Rojewski M, Dohner H, et al. 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. doi: 10.3324/haematol.2012.072264.

19. Pei X, Zhao X, Wang Y, et al. Comparison of reference values for immune recovery between event-free patients receiving haploidentical allografts and those receiving human leukocyte antigen-matched sibling donor allografts. *Front Med*. 2017;12(2):153–63. doi: 10.1007/S11684-017-0548-1.

20. Благов С.Л., Шелихова Л.Н., Осипова Е.Ю. и др. Применение инфузий Т-клеток памяти с целью профилактики вирусных инфекций у пациентов с гемобластомами, перенесших аллогенную трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток с деплецией альфа/бета Т-лимфоцитов. *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии*. 2018;17(2):9–20.

[Blagov SL, Shelikhova LN, Osipova EYu, et al. Low dose donor memory T-cell infusion after TCR alpha/beta depleted stem cell transplantation for patients with malignant disorders. *Voprosy gematologii/onkologii i immunopatologii v pediatrii*. 2018;17(2):9–20. (In Russ)]

21. Mahnke YD, Beddall MH, Roederer M. OMP-017: Human CD4+ Helper T-cell Subsets Including Follicular Helper Cells. *Cytometry A*. 2013;83(5):439. doi: 10.1002/CYTO.A.22269.

22. Spadea M, Saglio F, Tripodi SI, et al. Multivariate Analysis of Immune Reconstitution and Relapse Risk Scoring in Children Receiving Allogeneic Stem Cell Transplantation for Acute Leukemias. *Transplant Direct*. 2021;7(11):e774. doi: 10.1097/TXD.0000000000001226.

23. Mackall CL, Fleisher TA, Brown MR, et al. Age, thymopoiesis, and CD4+ T-lymphocyte regeneration after intensive chemotherapy. *N Engl J Med*. 1995;332(3):143–9. doi: 10.1056/NEJM1995011933230303.

24. Hakim FT, Memon SA, Cepeda R, et al. Age-dependent incidence, time course, and consequences of thymic renewal in adults. *J Clin Invest*. 2005;115(4):930–9. doi: 10.1172/JCI22492.

25. Van Den Brink MRM, Velardi E, Perales MA. Immune reconstitution following stem cell transplantation. *Hematol Am Soc Hematol Educ Progr*. 2015;2015(1):215–9. doi: 10.1182/asheducation-2015.1.215.

26. Dean HF, Cazaly A, Hurlock C, et al. Defects in lymphocyte subsets and serological memory persist a median of 10 years after high-dose therapy and autologous progenitor cell rescue for malignant lymphoma. *Bone Marrow Transplant*. 2012;47(12):1545–51. doi: 10.1038/bmt.2012.73.

27. Chung B, Barbara-Burnham L, Barsky L, Weinberg K. Radiosensitivity of thymic interleukin-7 production and thymopoiesis after bone marrow transplantation. *Blood*. 2001;98(5):1601–6. doi: 10.1182/blood.V98.5.1601.

28. Mackall CL, Fleisher TA, Brown MR, et al. Distinctions Between CD8+ and CD4+ T-Cell Regenerative Pathways Result in Prolonged T-Cell Subset Imbalance After Intensive Chemotherapy. *Blood*. 1997;89(10):3700–7. doi: 10.1182/blood.V89.10.3700.

29. Poulin JF, Sylvestre M, Champagne P, et al. Evidence for adequate thymic function but impaired naive T-cell survival following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in the absence of chronic graft-versus-host disease. *Blood*. 2003;102(13):4600–7. doi: 10.1182/blood-2003-05-1428.

30. Wang YT, Kong Y, Song Y, et al. Increased Type 1 Immune Response in the Bone Marrow Immune Microenvironment of Patients with Poor Graft Function



after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2016;22(8):1376–82. doi: 10.1016/j.bbmt.2016.04.016.

31. Monteiro JP, Bonomo A. Linking immunity and hematopoiesis by bone marrow T cell activity. *Brazilian J Med Biol Res.* 2005;38(10):1475–86. doi: 10.1590/S0100-879X2005001000004.

32. Monteiro JP, Benjamin A, Costa ES, et al. Normal hematopoiesis is maintained by activated bone marrow CD4+ T cells. *Blood.* 2005;105(4):1484–91. doi: 10.1182/blood-2004-07-2856.

33. Bonomo A, Monteiro AC, Goncalves-Silva T, et al. A T cell view of the bone marrow. *Front Immunol.* 2016;7:184. doi: 10.3389/fimmu.2016.00184/BIBTEX.

34. Yang YG, Dey BR, Sergio JJ, et al. Donor-derived interferon gamma is required for inhibition of acute graft-versus-host disease by interleukin 12. *J Clin Invest.* 1998;102(12):2126–35. doi: 10.1172/JCI4992.

35. Engelhardt BG, Paczesny S, Jung DK, et al. Early Th1 immunity promotes immune tolerance and may impair graft-versus-leukemia effect after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Haematologica.* 2016;101(5):e204–e208. doi: 10.3324/haematol.2015.139501.

36. Brok HPM, Vossen JM, Heidt PJ. Interferon- $\gamma$ -mediated prevention of graft-versus-host disease: Development of immune competent and allo-tolerant T cells in chimeric mice. *Bone Marrow Transplant.* 1997;19(6):601–6. doi: 10.1038/SJ.BMT.1700707.

37. Carlson MJ, West ML, Coghil JM, et al. In vitro-differentiated TH17 cells mediate lethal acute graft-versus-host disease with severe cutaneous and pulmonary pathologic manifestations. *Blood.* 2009;113(6):1365–74. doi: 10.1182/blood-2008-06-162420.

38. Crane IJ, Forrester JV. Th1 and Th2 Lymphocytes in Autoimmune Disease. *Crit Rev Immunol.* 2005;25(2):75–102. doi: 10.1615/critrevimmunol.V25.I2.10.

