

Значение Т-клеточного звена иммунитета при множественной миеломе

Т.А. Митина¹, А.К. Голенков¹, А.Н. Митин², М.М. Литвина², А.Д. Донецкова², М.Ф. Никонова², В.В. Комогорова², Н.И. Шарова², А.В. Караулов³

¹ ГБУЗ МО МНИКИ им. М.Ф.Владимирского, Москва, Российская Федерация

² ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Москва, Российская Федерация

³ ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, Москва, Российская Федерация

Significance of T-cell immunity in multiple myeloma

T.A. Mitina¹, A.K. Golenkov¹, A.N. Mitin², M.M. Litvina², A.D. Donetskova², M.F. Nikonova², V.V. Komogorova², N.I. Sharova², A.V. Karaulov³

¹ Moscow regional research clinical institute named after M.F.Vladimirsky, Moscow, Russian Federation

² National Research Centre «Institute of Immunology» FMBA of Russia, Moscow, Russian Federation

³ I.M.Sechenov First Moscow State Medical University of Russian Ministry of Health, Moscow, Russia, Moscow, Russian Federation

Аннотация

Изучали процесс восстановления периферических Т-лимфоцитов у пациентов с впервые выявленной множественной миеломой (ММ) после индукционного курса химиотерапии VCP. Выявили Т-лимфоцитоз у первичных пациентов с ММ, лимфопению по окончании курса терапии и полное восстановление числа Т-клеток до уровня здоровых доноров в течение последующих 30 дней. По уровню TREC установили сниженный вклад тимуса в восстановление Т-клеточного звена иммунной системы из-за гипофункции тимуса у пациентов с впервые выявленной ММ. Установлено ведущее значение вторичных лимфоидных органов в регенерации периферического пула Т-лимфоцитов по увеличенному проценту пролиферирующих (Ki-67+) Т-клеток. Выявили характерную особенность первичных пациентов с ММ – наличие активного иммунного ответа, вероятно противоопухолевого, о чем свидетельствовали повышение доли пролиферирующих Т-клеток, терминально-дифференцированных эффекторных Т-лимфоцитов, в основном CD8+, и индуцированных регуляторных Т-клеток. Методом проточной цитометрии была проведена оценка экспрессии молекулы FOXP3 и ее изоформ CD4+ Т-клетками периферической крови пациентов с различными формами течения ММ. Было показано, что экспрессия молекулы FOXP3 CD4+

Summary

The process of peripheral T lymphocytes restoration in patients with newly diagnosed multiple myeloma after induction chemotherapy (VCP) was investigated. We have revealed T lymphocytosis in patients with newly diagnosed multiple myeloma, lymphopenia after induction therapy and full restoration of T cells quantity in next 30 days. By means of TREC detection we have determined the reduced contribution of thymus in T-cell immunity restoration owing to thymic hypofunction in these patients. A greater contribution of secondary lymphoid organs in regeneration of peripheral T-lymphatic pool was determined by high percent of proliferating (Ki-67+) T cells. An active immune response as characteristic feature of primary patients with MM was revealed. This was evidenced by increase in the share of proliferating T cells, terminally differentiated effector T lymphocytes, mainly CD8+, and induced regulatory T cells. We have assessed FOXP3 and its isoforms expression by CD4+ T cells from peripheral blood of patients with various forms of multiple myeloma (MM). Significant role of FOXP3 expression by CD4+ T lymphocytes in pathogenesis of MM was shown. Thus, increase of FOXP3-expressing cells percent among CD4+ T cells is registered in patients with newly diagnosed MM and in resistant/relapsed patients. The main contribution to this percent increment is made by FOXP3Δ2

Т-лимфоцитами играет важную роль в патогенезе ММ. Так, у первичных и резистентных пациентов с ММ отмечается увеличение процента CD4+ Т-клеток, экспрессирующих FOXP3. Основной вклад в увеличение этого процента вносят клетки, экспрессирующие изоформу FOXP3, лишённую экзона 2 (FOXP3Δ2). У первичных пациентов помимо увеличения процента, увеличивается и абсолютное количество всех CD4+FOXP3+ Т-клеток. Уровень экспрессии FOXP3 CD4+ Т-клетками также отражает эффективность проводимой противоопухолевой терапии у пациентов с ММ, ввиду нормализации и числа, и процента CD4+FOXP3+ Т-лимфоцитов, а соответственно и регуляторных Т-клеток, у пациентов с ремиссией заболевания. Также обсуждается возможная связь посттранскрипционной модификации мРНК FOXP3, а именно альтернативного сплайсинга, со стабильностью экспрессии FOXP3 регуляторными Т-клетками.

Ключевые слова

Т-клетки, химиотерапия, FOXP3, изоформы, регуляторные Т-клетки человека, множественная миелома, тимопоз

Множественная миелома (ММ) – злокачественное заболевание системы крови, связанное с накоплением в костном мозге зрелых плазматических клеток, сопровождающееся разрушением костной ткани и нарушением нормального гемопоэза. Функция Т-клеточного звена иммунитета при ММ остается недостаточно изучена. Традиционно, рассматривая ММ, как В-клеточную опухоль, применяются химиотерапевтические протоколы терапии и таргетное воздействие, целью которого является опухолевая плазматическая клетка. Вследствие такой терапии помимо редукции опухоли развивается лимфопения, которая в наибольшей степени затрагивает Т-клеточное звено иммунной системы. Известно, что восстановление Т-лимфоцитов значительно отстает от регенерации миелоидных, NK и В-клеток [1]. Имеются сведения, что количественная регенерация Т-клеток зачастую не сопровождается восстановлением их нормальной функции [2], что зачастую сопровождается развитием инфекционных осложнений и рецидивом заболевания. В здоровом организме регенерация Т-клеток в случае не заполнения Т-клеточной ниши осуществляется путем активации тимопоза и гомеостатической пролиферации периферических клонов Т-клеток, избежавших гибели в ходе проводимого лечения. Первый из этих механизмов приводит к заполнению ниши наивными Т-клетками с разнообразным репертуаром и способностью нормально функционировать. При гомеостатической пролиферации восстановление

isoform expressing cells. In addition to the percent increment the number of CD4+FOXP3+ T cells is also risen in patients with newly diagnosed MM. The level of FOXP3 expression by CD4+ T cells also reflects the effectiveness of antitumor therapy, considering normalization of CD4+FOXP3+ T cells number and percent in patients with disease remission. We also discuss the possible relationship between FOXP3 mRNA post-transcriptional modification, namely alternative splicing, with stable expression of FOXP3 in Tregs.

Key words

T cells, chemotherapy, lymphopenia, thymopoiesis, multiple myeloma, FOXP3, isoforms, human regulatory T cells.

Т-клеток начинается немедленно, но сопровождается поликлональной активацией и конверсией фенотипа наивных Т-клеток в Т-клетки памяти, что приводит к сужению Т-клеточного репертуара, появлению аутореактивных клонов и снижению пролиферативного потенциала [3]. Особенности гомеостаза Т-клеток при ММ определяются пожилым возрастом пациентов [4], наличием иммунного ответа на опухоль, в частности на экспрессируемые при ММ раково-тестикулярные антигены [5,6], и видом проводимой терапии [7]. Имеются данные о повышении количества регуляторных Т-клеток (Treg) в периферической крови и костном мозге пациентов с ММ [8,9] и даже выявлена связь с течением заболевания [10]. Ранее эти клетки были описаны как CD4+CD25^{hi} Т-лимфоциты [11,12]. Дальнейшие исследования установили их связь с транскрипционным фактором FOXP3, который являясь основным регулятором дифференцировки и функционирования Treg, стал лучшим молекулярным индикатором этих клеток [13]. У мышей дифференцировка Treg однозначно связана с экспрессией гена FOXP3, причем нокаут этого гена приводит к утрате этих клеток, а повышенная экспрессия вследствие трансфекции гена в Т-клетки – к приобретению ими супрессорной активности и фенотипа Treg [14,15]. У человека взаимосвязь между активностью FOXP3 и дифференцировкой Treg не столь однозначна: экспрессия FOXP3 является необходимым, но не достаточным условием дифференцировки этих

клеток [16,17]. Так, например, экспрессия FOXP3 определяется в недавно активированных наивных CD25-CD4+ Т-клетках, и соответственно не может расцениваться как абсолютный индикатор Treg у человека [18,19,20]. У мышей фактор FOXP3 существует в единственной форме, а у человека было описано, по крайней мере, четыре изоформы данной молекулы, одна из которых является полномасштабной, а три другие формируются в результате альтернативного сплайсинга с делецией отдельных экзонов – 2, 7 или одновременно 2 и 7 [21,22,23]. Экзон 2 кодирует домен молекулы FOXP3, ответственной за связывание транскрипционных факторов семейства ROR – α и γ . Одна из функций этих факторов – индукция дифференцировки Th17-клеток [24,25]. Экзон 7 кодирует последовательность, ответственную за димеризацию молекулы [23]. Главной особенностью молекул FOXP3 с делецией продуктов экзонов 2 и 7 в отличие от полномасштабной молекулы является их преимущественная локализация внутри ядра вследствие утери одной из двух последовательностей, отвечающих за экспорт из ядра (nuclear export sequences - NESs), расположенных в областях, кодируемых экзонами 1/2 и 6/7, соответственно. [26]. В этой же работе было показано, что при активации наивных CD25-CD4+ Т-клеток экспрессия FOXP3 определяется в основном в цитоплазме в отличие от преимущественной локализации внутри ядра у CD25+CD4+ Treg. С точки зрения функционирования FOXP3 в качестве транскрипционного активатора и супрессора [27], представляется весьма важным его нахождение внутри ядра.

Учитывая значимость Т-клеточного звена иммунной системы в контроле опухолевого роста и предотвращении развития инфекционных осложнений, мы исследовали процесс восстановления периферических Т-лимфоцитов у пациентов с впервые выявленной ММ после индукционного курса химиотерапии VCP [7] и оценили экспрессию изоформ Т регуляторных клеток у пациентов в разных фазах течения ММ.

Материалы и методы

В исследование процесса восстановления периферических Т-лимфоцитов у пациентов с впервые диагностированной ММ было включено 19 здоровых доноров с медианой возраста 46 лет (43,5-50) и 15 пациентов с впервые диагностированной ММ с медианой возраста 59 лет (53,5-67,5). Среди доноров было 9 мужчин и 10 женщин, среди пациентов – 6 мужчин и 9 женщин. У всех пациентов установлена 3 стадия ММ

по Durie и Salmon [28]. По изотипу опухолевого парапротеина – IgGk выявлен у 5, IgG λ у 3-х, IgAk у 3-х, IgMk у 1-го, B λ к у 1-го, B λ у 2-х пациентов. Тринадцать пациентов имели сохраненную и компенсированную почечную функцию, у двоих больных отмечалась 4 стадия хронической почечной недостаточности. У двух пациентов в дебюте заболевания имелись внутри-спинальные опухоли, компримирующие спинной мозг с развитием клиники нижнего парапареза. Все пациенты получили первый индукционный курс противоопухолевой терапии по протоколу VCP (велкейд 1,3 мг/м² в/в струйно в 1-й, 4-й, 8-й и 11 дни; циклофосфан 400 мг/м² в/в струйно с 1-го по 4-й дни; преднизолон 60мг/м² per os с 1-го по 4-й дни). Взятие образцов венозной крови у этой группы пациентов проводили 3 раза: до проведения курса, после окончания курса (через 4 дня) и перед вторым курсом ПХТ (через 30 дней после окончания первого курса). Забор периферической крови производился в пробирки с антикоагулянтом. Выделение мононуклеов периферической крови (МНПК) и последующий анализ проводился в течение последующих 6 часов. Подсчет клеток проводился по общепринятой методике. МНПК выделялись на градиенте концентрации. Клетки суспензировали в PBS с 1% BSA и 0,1% NaN₃, затем инкубировали с моноклональными антителами (МАТ) к поверхностным маркерам в том же буфере в течение 30 мин при 4°C. В случае определения внутриклеточных маркеров клетки отмывали и пермеабелизировали в течение 40 мин буфером фирмы «eBioscience» (США) («Foxp3 Fixation/Permeabilization Buffer») согласно методическим указаниям фирмы. Затем клетки отмывали и инкубировали в течение 30 мин при 4°C в темноте с МАТ против FOXP3 и Ki-67, снова отмывали и сразу без фиксации анализировали на проточном цитометре. Учитывая минорность фракции FOXP3+ клеток, для уменьшения ошибки анализировали не менее 105 клеток, попадающих в гейт лимфоцитов. Лазерную цитометрию клеток осуществляли на проточном цитометре BD FACSCanto™ II (Becton Dickinson) в стандартном режиме. Анализ данных проводили с помощью программного обеспечения BD FACSDiva и FCS Express.*

Использовали МАТ, меченные различными флуорохромами – FITC (флуоресцеин изотиоцианат), PE (фикоэритрин), PE-Cy7 (фикоэритрин-цианин7), APC (алофикоцианин), eFluor 660 и APC-eFluor 780 (алофикоцианин-eFluor 780). Использовали следующие комбинации МАТ

фирмы «eBioscience» (США) (препараты для изотипических контролей той же фирмы):

1. CD3-APC+CD4-FITC+CD8-APC-eFluor 780+CD45RA-PE-Cy7 + CD62L-PE;

2. CD3-APC+CD4-PE-Cy7+CD8-APC-eFluor 780+ki-67-FITC;

3. CD3-PE-Cy7+CD4-FITC+FOXP3-eFluor 660

Наивные Т-клетки (Tnaive) имеют фенотип CD45RA+62L+, центральные Т-клетки памяти (Tcm) – CD45RA-62L+, эффекторные Т-клетки памяти (Tem) – CD45RA-62L-, терминально-дифференцированные эффекторные или вновь экспрессирующие CD45RA Т-клетки (Temra) – CD45RA+62L- [9].

Уровень TREC (T-cell receptor excision circles - Т-рецепторные эксцизионные кольца) определяли методом ПЦР «в реальном времени». Выделение ДНК проводили из 1×10^6 мононуклеаров периферической крови, использовали набор «Проба НК» («ДНК-Технология»). Объем полученной ДНК составил 25 мкл. Концентрацию ДНК определяли спектрофотометрически, соотношение A260/280 составляло 1,6-2,0. Для постановки ПЦР применяли набор реагентов - TaqMan Universal PCR Master Mix Reagents Kit («Applied Biosystems»). Для определения TREC использовали следующие праймеры: прямой 5'-CGT GAG AAC GGT GAA TGA AGA GCA GAC A-3', обратный 5'-CAT CCC TTT CAA CCA TGC TGA CAC CTC T-3', а также флуоресцентно-меченный олигонуклеотид (зонд) 5'-FAM-TTT TTG TAA AGG TGC CCA CTC CTG TGC ACG GTG A-MGB-3' [10]. Для определения количества геномной ДНК применяли β -актин («Applied Biosystems»). Амплификацию проводили на приборе «7300 Applied Biosystems Real-time PCR System». Реакцию ставили в объеме 25 мкл по следующей программе: 1 цикл - 50°C 2 мин, 95°C 10 мин; 50 циклов - 94°C 30 сек, 60°C 30 сек.

Расчет количества копий TREC проводили с использованием стандартной кривой, построенной по разведениям плазмиды, синтезированной путем клонирования ДНК TREC человека в вектор pJet1.2/Blunt («Fermentas»). Число копий TREC рассчитывалось автоматически с помощью программного обеспечения SDS («Applied Biosystems») при экстраполяции данных на стандартную кривую, полученную по разведениям плазмиды с известной концентрацией ДНК TREC. Число копий TREC пересчитывали на 1 л крови и 1 тыс. CD3+ клеток.

В исследовании показателей Treg и их изоформ в различных фазах течения ММ приняли участие 37 пациентов с 3 стадией множественной

миеломы (ММ) в возрасте от 46 до 75 лет (медиана 58 лет) и 15 здоровых доноров в качестве контрольной группы (возраст от 33 до 55 лет, медиана 46 лет). Основываясь на критериях оценки противоопухолевого ответа по Durei [29] пациенты были разделены на 3 группы: первичные пациенты (17 человек), пациенты в ремиссии (7 человек) и резистентные/рецидивные пациенты (13 человек). Выделение мононуклеаров периферической крови и подсчет клеток проводили по вышеописанной методике *. Использовали следующие комбинации МАТ фирмы «eBioscience» (США) (препараты для изотипических контролей той же фирмы):

1. CD3-PE-Cy7 + CD4-FITC + CD25-PerCP-eFluor710 + FOXP3(PCN101)-APC.

2. CD3-PE-Cy7 + CD4-FITC + FOXP3(PCN101)-APC + FOXP3(150D/E4)-PE.

МАТ клона PCN101 специфичны к продукту экзона 1 молекулы FOXP3 и выявляет все изоформы, а 150D/E4 – к продукту экзона 2 молекулы FOXP3 (рис. 1). При сочетании данных МАТ их одновременное связывание с клеткой указывает на экспрессию целой молекулы FOXP3, а при связывании только МАТ PCN101 – на экспрессию изоформы FOXP3 с делецией продукта экзона 2.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием методов непараметрического анализа. Исследованные количественные показатели представляли в виде Me (L-H), где Me – медиана, L – нижний квартиль, H – верхний квартиль. Для сопоставления двух групп по количественным признакам использовали U-критерий Манна-Уитни. Различие групп полагали статистически значимым при $P < 0,05$. Обработку проводили с помощью программы Microsoft Excel.

Результаты исследования и обсуждение

При исследовании периферической крови пациентов с впервые диагностированной ММ был выявлен лимфоцитоз, полностью обусловленный ростом числа Т-клеток (табл. 1). Основной вклад в рост числа CD3+ лимфоцитов вносили клетки с фенотипом CD3+8+62L-45RA+ – терминально-дифференцированных эффекторных Т-клеток (рис. 2) при одновременном статистически значимом увеличении их процента и снижении процента наивных CD8+ Т-клеток – CD3+8+62L+45RA+ (табл. 3). Также был отмечен достоверный рост числа и процента CD3+4+FOXP3+ клеток (табл. 4). В целом эта картина соответствовала описанному ранее активному Т-клеточному иммунному ответу на раково-тестикулярные антигены, экс-



Рис. 1. Схема молекулы FOXP3, локализации в нем доменов и сайтов связывания различных моноклональных антител (МАТ) к молекуле FOXP3 человека [24 и сайт <http://www.ebioscience.com/>]

Под изображением участков молекулы FOXP3 приведены характеристики доменов и названия клонов МАТ, с которыми они связываются. Сокращения: PR (Prolin-rich) – домен, богатый пролином, ROR (Retimoid-like orphan receptor) – семейство транскрипционных факторов, HDAC- деацетилаза гистонов, ZF (Zink finger) – «цинковые пальцы» (обозначение домена), LZ (Leucin zipper) – «лейциновая застежка» (обозначение домена, ответственного за димеризацию), FOX (Forkhead box – «вилочатая голова») - обозначение домена, ответственного за основную функцию FOXP3 как транскрипционного фактора Тreg.

Таблица 1. Изменение числа лимфоцитов и Т-клеток периферической крови доноров и первичных пациентов с множественной миеломой до и после лечения (*10⁹/л)

		Доноры		До лечения		По завершению лечения		После восстановления	
Лимфоциты	H	1,67*	1,91	2,33 [†]	2,86	0,89* [†]	1,46	1,68	1,91
	L		1,42		1,79		0,81		1,41
CD3+	H	1,16*	1,36	1,74 [†]	2,01	0,63* [†]	0,89	1,11	1,40
	L		0,98		1,06		0,52		0,92
CD3+4+	H	0,71	0,88	0,88	1,26	0,49* [†]	0,56	0,73	0,85
	L		0,67		0,7		0,35		0,59
CD3+8+	H	0,37	0,46	0,57	1,03	0,13* [†]	0,19	0,33	0,44
	L		0,26		0,22		0,11		0,13

*p<0,05 по отношению к первичным пациентам

[†]p<0,05 по отношению к донорам

прессируемые при ММ [30,31]. Эта точка в нашем исследовании получила название «первичные».

Через 4 дня после проведения курса химиотерапии производился повторный забор крови у этих же пациентов. Эта точка в дальнейшем на графиках обозначалась как «лимфопения». Еще через 30 дней по окончании курса лечения при повторной госпитализации проводился последний анализ МНПК, в точке, обозначенной на графиках как «восстановление». На 4 день после окончания индукционного курса VCP было отмечено развитие лимфопении (табл. 1) с достоверным снижением числа всех субпопу-

ляций Т-клеток, причем не только относительно первичных показателей, но также и относительно показателей доноров. Исключение составили регуляторные Т-клетки - клетки с фенотипом CD3+4+FOXP3+ (табл. 4), часть из которых могла быть представлена активированными эффекторными Т-клетками с транзитной экспрессией FOXP3 [32,33]. Снижение числа клеток данного фенотипа было достоверным только по отношению к первичным пациентам, то есть собственным показателям до проведения лечения. Более подробный анализ экспрессии FOXP3 будет представлен позднее. При восстановлении на 30

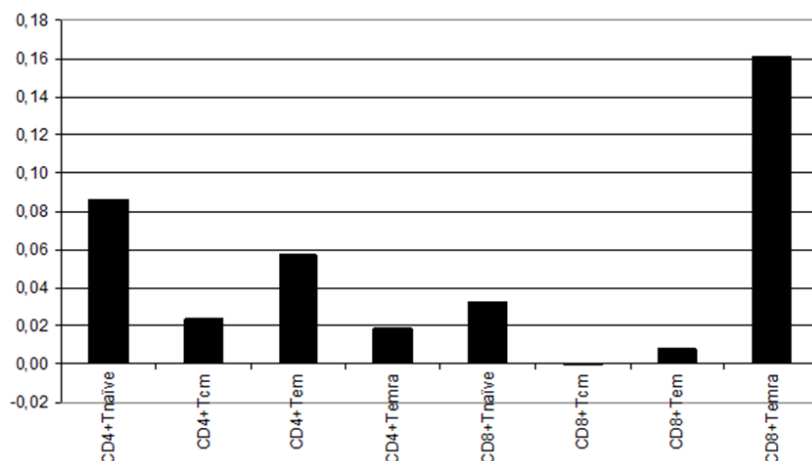


Рис.2. Количественный вклад субпопуляций Т-клеток в общий прирост Т-клеток по сравнению с донорами у первичных пациентов с ММ

По оси абсцисс – обозначение субпопуляции, по оси ординат – разница в числе клеток соответствующей субпопуляции в млн/л у первичных пациентов с ММ и здоровых доноров.

Таблица 2. Возрастная структура CD4+ Т-лимфоцитов периферической крови, определяемая по экспрессии CD62L и CD45RA, в процентах у доноров и первичных пациентов с множественной миеломой до и после лечения

		Доноры		До лечения		По завершению лечения		После восстановления	
CD62L+45RA+	H	31,2	47,1	28,3	39,9	36,4	40,1	39,3	43,6
	L		23,9		22,1		23,2		26,5
CD62L+45RA-	H	42,5	48,3	38,0	48,5	38,5	43,0	37,7	42,0
	L		38,7		28,3		29,4		32,6
CD62L-45RA-	H	20,8	25,2	26,0	30,1	18,3	22,7	20,8	30,4
	L		13,5		15,6		16,5		15,0
CD62L-45RA+	H	1,2	2,4	3,0 [†]	6,8	2,0	3,4	1,7	4,4
	L		0,7		1,9		1,0		1,0

[†]p<0,05 по отношению к донорам.

Таблица 3. Возрастная структура CD8+ Т-лимфоцитов периферической крови, определяемая по экспрессии CD62L и CD45RA, в процентах у доноров и первичных пациентов с множественной миеломой до и после лечения

		Доноры		До лечения		По завершению лечения		После восстановления	
CD62L+45RA+	H	37,4	45,5	20,2 [†]	31,5	19,8 [†]	11,4	15,2 [†]	24,3
	L		25,7		13,4		6,3		11,8
CD62L+45RA-	H	9,9	15,3	7,5	9,9	7,5	13,5	7,1	9,2
	L		6,4		5,6		6,1		5,5
CD62L-45RA-	H	15,7	18,7	15,3	21,5	18,1	34,4	17,5	26,6
	L		13,7		7,7		13,3		14,1
CD62L-45RA+	H	35,4	55,1	49,9 [†]	62,4	45,7	50,1	55,6	62,7
	L		18,9		41,5		36,6		38,5

[†]p<0,05 по отношению к донорам

сутки число всех субпопуляций Т-клеток приближалось к показателям доноров, что особенно наглядно представлено на графиках, нормированных по числу клеток соответствующих субпопуляций у доноров (рис. 3 и 4).

Исследуя возрастную структуру Т-лимфоцитов, основываясь на литературных данных [34] и наших исследованиях по восстановлению Т-клеточного звена иммунной системы у сублетально облученных мышей [35],

мы предполагали, что обнаружим конверсию фенотипа наивных Т-клеток в Т-клетки памяти при восстановлении после проведенного курса химиотерапии. Однако процентное соотношение всех возрастных субпопуляций Т-клеток не претерпело никаких достоверных изменений в результате проведенного лечения и при последующем восстановлении численности клеток (Табл. 2 и 3). Тем не менее, хотелось бы еще раз обратить внимание на отмеченную нами ранее

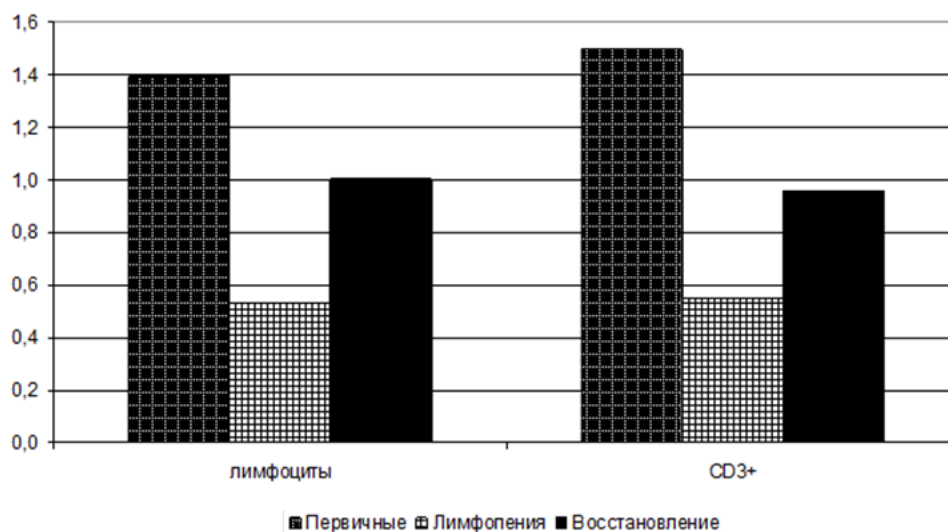


Рис. 3. Изменение числа лимфоцитов и Т-клеток периферической крови пациентов с ММ до и после лечения, нормированное по показателям здоровых доноров

По оси абсцисс – исследуемая популяция, по оси ординат – относительные показатели.

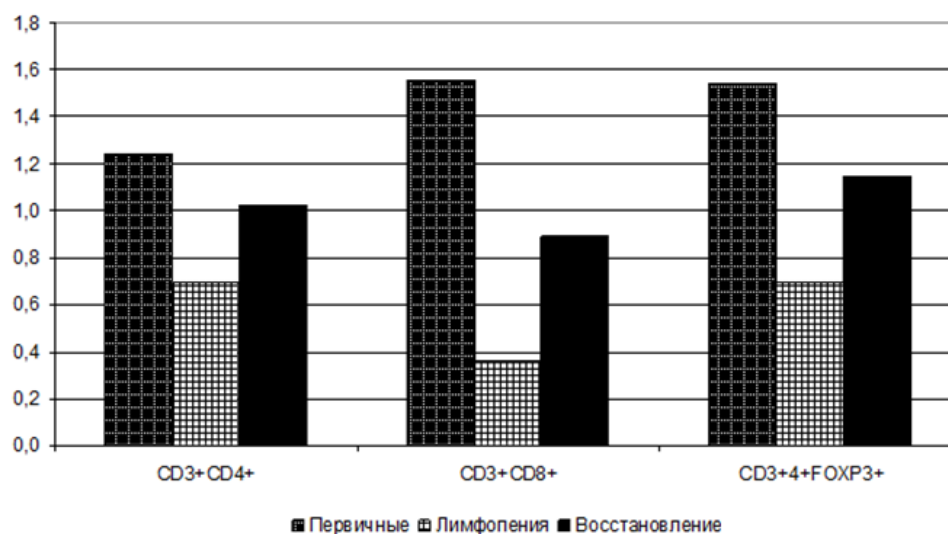


Рис. 4. Изменение числа основных субпопуляций Т-клеток периферической крови пациентов с ММ до и после лечения, нормированное по показателям здоровых доноров

По оси абсцисс – исследуемая субпопуляция, по оси ординат – относительные показатели

особенность возрастной структуры CD3+8+ лимфоцитов, которая характеризуется уменьшением доли наивных и накоплением терминально-дифференцированных эффекторных клеток, не экспрессирующих CD62L, но при этом восстанавливающих экспрессию CD45RA. Это соотношение даже несколько изменялось в пользу CD3+8+62L-45RA+ в ходе курса проводимой химиотерапии, что являлось свидетельством сохранения иммунного ответа на клетки опухоли. Хотя стоит отметить, что, не смотря на увеличение доли этих клеток, различие с донорами становилось статистически недостоверным, скорее всего, в силу большого разброса данных, что могло быть обусловлено разнородностью исследованной группы в контексте ответа на проводимое лечение. Среди CD4+ Т-лимфоцитов также отмечалось статистически значимое увеличение процента клеток с фенотипом 62L-45RA+ у первичных пациентов, в ходе лечения процент этих клеток уменьшался, но не достигал уровня здоровых доноров, что в целом не противоречит сделанному ранее предположению о сохранении Т-клеточного противоопухолевого ответа.

При исследовании CD4+FOXP3+ Т-клеток было установлено (рис. 5 и табл. 4), что их изначально высокое содержание у первичных пациентов с ММ снижалось по окончании курса химиотерапии даже по отношению к здоровым донорам, но при этом отличие от показателей доноров не являлось достоверным, и уже в точке восстановления превосходило показатели до-

норов в 1,2 раза. Одновременно с этим процент FOXP3+ клеток среди CD3+4+ лимфоцитов значимо не менялся на всем протяжении процесса наблюдения за пациентами с ММ, оставаясь в 1,3-1,5 раз выше уровня здоровых доноров. Как уже упоминалось ранее, клетки с фенотипом CD3+4+FOXP3+, представляя в основном фракцию регуляторных Т-клеток, также могли быть активированными эффекторными Т-клетками с транзитной экспрессией FOXP3. И даже, рассматривая фракцию регуляторных Т-клеток с учетом быстрой динамики (порядка 1 месяца) восстановления численности FOXP3+ клеток после проведенного курса химиотерапии, можно с большой долей уверенности говорить об адаптивной природе их происхождения, то есть об индуцированных регуляторных Т-клетках. Таким образом, данные по экспрессии FOXP3, как и ранее описанное увеличение числа терминально-дифференцированных эффекторных Т-клеток, говорят о сохранении активного иммунного ответа у пациентов с первичной ММ на всем протяжении периода наблюдения.

Обнаружив достаточно полное восстановление Т-клеточного звена иммунной системы после проведенного курса химиотерапии VCP, мы оценили вклад тимопоэза и гомеостатической пролиферации в восстановление численности Т-клеток. При исследовании пролиферативной активности по экспрессии внутриклеточного маркера пролиферации Ki-67 было обнаружено, что доля пролиферирующих Т-клеток в 1,3-1,9

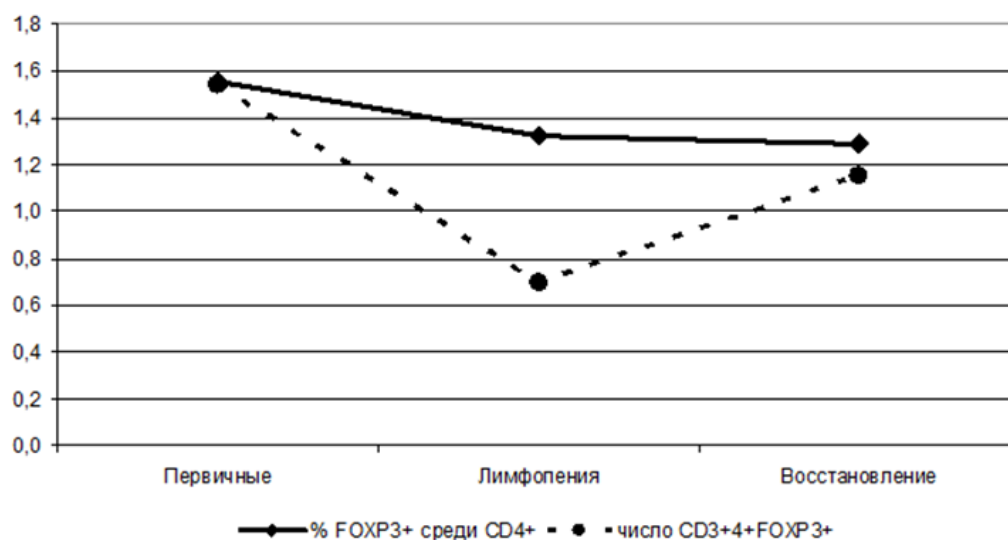


Рис. 5. Изменения числа и процента FOXP3+ клеток в CD4+ субпопуляции Т-клеток периферической крови пациентов с ММ до и после лечения, нормированные по показателям здоровых доноров

По оси абсцисс — точка исследования, по оси ординат — относительные показатели

раза превышала показатели доноров во всех точках исследования. До начала лечения увеличение процента Ki-67+ клеток было статистически значимым как внутри CD3+4+, так и внутри CD3+8+ субпопуляций (рис. 6). На фоне развития лимфопении отмечался выраженный (в 2,6 раза) рост процента пролиферирующих CD8+ Т-клеток, однако этот рост не был статистически достоверным по отношению к показателям, предшествующим лечению. Доля пролиферирующих клеток в остальных субпопуляциях Т-лимфоцитов, оставаясь выше показателей доноров, значимо не изменялась в процессе лечения пациентов с ММ.

Вклад тимуса в восстановление Т-клеток оценивался по уровню TREC в лимфоцитах. TREC образуются при перестройке генов Т-клеточного рецептора и обнаруживаются в виде кольцевых молекул ДНК [36]. Вырезанное кольцо не реплицируется и при делении Т-клетки остается только в одной дочерней клетке, с каждым последующим делением число TREC на общее число дочерних Т-клеток уменьшается в геометрической прогрессии. Таким образом, уменьшение числа TREC по отношению к числу Т-клеток отражает количество делений, которому подверглась популяция, а при одинаковом уровне пролиферации - степень ее зрелости. На рис. 7 представлены данные по количеству TREC в периферической крови и содержанию TREC на тысячу Т-клеток,

нормированные по показателям доноров. Было отмечено значимое снижение числа TREC после курса химиотерапии на 4 сутки. При восстановлении число TREC увеличивалось, но не достигало уровня первичных пациентов. Показатель же содержания TREC на тысячу Т-клеток был достоверно ниже в сравнении с донорами на все сроки до и после химиотерапии (табл. 5). Выявленное повышение уровня TREC без увеличения доли TREC-содержащих Т-клеток свидетельствовало о преобладании вклада пролиферации в восстановление периферических Т-клеток. Однако ввиду высокого уровня пролиферации у первичных пациентов до начала лечения мы не смогли определить природу ее происхождения - гомеостатическую или индуцированную иммунным ответом на опухолевые антигены.

Изначально же сниженный показатель содержания TREC на тысячу Т-клеток у первичных пациентов с ММ (3,35 копий) по сравнению со здоровыми донорами (4,53 копий), объяснялся повышенной пролиферативной активностью периферических Т-клеток и инволюцией тимуса у пациентов, обусловленной самим заболеванием и возрастом пациентов (медиана 59 лет у больных и 46 лет у доноров).

Следующим этапом нашей работы было исследование уровня Treg при различных формах течения ММ, а также определение экспрессии в

Таблица 4. Изменение числа ($\cdot 10^9/л$) и процента Treg периферической крови доноров и первичных пациентов с множественной миеломой до и после лечения

		Доноры		До лечения		По завершению лечения		После восстановления	
CD3+4+FOXP3+ число клеток	H	0,026	0,048	0,040	0,059	0,018*	0,023	0,030	0,034
	L		0,018		0,026		0,011		0,020
FOXP3+/CD3+4+ процент клеток	H	3,0*	4,5	4,6 [†]	6,3	3,9	5,4	3,8	5,8
	L		2,4		3,6		2,9		3,0

* $p < 0,05$ по отношению к первичным пациентам

[†] $p < 0,05$ по отношению к донорам

Таблица 5. Изменение числа sjTREC ($\cdot 10^6/л$) в МНПК и их содержания в Т-клетках (на тысячу клеток) доноров и первичных пациентов с множественной миеломой до и после лечения

		Доноры		До лечения		По завершению лечения		После восстановления	
число sjTRECs	H	5,66	11,46	4,85	8,51	1,64* [†]	3,46	3,59 [†]	4,36
	L		3,68		3,37		1,06		1,97
sjTRECs/ тыс. CD3+ клеток	H	4,53	9,09	3,35 [†]	4,85	2,58 [†]	4,03	2,7 [†]	3,58
	L		3,20		2,26		1,83		1,8

* $p < 0,05$ по отношению к первичным пациентам

[†] $p < 0,05$ по отношению к донорам

этих клетках изоформ FOXP3, содержащих продукт экзона 2 (FL-FOXP3 – full length), и с делецией экзона 2 (FOXP3Δ2). Оценка образцов крови пациентов с ММ показала достоверное увеличение числа лимфоцитов у первичных пациентов до $2,05 \cdot 10^9/\text{л}$ против $1,32 \cdot 10^9/\text{л}$ у здоровых доноров, сопровождающееся значимым увеличением числа CD4+ Т-клеток до $0,8 \cdot 10^9/\text{л}$ против $0,56 \cdot 10^9/\text{л}$ у доноров (Табл. 6). Достоверных отличий этих показателей у резистентных больных и пациентов в ремиссии выявлено не было.

При определении Treg по экспрессии FOXP3 и CD25 (табл. 6 и рис. 8) у первичных пациентов с ММ было обнаружено достоверное увеличение числа как CD25+ (в 2,76 раза), так и CD25- (в 3,78 раза) субпопуляций CD4+FOXP3+ Т-клеток по сравнению с контрольной группой. У резистентных пациентов, не смотря на отсутствие Т-лимфоцитоза, абсолютное число лимфоцитов с фенотипом CD3+4+25-FOXP3+ было также повышено в 1,82 раза по сравнению с донорами, но увеличение не являлось статистически до-

Таблица 6. Изменение численности исследованных субпопуляций лимфоцитов из периферической крови доноров и пациентов с различным течением множественной миеломы (млн/л)

Группа		лимфоциты		CD3+4+		CD3+4+25+FOXP3+		CD3+4+25-FOXP3+	
Доноры	Н	1323,0	1518,0	557,8	660,7	18,6	22,9	5,1	6,3
	Контроль	L	1224,0	1224,0	485,7	485,7	15,9	15,9	2,3
Первичные	Н	2047,8*	2776,1	795,5*	1095,6	51,4*	58,7	19,3*	29,0
	L		1935,6		638,1		25,0		11,5
Ремиссия	Н	1260,0	1505,5	485,8	657,7	19,8	25,8	6,0	9,0
	L		1072,0		373,3		10,6		3,3
Резистентные	Н	1368,3	1756,8	446,5	696,9	16,7	28,6	9,3	16,2
	L		787,5		199,8		8,9		5,5

* p<0,05

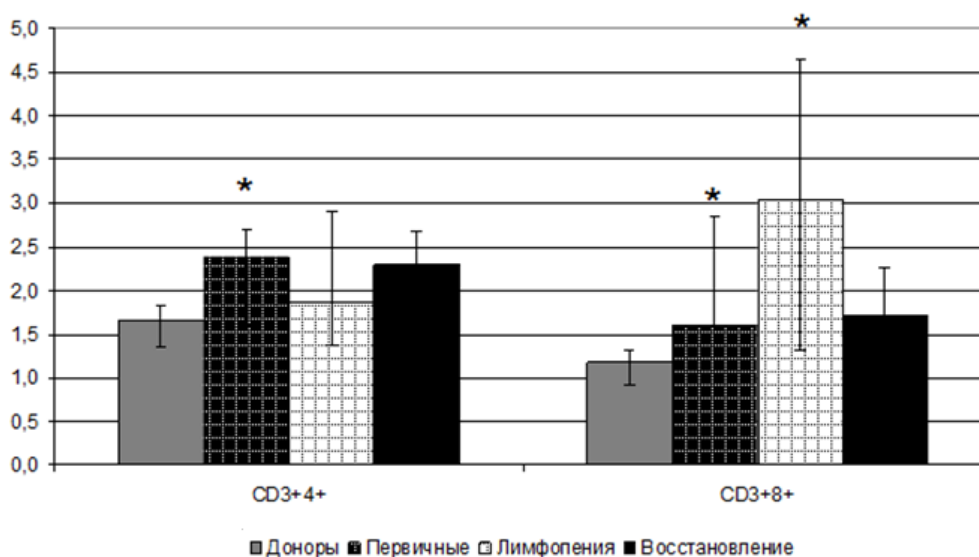


Рис. 6. Изменение процента пролиферирующих (Ki-67+) Т-клеток периферической крови пациентов с ММ до и после лечения в сравнение с показателями здоровых доноров

По оси абсцисс – исследуемая субпопуляция, по оси ординат – процент Ki-67+ клеток внутри соответствующей субпопуляции (Me (L-H)).

*Достоверные отличия относительно контроля (p<0,05).

стоверным. Пациенты, находящиеся в ремиссии, демонстрировали абсолютное число Treg идентичное показателям здоровых людей.

При анализе относительных показателей (рис. 9) было выявлено статистически значимое по сравнению с донорами повышение процента CD25+FOXP3+ и CD25-FOXP3+-клеток среди CD3+4+ лимфоцитов у первичных пациентов с ММ (5% и 2,5% соответственно). Таким образом, рост абсолютного числа FOXP3+-клеток у этой группы был обусловлен не только Т-лимфоцитозом, но и увеличением относитель-

ного числа этих клеток внутри субпопуляции CD4+ Т-лимфоцитов. Данные показатели у пациентов с ремиссией заболевания и здоровых людей практически совпадали – 3,5% CD25+FOXP3+- и около 1% CD25-FOXP3+-клеток от общего числа CD3+4+ лимфоцитов. Весьма интересными оказались относительные показатели экспрессии FOXP3 в CD3+4+ лимфоцитах у пациентов с ММ резистентных к проводимому лечению, они были повышены, причем увеличение процента CD25-FOXP3+-клеток от общего числа CD3+4+ лимфоцитов было статистически достоверным и равня-

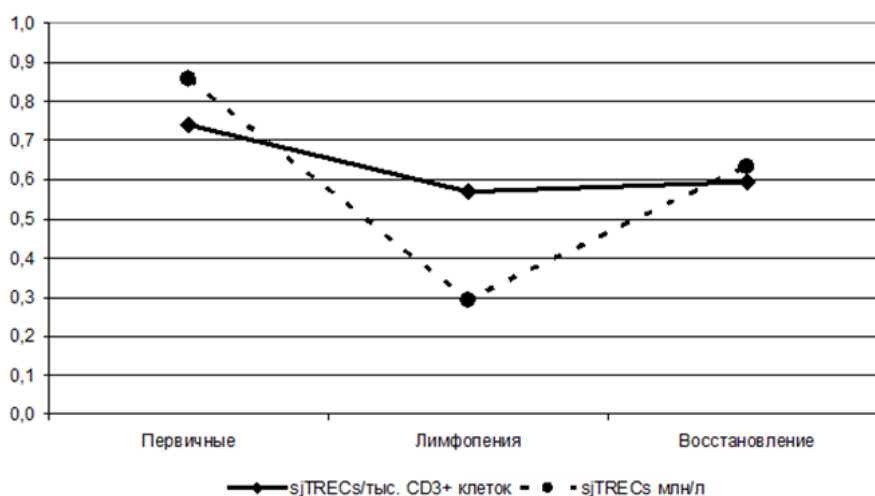


Рис. 7. Изменения числа sjTRECs и содержания sjTRECs в Т-клетках периферической крови пациентов с ММ до и после лечения, нормированные по показателям здоровых доноров

По оси абсцисс – точка исследования, по оси ординат – относительные показатели.

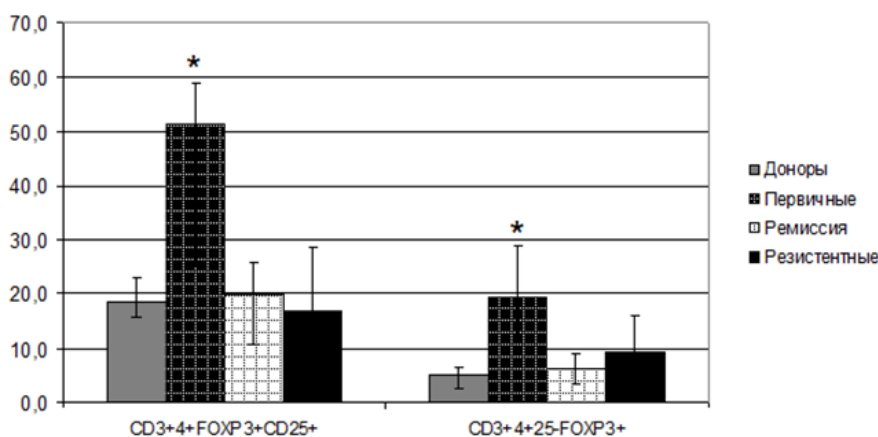


Рис.8. Изменение числа CD4+25+FOXP3+ и CD4+25-FOXP3+ клеток при различных формах течения множественной миеломы

По оси абсцисс – фенотипическая характеристика исследуемых субпопуляций. По оси ординат – число клеток в млн/л (Me (L-H)). *Достоверные отличия относительно контроля (p<0,05).

лось соответствующему показателю у первичных пациентов (2,5%). Расценивая CD4+25+FOXP3+ Т-лимфоциты, как субпопуляцию, состоящую из Treg и активированных наивных CD4+ Т-клеток, а CD4+25-FOXP3+ Т-лимфоциты, как уже прошедшую через активацию фракцию не регуляторных CD4+ Т-клеток с остаточной экспрессией FOXP3, по результатам анализа при одновременном определении экспрессии CD25 и FOXP3 можно косвенно судить об активности иммунного ответа при ММ или на саму опухоль, или сопутствующую ей инфекцию, а также об эффектив-

ности проводимой терапии, что особенно важно при разработке новых схем лечения [7]. Оценка экспрессии FL-FOXP3 и FOXP3Δ2 изоформ CD4+ Т-лимфоцитами позволила несколько по-иному взглянуть на роль FOXP3 при ММ. У первичных пациентов с ММ было увеличено абсолютное количество клеток, экспрессирующих обе изоформы молекулы FOXP3 по сравнению с донорами, CD3+4+FL-FOXP3+-клеток – в 2 раза, CD3+4+FOXP3Δ2+-клеток – в 2,4 раза (рис. 10). Но только увеличение числа клеток, экспрессирующих FOXP3Δ2, было статистически значимым.

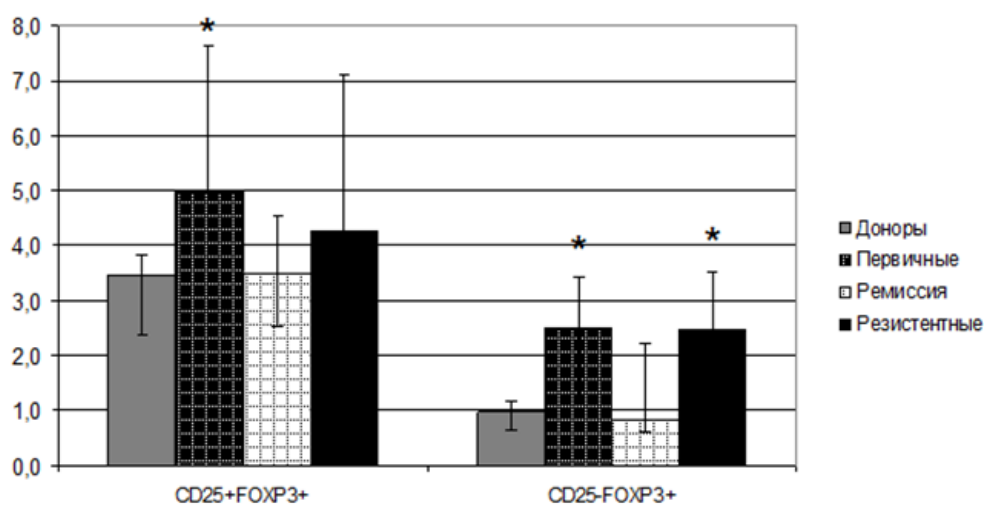


Рис.9. Изменение процента CD25+FOXP3+ и CD25-FOXP3+ клеток среди CD4+ Т-лимфоцитов при различных формах течения множественной миеломы

По оси абсцисс – фенотипическая характеристика исследуемых субпопуляций. По оси ординат – процент клеток исследуемой субпопуляции относительно CD4+ Т-клеток (Me (L-H)). *Достоверные отличия относительно контроля (p<0,05).

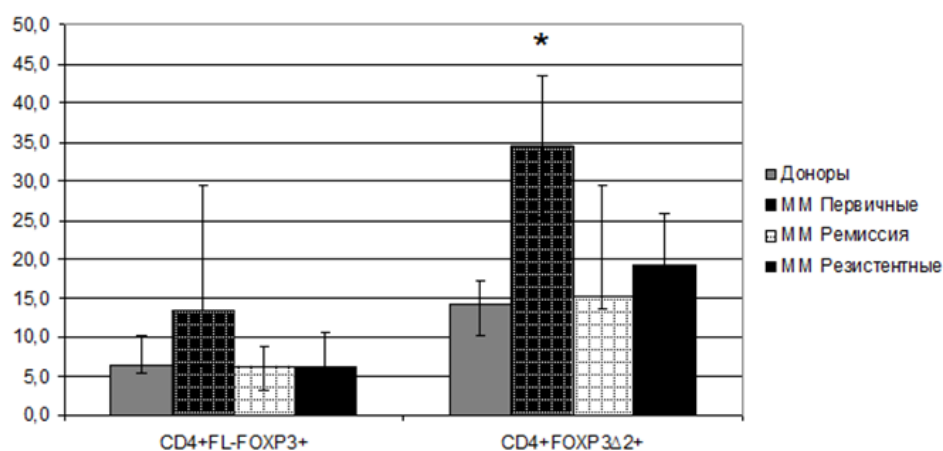


Рис. 10. Изменение числа регуляторных Т-клеток, экспрессирующих FL-FOXP3 и FOXP3Δ2 при различных формах течения множественной миеломы

По оси абсцисс – фенотипическая характеристика исследуемых субпопуляций. По оси ординат – число клеток в млн/л (Me (L-H)). *Достоверные отличия относительно контроля (p<0,05).

Достоверных отличий в количестве клеток, экспрессирующих как FL-FOXP3, так и FOXP3Δ2, пациентами в ремиссии и резистентными пациентами по сравнению с донорами отмечено не было.

Анализируя относительные показатели экспрессии изоформ FOXP3 при различных формах течения ММ, было выявлено (рис. 11), что процент CD4+ Т-клеток, экспрессирующих FOXP3Δ2, был повышен во всех группах пациентов с ММ по сравнению со здоровыми людьми, приближаясь к 5% от всех CD3+4+-клеток, и примерно вдвое превосходя показатели доноров. Однако, в группе пациентов с ремиссией заболевания это повышение не являлось статистически достоверным, что, возможно, обусловлено низкой выборкой (всего 7 пациентов) и большим разбросом полученных данных. Повышение же процента FL-FOXP3+-клеток среди CD3+4+-клеток отмечалось только у первичных и резистентных пациентов и не являлось достоверным. Сопоставляя литературные данные о преимущественной локализации коротких изоформ FOXP3 внутри ядра [26], об экспрессии FOXP3 активированных не регуляторных Т-клеток в основном в цитоплазме [26] и достаточно быстрой элиминации этими клетками транскрипционного фактора по окончании активации, а также данных, полученных нами ранее, об увеличении относительной экспрессии FOXP3Δ2 при созревании Treg в тимусе [37], можно предположить, что у

человека стабильная экспрессия FOXP3 связана с пост-транскрипционной модификацией мРНК FOXP3, а именно альтернативным сплайсингом, и синтезом молекулы, не содержащей продукт экзона 2. Соответственно, определение именно FOXP3Δ2 изоформы в наибольшей степени будет отражать связь экспрессии FOXP3 с Treg. Однако это предположение требует дальнейшего экспериментального подтверждения в опытах по определению супрессорной активности субпопуляций с различной экспрессией изоформ молекулы FOXP3.

Заключение

Проведенное исследование показало, что у пациентов с впервые выявленной ММ наблюдается Т-лимфоцитоз, обусловленный активным противоопухолевым ответом. После индукционного курса химиотерапии по протоколу VCP развивается Т-лимфопения с последующим восстановлением всех субпопуляций Т-клеток до уровня здоровых доноров и сохранением активного противоопухолевого ответа. В восстановлении Т-клеточного звена иммунной системы принимают участие как центральные органы через тимопоэз, так и периферический отдел иммунной системы путем усиления пролиферативной активности Т-клеток с преобладанием вклада последнего. Экспрессия молекулы FOXP3 CD4+ Т-лимфоцитами играет важную роль в патогенезе ММ. Так, у первичных и резистентных

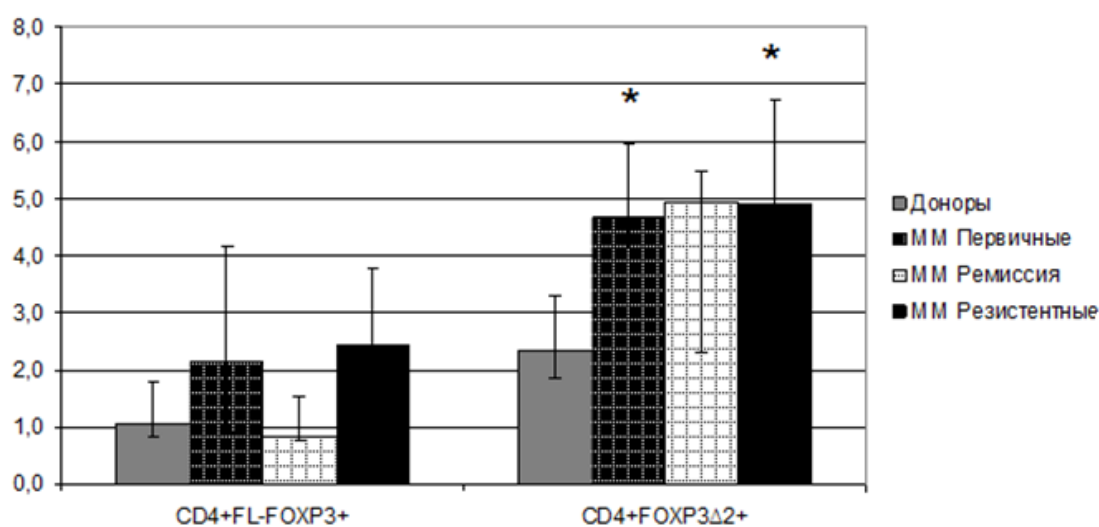


Рис. 11. Процент регуляторных Т-клеток, экспрессирующих FL-FOXP3 и FOXP3Δ2 при различных формах течения множественной миеломы

По оси абсцисс – фенотипическая характеристика исследуемых субпопуляций. По оси ординат – процент клеток исследуемой субпопуляции относительно CD4+ Т-клеток (Me (L-H)). *Достоверные отличия относительно контроля (p<0,05).

пациентов с ММ отмечается увеличение процента CD4+ Т-клеток, экспрессирующих FOXP3. Основной вклад в увеличение этого процента вносят клетки, экспрессирующие короткую FOXP3Δ2 изоформу. У первичных пациентов помимо увеличения процента, увеличивается и абсолютное количество всех CD4+FOXP3+ Т-клеток. Уровень экспрессии FOXP3 CD4+

Т-клетками также отражает эффективность проводимой противоопухолевой терапии у пациентов с ММ, ввиду нормализации и числа, и процента CD4+FOXP3+ Т-лимфоцитов, а соответственно и Treg, у пациентов с ремиссией заболевания. Это позволяет рассматривать Treg как диагностический показатель активности опухолевого процесса при ММ.

Литература

1. Hakim F.T., Cepeda R., Kaimei S. et al. Constraints on CD4 recovery postchemotherapy in adults: thymic insufficiency and apoptotic decline of expanded peripheral CD4 cells. *Blood*. 1997; 90: 3789–3798.
2. Small T.N., Papadopoulos E.B., Boulad F. et al. Comparison of immune reconstitution after unrelated and related T-cell-depleted bone marrow transplantation: effect of patient age and donor leukocyte infusions. *Blood*. 1999; 93: 467–80.
3. Ярилин А.А. Гомеостатические процессы в иммунной системе. Контроль численности лимфоцитов. *Иммунология*. 2004; 25(5): 312-320.
4. Ярилин А.А. Возрастные изменения тимуса и Т-лимфоцитов. *Иммунология*. 2003; 24(2): 117-128.
5. van Baren N., Brasseur F., Godelaine D. et al. Genes encoding tumor-specific antigens are expressed in human myeloma cells. *Blood*. 1999; 94: 1156-1164.
6. Jungbluth A. A., Ely S., DiLiberto M. et al. The cancer-testis antigens CT7 (MAGE-C1) and MAGE-A3/6 are commonly expressed in multiple myeloma and correlate with plasma-cell proliferation. *Blood*. 2005; 106: 167-174.
7. Голенков А.К., Барышников А.Ю., Караулов А.В., Митина Т.А. Лечение множественной миеломы. М.: Москва; 2008.
8. Atanackovic D., Cao Y., Luetkens T. et al. CD4+CD25+FOXP3+ T regulatory cells reconstitute and accumulate in the bone marrow of patients with multiple myeloma following allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica*. 2008; 93: 423–430.
9. Prabhala R.H., Neri P.J., Bae E. et al. Dysfunctional T regulatory cells in multiple myeloma. *Blood*. 2006; 107: 301–304.
10. Muthu Raja K.R., Rihova L., Zahradova L. et al. Increased T regulatory cells are associated with adverse clinical features and predict progression in multiple myeloma. *PLoS One*. 2012; 7: e47077.
11. Ярилин А.А., Донецкова А.Д. Естественные регуляторные Т-клетки и фактор FOXP3. *Иммунология*. 2006; 37(3): 176-188.
12. Sakaguchi S., Sakaguchi N., Asano M. et al. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor α-chains (CD25). *J. Immunol*. 1995; 155: 1151-1164.
13. Sakaguchi S., Yamaguchi T., Nomura T. and Ono M., Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell*. 2008; 133: 775–787.
14. Fontenot J.D., Gavin M.A., Rudensky A.Y. Foxp3 programs the development and function of CD4+ CD25+ regulatory T cells. *Nat. Immunol*. 2003; 4: 330–336.
15. Hori S., Nomura T., Sakaguchi S.. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*. 2003; 299: 1057–1061.
16. Allan S.E., Passerini L., Bacchetta R. et al. The role of 2 FOXP3 isoforms in the generation of human CD4+ Tregs. *J. Clin. Invest*. 2005; 115: 3276–3284.
17. Ziegler S.F. FOXP3: of mice and men. *Annu. Rev. Immunol*. 2006; 24: 209–226.
18. Allan S. E., Crome S. Q., Crellin N. K. et al., Activation-induced FOXP3 in human T effector cells does not suppress proliferation or cytokine production. *Int. Immunol*. 2007; 19: 345–354.
19. Wang J., Ioan-Facsinay A., vander Voort E.I., Huizinga T.W. and Toes R.E., Transient expression of FOXP3 in human activated nonregulatory CD4+T cells. *Eur. J. Immunol*. 2007; 37: 129–138.
20. Walker M.R., Kasprowicz D.J., Gersuk V.H. et al. Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4+CD25- T cells. *J. Clin. Invest*. 2003; 112: 1437–1443.
21. Smith E.L., Finney H.M., Nesbitt A.M., Ramsdell F., Robinson M.K. Splice variants of human FOXP3 are functional inhibitors of human CD4+ T-cell activation. *Immunology*. 2006; 119: 203–211.
22. Kaur G. , Goodall J.C., Jarvis L.B., Gaston J.S.H. Characterisation of Foxp3 splice variants in human CD4+ and CD8+ T cells—Identification of Foxp3delta7 in human regulatory T cells. *Molecular Immunology*. 2010; 48: 321-332.
23. Mailer R.K.W., Kirsten Falk K., Rotzschke O. Absence of Leucine Zipper in the Natural FOXP3D2D7 Isoform Does Not Affect Dimerization but Abrogates Suppressive Capacity. *PLoS ONE*. 2009; 4: 1-17.
24. Du J., Huang C., Zhou B., Ziegler S.F. Isoform-Specific Inhibition of RORα-Mediated Transcriptional Activation by Human FOXP3. *J. Immunol*. 2008; 180: 4785–4792.
25. Ichiyama K, Yoshida H, Wakabayashi Y, Chinen T, Saeki K, et al. Foxp3 inhibits RORγt-mediated IL-17A mRNA transcription through direct interaction with RORγt. *J. Biol. Chem*. 2008; 283: 17003–17008.
26. Thomas Magg, Joachim Mannert, Joachim W. Ellwart et al. Subcellular localization of FOXP3 in human regulatory and nonregulatory T cells. *Eur. J. Immunol*. 2012; 42: 1627–1638.
27. Zheng, Y., Josefowicz, S. Z., Kas, A., Chu, T. T., Gavin, M. A. and Rudensky, A. Y., Genome-wide analysis of Foxp3 target genes in developing and mature regulatory T cells. *Nature*. 2007; 445: 936–940.
28. Durie BGM, Salmon SE: A clinical staging system for multiple myeloma. *Cancer* 36:842-854, 1975
29. Durie B.G.M., Harousseau J.L., S.Miguel J., Blade J. et al. International uniform response criteria for multiple myeloma. *Leukemia*. 2006; 20(9): 1467-1473.
30. Goodyear O.C., Pratt G., McLarnon A. et al., Differential pattern of CD4+ and CD8+ T-cell immunity to MAGE-A1/A2/A3 in patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and multiple myeloma. *Blood*. 2008; 112: 3362-3372.
31. Atanackovic D., Arfsten J., Cao Y. et al. Cancer-testis antigens are commonly expressed in multiple myeloma and induce

systemic immunity following allogeneic stem cell transplantation. *Blood*. 2007; 109: 1103-1112.

32. Allan S. E., Crome S. Q., Crellin N. K. et al., Activation-induced FOXP3 in human T effector cells does not suppress proliferation or cytokine production. *Int. Immunol.* 2007; 19: 345-354.

33. Wang J., Ioan-Facsinay A., vander Voort E.I., Huizinga T.W. and Toes R.E., Transient expression of FOXP3 in human activated nonregulatory CD4+T cells. *Eur. J. Immunol.* 2007; 37: 129-138.

34. Sprent J., Surh C.D. Normal T cell homeostasis: the conversion of naïve cells into memory-phenotype cells. *Nat Immunol.* 2011; 12(6): 478-484.

35. Митин А.Н., Литвина М.М., Комогорова В.В., Шарова Н.И., Ярилин А.А. Вклад гомеостатической пролиферации и связанных с ней процессов в восстановление популяции периферических Т-клеток в условиях лимфопении, индуцированной облучением. *Иммунология*. 2013; 34(5): 242-247.

36. Douek D.C., McFarland R.D., Keiser P.H. et al. Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection. *Nature*. 1998; 396 (6712): 690-695.

37. Митин А.Н., Литвина М.М., Шарова Н.И., Селиваненко В.Т., Мартаков М.А., Латышев С.В., Ярилин А.А. Экспрессия фактора FOXP3 и соотношение его изоформ в Т-клетках на разных стадиях дифференцировки. *Иммунология*. 2012; 33(4): 172-176.

Сведения об авторах:

Митина Татьяна Алексеевна; mi_69@inbox.ru, +7(905) 706 40 68 - ГБУЗ МО МОНКИ им. М.Ф.Владимирского, ст.н.с. отделения клинической гематологии и иммунотерапии, 129110, Москва, Российская Федерация.

Голенков Анатолий Константинович - ГБУЗ МО МОНКИ им. М.Ф.Владимирского, руководитель отделения клинической гематологии и иммунотерапии, 129110, Москва, Российская Федерация.

Митин Александр Николаевич - ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, зав. лабораторией дифференцировки лимфоцитов, 115478, Москва, Российская Федерация;

Литвина Марина Михайловна - ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, ст.н.с. лаборатории дифференцировки лимфоцитов, 115478, Москва, Российская Федерация;

Донецкова Альмира Дмитриевна - ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, в.н.с. лаборатории дифференцировки лимфоцитов, 115478, Москва, Российская Федерация;

Никонова Маргарита Федоровна - ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, ст.н.с. лаборатории дифференцировки лимфоцитов, 115478, Москва, Российская Федерация;

Комогорова Виктория Вячеславовна - ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, н.с. лаборатории дифференцировки лимфоцитов, 115478, Москва, Российская Федерация;

Шарова Нина Ивановна - ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, в.н.с. лаборатории дифференцировки лимфоцитов, 115478, Москва, Российская Федерация;
Караулов Александр Викторович - ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, зав. кафедрой клинической иммунологии и аллергологии, 119991, Москва, Российская Федерация.

Поступила 15.01.2015 г.