

DOI: <https://doi.org/10.17650/1818-8346-2024-19-3-159-172>

Динамика субпопуляционного состава Т-клеток у больных апластической анемией в процессе иммуносупрессивной терапии

А.В. Абрамова, Е.А. Михайлова, И.В. Гальцева, З.Т. Фидарова, А.В. Лучкин, Н.М. Капранов, Ю.О. Давыдова, С.М. Куликов, В.В. Троицкая, Е.Н. Паровичникова

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава России; Россия, 125167 Москва, Новый Зыковский пр-д, 4

Контакты: Анастасия Владимировна Абрамова anastasia.abramova@list.ru

Введение. Апластическая анемия (АА) – неопухоловое и редко встречающееся заболевание системы крови, характеризующееся глубокой панцитопенией вследствие развития аплазии костного мозга при иммуноопосредованном повреждении пула гемопоэтических стволовых клеток. Результаты исследований указывают на наличие антигенного воздействия, приводящего к патологической активации и дисрегуляции Т-клеточного звена в костном мозге с повышенной продукцией провоспалительных цитокинов, повреждающих гемопоэтические стволовые клетки. Пусковой фактор, запускающий каскад иммунных реакций, на сегодняшний день не известен. Высокая эффективность иммуносупрессивной терапии (ИСТ), позволяющей достичь ремиссии у большинства больных АА, является свидетельством иммунного генеза заболевания. Патогенез АА в настоящее время активно изучается. Участие субпопуляций Т-клеток в процессах иммунного ответа не вызывает сомнений, однако вопросы их значения в патогенезе АА до конца не изучены. Более детальное понимание механизмов развития АА необходимо при разработке долгосрочного эффективного лечения.

Цель исследования – изучить субпопуляционный состав Т-клеток больных АА в костном мозге в процессе ИСТ.

Материалы и методы. В исследование был включен 41 больной старше 18 лет с впервые приобретенной АА без предшествующей ИСТ. Лечение проводилось по протоколу, включающему лошадиный антиtimoцитарный глобулин и циклоспорин. Для детекции субпопуляций Т-клеток использовался метод проточной цитометрии. Исследование костного мозга проводилось в 3 точках: дебют, через 3 и 6 мес после начала комбинированной ИСТ.

Результаты. Разнонаправленные изменения соотношения субпопуляций Т-клеток до начала ИСТ были обнаружены у всех больных АА, включенных в проспективное исследование: у большинства больных выявлялась большая доля эффекторных CD4⁺- и CD8⁺-Т-клеток (у 61 и 83 % больных соответственно), CD4⁺-Т-клеток памяти (у 63 % больных) и меньшая доля наивных CD4⁺- и CD8⁺-Т-клеток (у 81 и 51 % больных соответственно) по сравнению с донорами ($p < 0,05$). Нарушения соотношения субпопуляций Т-клеток, обуславливающие аномальный иммунный ответ, наиболее выражены при сверхтяжелой форме АА. При ответе на лечение у больных не обнаружено достоверных изменений в субпопуляционном составе Т-клеток ни до начала ИСТ, ни через 6 мес после по сравнению с донорами. При отсутствии ответа на лечение выявлена большая доля эффекторных CD4⁺- и CD8⁺-Т-клеток, CD4⁺-Т-клеток памяти и меньшая доля наивных CD4⁺- и CD8⁺-Т-клеток по сравнению с донорами уже до начала ИСТ ($p < 0,05$). Из всех цитометрических параметров была получена достоверная связь между динамикой эффекторных CD8⁺-Т-клеток и ответом на лечение ($p = 0,040$). Количество этих клеток в дебюте и контрольных точках достоверно коррелировало с ответом на ИСТ. У больных, у которых не получено ответа на лечение к 3-му месяцу от начала ИСТ, происходит дальнейший рост количества эффекторных CD8⁺-Т-клеток, несмотря на продолжение ИСТ, что диктует необходимость усиления и интенсификации ИСТ в кратчайшие сроки (между 3-м и 6-м месяцами) у этих больных, а именно проведения 2-го курса лошадиным антиtimoцитарным глобулином и продолжения терапии циклоспорином либо рассмотрения в частном порядке вопроса об альтернативном лечении (аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток).

Заключение. Изучение динамики субпопуляционного состава Т-клеток, в частности эффекторных Т-клеток, позволяет определиться с тактикой дальнейшего лечения на ранних сроках ИСТ в целях подбора оптимальной программы лечения для каждого больного АА.

Ключевые слова: апластическая анемия, костномозговая недостаточность, иммуносупрессивная терапия, субпопуляция Т-клеток, проточная цитометрия

Для цитирования: Абрамова А.В., Михайлова Е.А., Гальцева И.В. и др. Динамика субпопуляционного состава Т-клеток у больных апластической анемией в процессе иммуносупрессивной терапии. Онкогематология 2024;19(3):159–72. DOI: <https://doi.org/10.17650/1818-8346-2024-19-3-159-172>

Dynamics of T cell subpopulation in patients with aplastic anemia during immunosuppressive therapy

A.V. Abramova, E.A. Mikhailova, I.V. Galtseva, Z.T. Fidarova, A.V. Luchkin, N.M. Kapranov, Yu.O. Davydova, S.M. Kulikov, V.V. Troitskaya, E.N. Parovichenikova

National Medical Research Center for Hematology, Ministry of Health of Russia; 4 Novyy Zykovskiy Proezd, Moscow 125167, Russia

Contacts: Anastasia Vladimirovna Abramova anastasia.abramova@list.ru

Background. Aplastic anemia (AA) is a non-tumor and rare disease of the blood system, characterized by deep pancytopenia due to the development of bone marrow aplasia with immune-mediated damage of hematopoietic stem cells. Research results indicate the presence of antigenic effects leading to pathological activation and dysregulation of the T cells in the bone marrow with increased production of pro-inflammatory cytokines that damage hematopoietic stem cells. The triggering factor that initiates the cascade of immune reactions is currently unknown. The high efficiency of immunosuppressive therapy (IST), which allows achieving remission in the majority of AA patients, is evidence of the immune genesis of the disease. The pathogenesis of AA is currently being actively studied. The participation of T cell subpopulations in immune response is beyond doubt, but the issues of their significance in the AA pathogenesis have not been fully studied. A more detailed understanding of the AA development mechanisms is necessary for the development of long-term effective treatment.

Aim. To investigate the T cells subpopulation in bone marrow of AA patients during IST.

Materials and methods. The study included 41 patients over 18 years of age with newly diagnosed acquired AA without previous IST. Treatment was carried out according to a protocol including horse antithymocyte globulin and cyclosporine. Flow cytometry was used to detect T cell subpopulations. Bone marrow examination was performed at three time points: initially, 3 and 6 months after initiation of combined IST.

Results. Multidirectional changes in the T cell subpopulations ratio before the start of IST were found in all AA patients included in the prospective study: most patients had a higher proportion of effector CD4⁺ and CD8⁺ T cells (61 and 83 % of patients, respectively), memory CD4⁺ T cells (63 % of patients), and a lower proportion of naive CD4⁺ and CD8⁺ T cells (81 and 51 % of patients, respectively) compared to donors ($p < 0.05$). The abnormal T cell subpopulation ratios that cause abnormal immune response are most pronounced in the very severe form of AA. When responding to treatment, no significant changes in T cells subpopulation were found either before the start of IST or 6 months after compared with donors. In the absence of treatment response, a higher proportion of effector CD4⁺ and CD8⁺ T cells, memory CD4⁺ T cells, and a lower proportion of naive CD4⁺ and CD8⁺ T cells were detected compared to donors already before the start of IST ($p < 0.05$). Of all cytometric parameters, a significant relationship was obtained between effector CD8⁺ T cells dynamics and response to treatment ($p = 0.040$). The number of these cells at the onset and control points significantly correlated with the response to IST. In patients who have not responded to treatment by the 3rd month from IST initiated, there is a further increase in effector CD8⁺ T cells number, despite the IST continuation, which dictates the need to intensify IST in the shortest possible time (between the 3rd and 6th months) in these patients, namely, a 2nd course of equine antithymocyte globulin and continuation of cyclosporine therapy or individual consideration of alternative treatment (allogeneic hematopoietic stem cell transplantation).

Conclusion. Studying the T cells subpopulation dynamics, in particular effector T cells, allows us to determine the tactics of further treatment in the early stages of IST in order to select the optimal treatment program for each AA patient.

Keywords: aplastic anemia, bone marrow failure, immunosuppressive therapy, T cell subpopulation, flow cytometry

For citation: Abramova A.V., Mikhailova E.A., Galtseva I.V. et al. Dynamics of T cell subpopulation in patients with aplastic anemia during immunosuppressive therapy. *Onkogematologiya = Oncohematology* 2024;19(3):159–72. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.17650/1818-8346-2024-19-3-159-172>

Введение

Апластическая анемия (АА) — неопухолевое и редкое встречающееся заболевание системы крови, характеризующееся глубокой панцитопенией вследствие развития аплазии костного мозга при иммуноопосредованном повреждении пула гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) [1].

Повреждение костного мозга активированными цитотоксическими Т-клетками и миелосупрессивными цитокинами вследствие срыва иммунологической толерантности — общепринятая и известная концепция патогенеза АА. Однако в литературе отсутствуют убедительные доказательства, подтверждающие эту мо-

дель уничтожения ГСК, а также имеется очень мало информации об антигенах, запускающих такой каскад реакций. Однозначно ясно, что единый патологический процесс не может стать причиной всех случаев болезни. Неоднородность и широта этиологических факторов указывают на вероятность присутствия нескольких механизмов подавления кроветворения при АА. Возможное антигенное воздействие запускает неконтролируемую экспансию цитотоксических CD4⁺- и CD8⁺-Т-клеток, что приводит к повышению экспрессии миелосупрессивных цитокинов, таких как интерферон (ИФН) γ , фактор некроза опухоли α , интерлейкин (ИЛ) 17 и других, и способствует гибели

ГСК, подавляя все ростки кроветворения [2–4]. Наиболее важную роль отводят эффекторным Т-клеткам памяти, которые способны быстро проявлять свои функции при повторном взаимодействии с антигеном, высвобождая цитокины [5]. Т-клетки памяти необходимы организму для защиты от чужеродных антигенов, злокачественных клеток, они являются частью адаптивной иммунной системы. Однако при АА происходит срыв иммунологической толерантности и возникает аутоиммунная агрессия в отношении собственных ГСК. Причины подобного процесса остаются предметом активных исследований. Наиболее изученными являются $CD8^+$ -Т-клетки памяти, которые быстро могут вырабатывать ИФН- γ и ИЛ-2 и обладают повышенной чувствительностью к передаче сигналов Т-клеточного рецептора и меньшей потребностью в ко-стимуляции [6]. В то же время $CD4^+$ -Т-клетки (Т-хелперы) мало исследованы и их изучение осложнено наличием большого количества видов Т-хелперов [7]. Для подавления активности цитотоксических клеток в иммунном процессе вовлекаются Т-регуляторные клетки (Т-reg), однако было показано, что у больных АА имеется как качественный, так и количественный дефект Т-reg, которые не способны подавить функцию активированных Т-клеток [8].

По данным литературы, наиболее подробно изучаются популяции $CD4^+$ - и $CD8^+$ -Т-клеток и их подмножества, такие как Т-клетки памяти, эффекторные Т-клетки, наивные Т-клетки, Т-reg, но также нельзя исключить вклад других малых субпопуляций в патогенез АА. Например, в литературе описаны исследования, посвященные изучению роли двойных негативных Т-клеток при различных аутоиммунных заболеваниях, учитывая их способность к регуляторному воздействию на $CD4^+$ - и $CD8^+$ -Т-клетки, В-клетки [9]. Также есть данные, что подобные Т-хелперам двойные негативные Т-клетки секретируют цитокины, в том числе ИЛ-4, ИЛ-17, ИФН- γ , фактор некроза опухоли α , и играют ту же роль в механизмах аутоиммунных процессов, что и Т-хелперные клетки [10]. Однако вопрос участия двойных негативных Т-клеток и других малых субпопуляций в патогенезе АА не изучен.

Теория aberrantных Т-клеточных популяций, инициирующих развитие АА, также подтверждается тем фактом, что комплексная иммуносупрессивная терапия (ИСТ) лошадиным антигитотимитарным глобулином (ЛАТГ) и циклоспорином (ЦС) способна дать ответ у большинства больных [11–13]. Таким образом, более подробное понимание иммунных механизмов заболевания, выявление новых иммунологических маркеров, прогностических критериев и изучение динамики субпопуляционного состава Т-клеточного звена на фоне лечения необходимы для разработки оптимальных протоколов лечения индивидуально для каждого больного АА и улучшения результатов ответа на ИСТ.

Цель исследования — изучить субпопуляционный состав Т-клеток больных АА в костном мозге в процессе ИСТ.

Материалы и методы

В проспективное исследование был включен 41 больной с впервые выявленной АА без предшествующей ИСТ ЛАТГ и ЦС (табл. 1). Критерии диагноза соответствовали национальным клиническим

Таблица 1. Клинико-лабораторная характеристика больных апластической анемией ($n = 41$)

Table 1. Clinical and laboratory characteristics of patients with aplastic anemia ($n = 41$)

Показатель Parameter	Значение Value
Пол, n (%): Gender, n (%): мужской male женский female	19 (45) 22 (55)
Медиана возраста на момент установления диагноза (диапазон), лет Median age at diagnosis (range), years	25,5 (17–60)
Медиана времени между началом заболевания и установлением диагноза (диапазон), мес Median time between disease onset and diagnosis (range), months	3 (1–9)
Тяжесть апластической анемии, n (%): Severity of aplastic anemia, n (%): нетяжелая non-severe тяжелая severe сверхтяжелая very severe	24 (57) 11 (28) 6 (15)
Клон пароксизмальной ночной гемоглобинурии, n (%): Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clone, n (%): есть yes нет no	34 (83) 7 (17)
Ретикулоциты ¹ , медиана (диапазон), % Reticulocytes ¹ , median (range), %	1,12 (0,09–3,5)
Нейтрофилы ² , медиана (диапазон), $\times 10^9$ /л Neutrophils ² , median (range), $\times 10^9$ /L	0,55 (0,01–2,56)
Ферритин ³ , медиана (диапазон), нг/мл Ferritin ³ , median (range), ng/mL	418 (8,4–2433)
Лактатдегидрогеназа ⁴ , медиана (диапазон), Ед/л Lactate dehydrogenase ⁴ , median (range), U/L	417 (164–>1500)

¹Нормы значений ретикулоцитов — 0,2–1,2 %, в абсолютном количестве — $20–100 \times 10^9$ /л.

²Нормы значений нейтрофилов — $2,0–5,5 \times 10^9$ /л.

³Нормы значений ферритина — 23,9–336,2 нг/мл.

⁴Нормы значений лактатдегидрогеназы — 208–378 Ед/л.

¹Normal values for reticulocytes are 0.2–1.2 %, in absolute quantity — $20–100 \times 10^9$ /L.

²Normal values for neutrophils are $2.0–5.5 \times 10^9$ /L.

³Normal values for ferritin are 23.9–336.2 ng/mL.

⁴Normal values for lactate dehydrogenase are 208–378 U/L.

Таблица 2. Критерии ответа на иммуносупрессивную терапию при апластической анемии
Table 2. Response criteria for immunosuppressive therapy in aplastic anemia

Показатели гемограммы Complete blood count parameters	Первичный клинико-гематологический ответ и отсутствие трансфузионной зависимости (гематологическое улучшение) Primary clinical and hematological response and absence of transfusion dependence (hematological improvement)	Частичная ремиссия Partial remission	Полная ремиссия Complete remission
Гемоглобин, г/л Hemoglobin, g/L	≥80	≥100	≥120
Нейтрофилы, × 10 ⁹ /л Neutrophils, × 10 ⁹ /L	Для нетяжелой апластической анемии ≥1,0 Для тяжелой и сверхтяжелой апластической анемии ≥0,5 For non-severe aplastic anemia ≥1.0 For severe and very severe aplastic anemia ≥0.5	≥1,5	≥2
Тромбоциты, × 10 ⁹ /л Platelets, × 10 ⁹ /L	≥20	≥80	≥150

рекомендациям [14]. Больные были разделены на 3 группы: нетяжелая АА (НАА) (*n* = 24), тяжелая АА (ТАА) (*n* = 11) и сверхтяжелая АА (сТАА) (*n* = 6). Материал для исследования – первый миллилитр аспирата костного мозга, получаемый во время диагностических стернальных пункций. Анализ проводили в 3 точках: дебют, через 3 и 6 мес после начала комбинированной ИСТ. Доза ЛАТГ 20 мг/кг/сут 5 дней использовалась у 29 больных, 40 мг/кг/сут 4 дня – у 8 больных. Терапия ЦС после ЛАТГ применялась в дозе 5 мг/кг/сут с дальнейшим подбором лечебной дозы. В группу сравнения вошли 23 здоровых донора (соотношение мужчин и женщин 17:6, медиана возраста 31 (21–45) год).

Ответом на ИСТ считалось достижение клинико-гематологического улучшения (отсутствие трансфузионной зависимости), частичной и полной ремиссий. Критерии ответа представлены в табл. 2 [14].

Разработана панель моноклональных антител к антигенам дифференцировки человека, состоящая из 8 комбинаций антител для детекции относительно количества Т-хелперов (CD3⁺CD4⁺), цитотоксических Т-клеток (CD3⁺CD8⁺), наивных Т-клеток (среди CD4⁺ и CD8⁺), Т-клеток памяти (среди CD4⁺ и CD8⁺), эффекторных Т-клеток (среди CD4⁺ и CD8⁺), Т-рег, Т-НК-клеток, двойных позитивных и двойных негативных Т-клеток, активированных CD4⁺- и CD8⁺-Т-клеток, методом проточной цитометрии на 6-цветном цитометре BD FACSCanto II (BD Biosciences, США). Описание методики и набора антител ранее опубликовано в статье [15]. С помощью программного обеспечения BD FACSDiva Software version 6.1.3 проводилось гейтирование и получение цитометрических данных.

Для статистической обработки применяли программное обеспечение SAS 9.4 (Sas institute inc., Cary, NC, США). Анализ результатов выполняли с помощью классических методов описательной статистики, частотного и регрессионного анализов. Дополнительно

для сравнительного анализа характеристик субпопуляций использовали R 3.6.3, GraphPad PRISM 8.0.

Результаты
Субпопуляции Т-лимфоцитов у больных апластической анемией в сравнении с донорами и в зависимости от степени тяжести заболевания до начала иммуносупрессивной терапии
 У 61 и 83 % больных АА было выявлено увеличение доли эффекторных CD4⁺- и CD8⁺-Т-клеток соответственно. У 63 % больных обнаружено увеличение относительного количества CD4⁺-Т-клеток памяти. Кроме этого, у 81 % больных АА до начала ИСТ выявлено уменьшение доли наивных CD4⁺-Т-клеток и у 51 % – наивных CD8⁺-Т-клеток. Параметры распределения (средняя доля ± стандартная ошибка средней доли) каждой субпопуляции больных АА, доноров, а также в зависимости от степени тяжести заболевания указаны в табл. 3.

До начала ИСТ у больных АА по сравнению с донорами обнаружена достоверно большая доля эффекторных CD4⁺- (*p* = 0,003) и CD8⁺-Т-клеток (*p* = 0,0006), CD4⁺-Т-клеток памяти (*p* = 0,015). Также у больных АА обнаружено меньшее относительное количество CD4⁺ (*p* = 0,006) и наивных CD8⁺-Т-клеток (*p* = 0,008). Изменения в остальных субпопуляциях не были статистически значимыми.

У больных АА в зависимости от степени тяжести получены статистически значимые различия в популяции двойных негативных Т-клеток: доля этих клеток у больных ТАА была больше, чем у больных НАА и сТАА. Значения субпопуляций Т-лимфоцитов у больных НАА имели значимые различия от этих значений у доноров, что, вероятно, связано с наибольшим числом больных в этой группе (*n* = 24). У больных НАА в сравнении с донорами выявлена большая доля эффекторных CD8⁺-Т-клеток (*p* = 0,013), CD4⁺-Т-клеток памяти (*p* = 0,035) и меньшее

Таблица 3. Субпопуляции Т-клеток у больных апластической анемией в сравнении с донорами и в зависимости от степени тяжести заболевания (средняя доля $\pm$ стандартная ошибка средней доли)Table 3. T cell subpopulations in patients with aplastic anemia compared with donors and according to disease severity (mean proportion $\pm$ standard error of the mean proportion)

Субпопуляция Subpopulation	Доноры (n = 23) Donors (n = 23)	Больные апластической анемией (n = 41) Aplastic anemia patients (n = 41)	Нетяжелая апластическая анемия (n = 24) Non-severe aplastic anemia (n = 24)	Тяжелая апластическая анемия (n = 11) Severe aplastic anemia (n = 11)	Сверхтяжелая апластическая анемия (n = 6) Very severe aplastic anemia (n = 6)
CD3 ⁺ CD4 ⁺ -клетки CD3 ⁺ CD4 ⁺ cells	51,67 $\pm$ 2,1	47,4 $\pm$ 1,78	48,66 $\pm$ 9,93	46,66 $\pm$ 2,72	43,67 $\pm$ 6,61
CD3 ⁺ CD8 ⁺ -клетки CD3 ⁺ CD8 ⁺ cells	42,36 $\pm$ 2,13	44,63 $\pm$ 1,53	44,12 $\pm$ 9,01	42,55 $\pm$ 2,64	50,47 $\pm$ 6,42
Т-НК-клетки T-NK cells	4,28 $\pm$ 0,58	5,25 $\pm$ 0,46	4,96 $\pm$ 1,01	5,5 $\pm$ 0,6	5,94 $\pm$ 1,97
Двойные позитивные Т-клетки Double positive T cells	0,79 $\pm$ 0,1	0,82 $\pm$ 0,12	0,86 $\pm$ 0,17	0,52 $\pm$ 0,09	1,22 $\pm$ 0,65
Двойные негативные Т-клетки Double negative T cells	5,18 $\pm$ 0,57	7,15 $\pm$ 0,9	6,35 $\pm$ 1,3**↓	10,27 $\pm$ 2,22**↑	4,63 $\pm$ 0,79**↓
Эффекторные CD4 ⁺ -Т-клетки Effector CD4 ⁺ T cells	1,04 $\pm$ 0,27	3,39 $\pm$ 0,69*↑	3,22 $\pm$ 0,66	2,88 $\pm$ 1,04	4,96 $\pm$ 1,61*↑
Наивные CD4 ⁺ -Т-клетки Naive CD4 ⁺ T cells	59,73 $\pm$ 2,41	47,69 $\pm$ 2,9*↓	45,45 $\pm$ 9,28*↓	54,2 $\pm$ 2,87	44,69 $\pm$ 8,92
CD4 ⁺ -Т-клетки памяти Memory CD4 ⁺ T cells	37,99 $\pm$ 2,46	47,89 $\pm$ 2,64*↑	50,41 $\pm$ 10,29*↑	41,83 $\pm$ 2,74	48,9 $\pm$ 9,12
Эффекторные CD8 ⁺ -Т-клетки Effector CD8 ⁺ T cells	23,78 $\pm$ 2,22	37,61 $\pm$ 2,57*↑	35,3 $\pm$ 7,21*↑	33,98 $\pm$ 5,38	53,49 $\pm$ 4,35*↑
Наивные CD8 ⁺ -Т-клетки Naive CD8 ⁺ T cells	28,8 $\pm$ 3,13	18,75 $\pm$ 1,87*↓	17,13 $\pm$ 3,5*↓	25,09 $\pm$ 4,28	13,58 $\pm$ 3,05
CD8 ⁺ -Т-клетки памяти Memory CD8 ⁺ T cells	41,92 $\pm$ 2,77	38,9 $\pm$ 2,36	42,65 $\pm$ 8,71	37,36 $\pm$ 4,79	26,76 $\pm$ 3,05
Т-регуляторные клетки T-regulatory cells	9,36 $\pm$ 0,54	9,23 $\pm$ 0,58	9,28 $\pm$ 1,89	10,25 $\pm$ 1,37	7,36 $\pm$ 0,87
Активированные CD4 ⁺ -Т-клетки Activated CD4 ⁺ T cells	17,44 $\pm$ 2,63	21,25 $\pm$ 2,04	21,92 $\pm$ 4,48	20,12 $\pm$ 3,39	20,41 $\pm$ 4,44
Активированные CD8 ⁺ -Т-клетки Activated CD8 ⁺ T cells	1,18 $\pm$ 0,29	1,06 $\pm$ 0,22	1,08 $\pm$ 0,22	1,39 $\pm$ 0,65	0,45 $\pm$ 0,15

*Статистически значимые различия между донорами и выделенной субпопуляцией Т-клеток до начала иммуносупрессивной терапии ($p < 0,05$).**Статистически значимые различия между больными в зависимости от степени тяжести апластической анемии ($p < 0,05$).*Statistically significant differences between donors and isolated T cell subpopulation before initiation of immunosuppressive therapy ($p < 0.05$).**Statistically significant differences between patients depending on the severity of aplastic anemia ($p < 0.05$).

относительное количество CD4⁺ ($p = 0,031$) и наивных CD8⁺-Т-клеток ($p = 0,035$).

Также получены статистически значимые различия между значениями субпопуляций Т-клеток у больных сТАА и доноров. У больных сТАА отмечена наибольшая доля эффекторных CD4⁺- ($p = 0,012$) и CD8⁺-Т-клеток ($p = 0,003$) (рис. 1).

Таким образом, у всех больных АА, включенных в исследование, до начала ИСТ выявлены разнона-

правленные отличия субпопуляционного состава Т-клеток. Отмечена статистически значимая большая доля эффекторных Т-клеток, CD4⁺-Т-клеток памяти и меньшее относительное количество наивных Т-клеток у больных АА по сравнению с донорами. Несмотря на небольшое число больных сТАА ($n = 6$), в этой группе достоверно выявлена наибольшая доля эффекторных Т-клеток, а также тенденция к уменьшению относительного количества наивных Т-клеток и Т-reg,

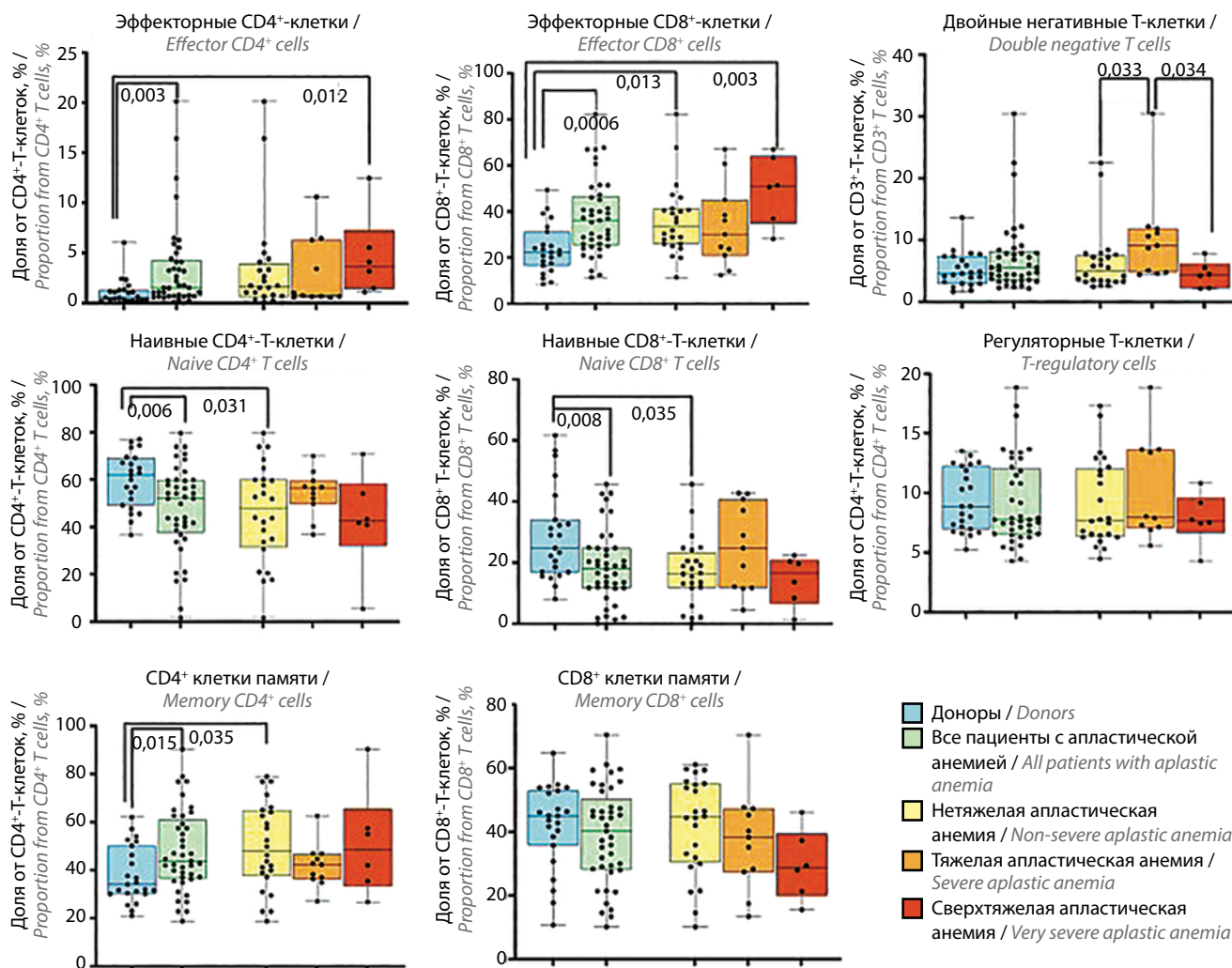


Рис. 1. Субпопуляции Т-лимфоцитов у больных апластической анемией в сравнении с донорами и в зависимости от степени тяжести заболевания до начала иммуносупрессивной терапии
Fig. 1. T-lymphocyte subpopulations in patients with aplastic anemia compared with donors and depending on the severity of the disease before the start of immunosuppressive therapy

что, возможно, свидетельствует о более выраженном антигенном воздействии и невозможности адекватной регуляции иммунного ответа именно у этих больных.

Динамика субпопуляций Т-лимфоцитов у больных апластической анемией в процессе иммуносупрессивной терапии

Динамика субпопуляций Т-клеток в процессе ИСТ оценивалась до начала лечения, через 3 и 6 мес после 1-го курса ЛАТГ на фоне терапии ЦС и прослеживалась в зависимости и вне зависимости от ответа на лечение. До начала ИСТ число больных составило 41, на этапе 3 мес — 30, на этапе 6 мес — 23. В табл. 4 представлены параметры распределения (средняя доля $\pm$ стандартная ошибка средней доли) каждой Т-клеточной субпопуляции в процессе ИСТ, а также распределения среди доноров.

В процессе ИСТ вне зависимости от ответа на лечение выявлено значимое уменьшение относительно количества эффекторных CD4⁺-Т-клеток ($p = 0,003$)

и увеличение CD8⁺-Т-клеток памяти ($p = 0,001$) к 3-му месяцу и увеличение доли CD4⁺-Т-клеток памяти к 6-му месяцу ($p = 0,030$). Также отмечено значимое увеличение доли клеток с фенотипом Т-НК-клеток как к 3-му месяцу ($p = 0,002$), так и 6-му месяцу ($p = 0,027$) после 1-го курса ЛАТГ.

К 3-му месяцу после начала ИСТ выявлено увеличение доли активированных CD4⁺CD25⁺ ($p = 0,027$) и CD8⁺CD25⁺-Т-клеток ($p = 0,036$). При этом к 6-му месяцу отмечены уменьшение доли активированных CD4⁺CD25⁺-Т-клеток ($p = 0,002$) и тенденция к уменьшению доли активированных CD8⁺CD25⁺-Т-клеток. В популяции эффекторных CD8⁺-Т-клеток прослеживалась тенденция к их уменьшению в процессе ИСТ. Остальные изменения в субпопуляционном составе Т-клеток в динамике не были достоверными. Динамика основных субпопуляций Т-клеток представлена на рис. 2.

Учитывая гетерогенность больных, был проведен анализ динамики субпопуляций в зависимости от ответа на ИСТ.

Таблица 4. Динамика субпопуляционного состава Т-клеток у больных апластической анемией в процессе иммуносупрессивной терапии (средняя доля $\pm$ стандартная ошибка средней доли)Table 4. T cells subpopulation dynamics in patients with aplastic anemia during immunosuppressive therapy (mean proportion $\pm$ standard error of the mean proportion)

Субпопуляция Subpopulation	Доноры (n = 23) Donors (n = 23)	До начала иммуносупрессивной терапии (n = 41) Before immunosuppressive therapy (n = 41)	Через 3 мес (n = 30) After 3 months (n = 30)	Через 6 мес (n = 23) After 6 months (n = 23)
CD3 ⁺ CD4 ⁺ -клетки CD3 ⁺ CD4 ⁺ cells	51,67 $\pm$ 2,1	47,4 $\pm$ 1,78	43,46 $\pm$ 1,61	43,42 $\pm$ 2,41
CD3 ⁺ CD8 ⁺ -клетки CD3 ⁺ CD8 ⁺ cells	42,36 $\pm$ 2,13	44,63 $\pm$ 1,53	47,49 $\pm$ 1,4	47,99 $\pm$ 2,25
Т-НК-клетки T-NK cells	4,28 $\pm$ 0,58	5,25 $\pm$ 0,46*	6,53 $\pm$ 0,62*	7,32 $\pm$ 0,79*
Двойные позитивные Т-клетки Double positive T cells	0,79 $\pm$ 0,1	0,82 $\pm$ 0,12	0,68 $\pm$ 0,1	0,79 $\pm$ 0,18
Двойные негативные Т-клетки Double negative T cells	5,18 $\pm$ 0,57	7,15 $\pm$ 0,9	8,36 $\pm$ 0,86	7,8 $\pm$ 1,28
Эффекторные CD4 ⁺ -Т-клетки Effector CD4 ⁺ T cells	1,04 $\pm$ 0,27	3,39 $\pm$ 0,69*	2,1 $\pm$ 0,56*	3,23 $\pm$ 1,4
Наивные CD4 ⁺ -Т-клетки Naive CD4 ⁺ T cells	59,73 $\pm$ 2,41	47,69 $\pm$ 2,9	44,46 $\pm$ 2,9	38,76 $\pm$ 4,29
CD4 ⁺ -Т-клетки памяти Memory CD4 ⁺ T cells	37,99 $\pm$ 2,46	47,89 $\pm$ 2,64*	52,55 $\pm$ 2,67	57,51 $\pm$ 3,8*
Эффекторные CD8 ⁺ -Т-клетки Effector CD8 ⁺ T cells	23,78 $\pm$ 2,22	37,61 $\pm$ 2,57	32,72 $\pm$ 2,49	34,5 $\pm$ 3,41
Наивные CD8 ⁺ -Т-клетки Naive CD8 ⁺ T cells	28,8 $\pm$ 3,13	18,75 $\pm$ 1,87	19,18 $\pm$ 2,21	16,6 $\pm$ 3,25
CD8 ⁺ -Т-клетки памяти Memory CD8 ⁺ T cells	41,92 $\pm$ 2,77	38,9 $\pm$ 2,36*	44,18 $\pm$ 2,61*	46,24 $\pm$ 3,01
Т-регуляторные клетки T-regulatory cells	9,36 $\pm$ 0,54	9,23 $\pm$ 0,58	8,87 $\pm$ 0,61	7,82 $\pm$ 0,8
Активированные CD4 ⁺ -Т-клетки Activated CD4 ⁺ T cells	17,44 $\pm$ 2,63	21,25 $\pm$ 2,04*	25,55 $\pm$ 2,21*	22,94 $\pm$ 2,44*

*Статистически значимые различия между субпопуляциями Т-клеток на разных этапах лечения (до начала иммуносупрессивной терапии, через 3 и 6 мес после начала лечения).

*Statistically significant differences between T cell subpopulations at different phases of treatment (before initiation of immunosuppressive therapy, 3 and 6 months after initiation of treatment).

Динамика субпопуляций Т-лимфоцитов у больных апластической анемией в зависимости от ответа на иммуносупрессивную терапию

В зависимости от ответа на ИСТ больные были разделены на 2 группы: с ответом на терапию и без ответа на нее к 6-му месяцу. Критерии ответа на лечения представлены в табл. 3 раздела «Материалы и методы». Курс ЛАТГ был проведен 37 из 41 больного. Двое из 37 больных были исключены из анализа динамики в связи с отсутствием данных об их состоянии после лечения. Таким образом, в анализ динамики субпопуляций Т-лимфоцитов в зависимости от ответа на ИСТ включены 35 больных — общий ответ на терапию был достигнут у 17 больных, ответ не получен у 18 (табл. 5).

В табл. 6 представлены параметры распределения (средняя доля $\pm$ стандартная ошибка среднего доли) каждой Т-клеточной субпопуляции в процессе ИСТ в зависимости от ответа на лечение в 2 контрольных точках исследования (до начала ИСТ и через 6 мес от начала лечения) у больных АА.

Наиболее значимые различия субпопуляций Т-клеток получены в группе больных без ответа на лечение к 6-му месяцу: по сравнению с донорами у них отмечена значительно большая доля эффекторных CD4⁺- ($p = 0,045$) и CD8⁺-Т-клеток ($p = 0,0006$), CD4⁺-Т-клеток памяти ($p = 0,023$), меньшее относительное количество наивных CD4⁺- ($p = 0,0008$) и CD8⁺-Т-клеток ($p = 0,018$). Также у больных без ответа на ИСТ

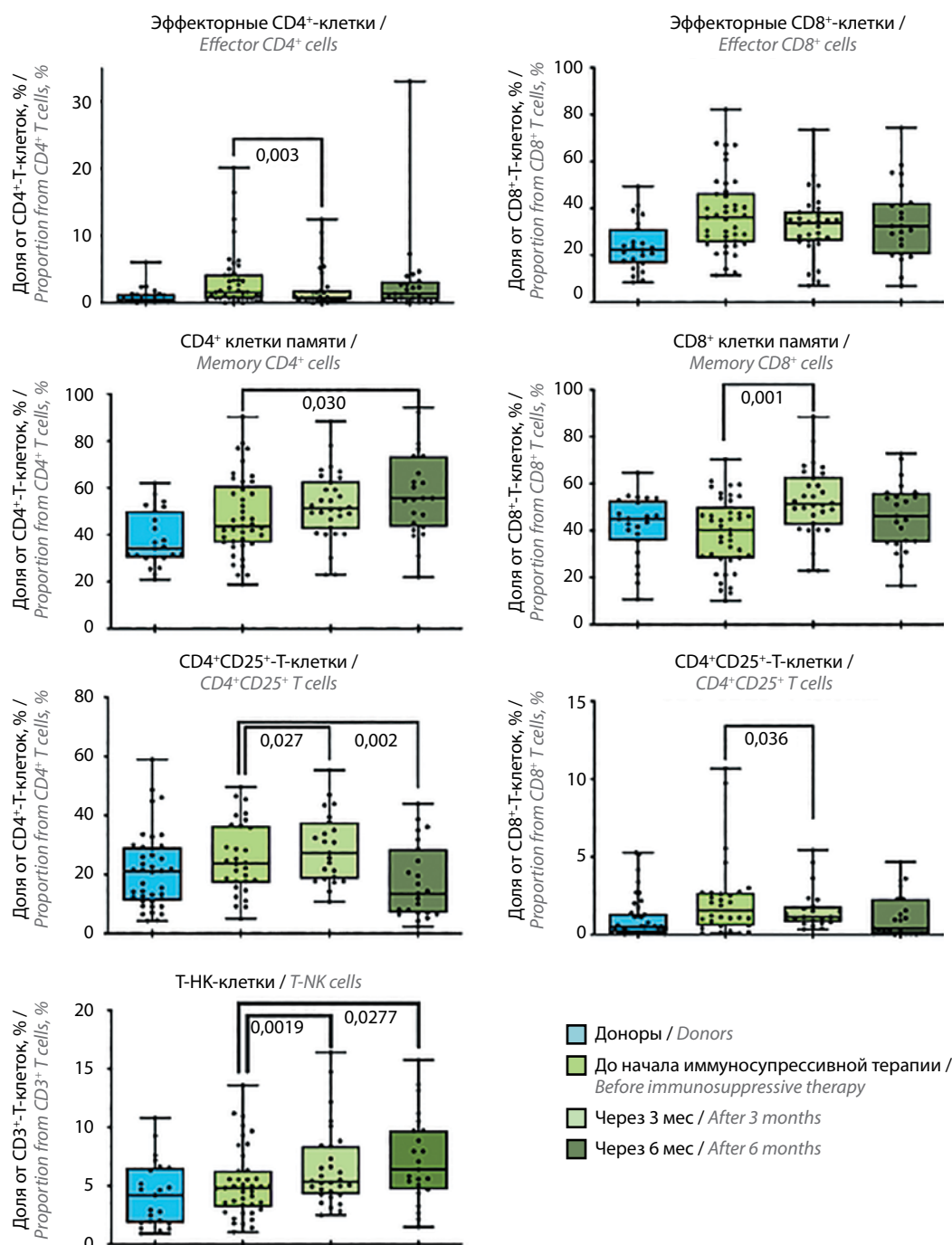


Рис. 2. Динамика субпопуляций Т-клеток в процессе иммуносупрессивной терапии у больных апластической анемией (до начала терапии, через 3 и 6 мес после терапии)

Fig. 2. T-lymphocyte subpopulations dynamics during immunosuppressive therapy in patients with aplastic anemia (before therapy, 3 and 6 months after therapy)

к 6-му месяцу выявлялась тенденция к дальнейшему увеличению CD4⁺- ($p = 0,062$) и CD8⁺-Т-клеток памяти ($p = 0,056$) по сравнению с дебютом заболевания, а также к дальнейшему уменьшению доли наивных Т-клеток.

У больных с ответом на лечение к 6-му месяцу наблюдалось значительное уменьшение доли эффекторных CD8⁺-Т-клеток ($p = 0,037$). Также выявлена тенденция к уменьшению доли наивных Т-клеток

как в дебюте в сравнении со значениями доноров, так и в динамике на 6 мес после 1-го курса ЛАТГ. На рис. 3 представлены основные параметры распределения (средняя доля $\pm$ стандартная ошибка средней доли) каждого изменения субпопуляционного состава Т-клеток в зависимости от ответа на терапию.

Таким образом, отмечена взаимосвязь между ответом на лечение к 6-му месяцу и изменениями субпопуляционного состава Т-клеток: отсутствие ответа

Таблица 5. Характеристика больных апластической анемией в зависимости от ответа на иммуносупрессивную терапию к 6-му месяцу ($n = 35$)Table 5. Characteristics of patients with aplastic anemia depending on the response to immunosuppressive therapy by the 6th month ($n = 35$)

Показатель Parameter	С ответом на иммуносу- прессивную терапию ($n = 17$) With response to immunosup- pressive therapy ($n = 17$)	Без ответа на иммуносу- прессивную терапию ($n = 8$) Without response to immunosup- pressive therapy ($n = 8$)
Пол, n (%): Gender, n (%): мужской male женский female	7 (41) 10 (59)	10 (55,5) 8 (44,5)
Медиана возраста на момент установле- ния диагноза (диапазон), лет Median age at diagnosis (range), years	25 (17–58)	26,5 (18–60)
Тяжесть апластической анемии, n (%): Severity of aplastic anemia, n (%): нетяжелая non-severe тяжелая severe сверхтяжелая very severe	11 (65) 6 (35) 0	8 (44,4) 6 (33,3) 4 (22,2)
Клон пароксизмальной ночной гемоглобину- рии, n (%): Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clone, n (%): есть yes нет no	15 (88) 2 (12)	14 (77,7) 4 (22,3)
Ретикулоциты, медиана (диапазон), % Reticulocytes, median (range), %	1,29 (0,43–3,47)*	0,8 (0,09–1,5)*
Нейтрофилы, медиана (диапазон), $\times 10^9$ /л Neutrophils, median (range), $\times 10^9$ /L	0,68 (0,4–1,49)	0,4 (0,01–2,56)
Ферритин, медиана (диапазон), нг/мл Ferritin, median (range), ng/mL	356 (8,4–1476)*	825 (100–2433)*

*Статистически значимые различия между группами по количеству ретикулоцитов и ферритина до начала иммуносупрессивной терапии.

*Statistically significant differences between groups in reticulocyte and ferritin levels before initiation of immunosuppressive therapy.

на ИСТ соответствовало достоверно большей доле эффекторных CD4⁺- и CD8⁺-Т-клеток, CD4⁺-Т-клеток памяти, меньшей доле наивных Т-клеток уже в дебюте заболевания. Выявленные изменения в соотношении субпопуляций Т-лимфоцитов, происходящие при отсутствии ответа на ИСТ к 6-му месяцу (1-й курс ЛАТГ + ЦС), могут свидетельствовать о продолжающейся аутоиммунной агрессии и необходимости усиления или продолжения ИСТ (проведение 2-го курса ЛАТГ) в кратчайшие сроки.

Зависимость ответа на лечение от динамики цитометрических параметров (многофакторный регрессионный анализ на повторных наблюдениях)

Больным АА, включенным в проспективное исследование ($n = 41$), первоначально был проведен однофакторный анализ, по результатам которого определены основные клинические факторы, влияющие на вероятность достижения у них ответа: количество нейтрофилов, ретикулоцитов, концентрация сывороточного ферритина перед началом ИСТ. Учитывая эти лабораторные параметры, можно предположить вероятность достижения ответа у больных АА еще до начала ИСТ, разделив их на группы благоприятного (количество нейтрофилов более $0,5 \times 10^9$ /л, ретикулоцитов $>20 \times 10^9$ /л, концентрация сывороточного ферритина <400 нг/мл) и неблагоприятного прогноза (количество нейтрофилов менее $0,5 \times 10^9$ /л, ретикулоцитов $<20 \times 10^9$ /л, концентрация сывороточного ферритина >400 нг/мл). С учетом данных однофакторного анализа проведен многофакторный корреляционно-регрессионный анализ на повторных наблюдениях, с помощью которого получилось оценить динамику цитометрических параметров и связь с благоприятным ответом на лечение (достижение первичного ответа или ремиссии заболевания). Анализ учитывал всех больных и все контрольные точки в проспективном исследовании.

Из всех цитометрических параметров анализа была получена достоверная связь между динамикой эффекторных CD8⁺-Т-клеток и благоприятным исходом заболевания ($p = 0,040$). Также отмечено, что у больных, у которых получен ответ на лечение ($n = 17$), не наблюдалось значительной динамики эффекторных CD8⁺-Т-клеток в точках исследования (3 и 6 мес от начала ИСТ), в то время как у больных без ответа на терапию ($n = 18$) наблюдалось уменьшение количества эффекторных CD8⁺-Т-клеток на 3-й месяц лечения и далее выявлялось увеличение доли этих клеток в период от 3 до 6 мес после начала ИСТ.

Для популяции эффекторных CD4⁺-Т-клеток достоверной связи с ответом на лечение не получено, однако прослеживалась аналогичная тенденция зависимости с ответом на терапию, как и для популяции эффекторных CD8⁺-Т-клеток. Графики многофакторного анализа представлены на рис. 4.

Таким образом, количество эффекторных CD8⁺-Т-клеток в дебюте и контрольных точках достоверно

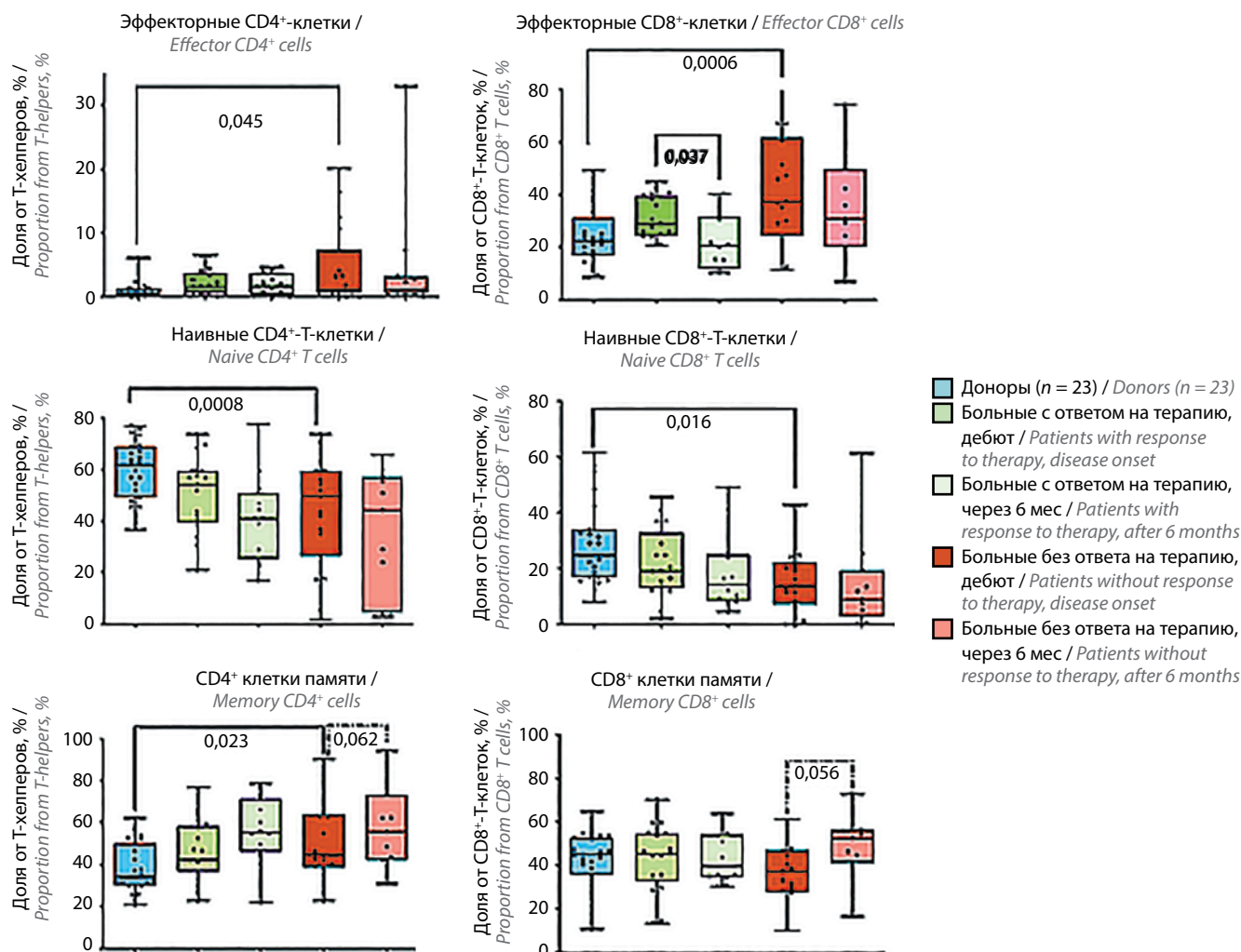


Рис. 3. Изменения соотношений субпопуляционного состава Т-клеток в зависимости от ответа на иммуносупрессивную терапию
Fig. 3. Changes in T cell subpopulation ratios depending on the response to immunosuppressive therapy

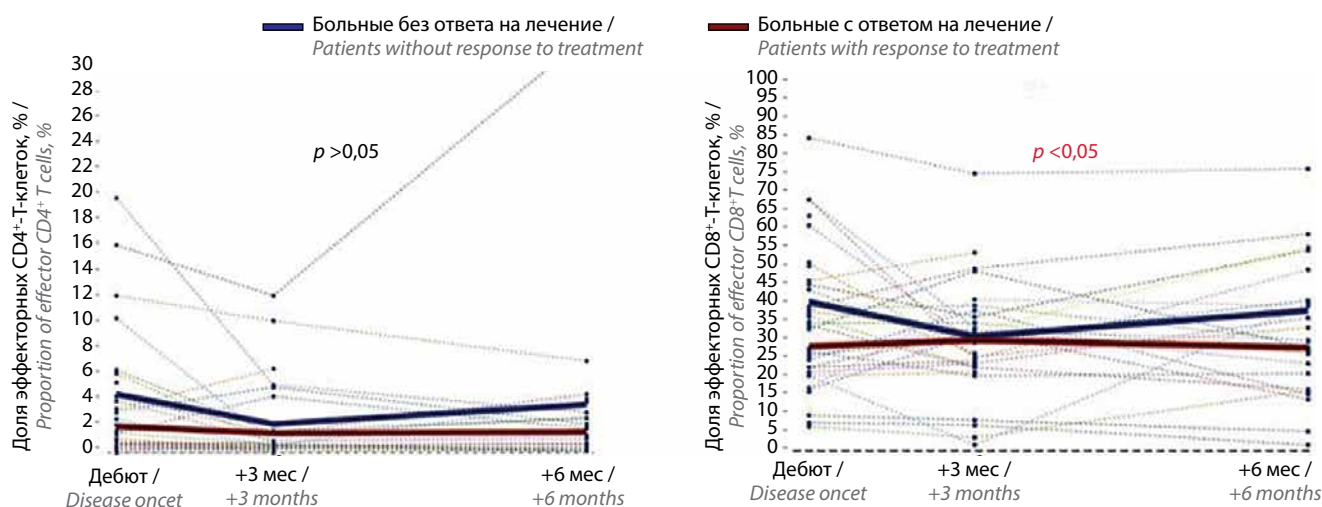


Рис. 4. Многофакторный анализ зависимости цитометрических параметров (эффекторных CD4⁺- и CD8⁺-Т-клеток) от варианта ответа на терапию в динамике — до начала ИСТ, +3 и +6 мес от начала лечения. Каждая точка на графике показывает долю эффекторных CD8⁺-Т-клеток у каждого больного в контрольных точках. Пунктирная линия, соединяющая соответствующие точки, обозначает динамику изменений доли эффекторных CD8⁺-Т-клеток

Fig. 4. Multivariate analysis of the dependence of cytometric parameters (effector CD4⁺ and CD8⁺ T cells) on the type of therapy response in dynamics — before IST, +3 and +6 months from the start of treatment. Each point on the graph shows the proportion of effector CD8⁺ T cells in each patient at the control points. The dotted line connecting the corresponding points indicates the dynamics of changes in the proportion of effector CD8⁺ T cells

Таблица 6. Динамика субпопуляционного состава Т-клеток у больных апластической анемией в процессе иммуносупрессивной терапии (ИСТ) в зависимости от ответа на лечение (средняя доля $\pm$ стандартная ошибка средней доли)**Table 6.** T cells subpopulation dynamics in patients with aplastic anemia during immunosuppressive therapy (IST) depending on the response to treatment (mean proportion $\pm$ standard error of the mean proportion)

Субпопуляция Subpopulation	Доноры (n = 23) Donors (n = 23)	С ответом на лечение до начала ИСТ (n = 17) With response to therapy before IST (n = 17)	С ответом на лече- ние через 6 мес после ЛАТГ (n = 12) With response to therapy 6 months after hATG (n = 12)	Без ответа на лечение до начала ИСТ (n = 18) Without response to therapy before IST (n = 18)	Без ответа на лечение через 6 мес после ЛАТГ (n = 11) Without response to therapy 6 months after hATG (n = 11)
CD3 ⁺ CD4 ⁺ -клетки CD3 ⁺ CD4 ⁺ cells	51,67 $\pm$ 2,1	46,8 $\pm$ 2,46	41,65 $\pm$ 2,69	46,77 $\pm$ 3,41	45,35 $\pm$ 4,16
CD3 ⁺ CD8 ⁺ -клетки CD3 ⁺ CD8 ⁺ cells	42,36 $\pm$ 2,13	44,38 $\pm$ 2,21	50,29 $\pm$ 2,69	45,3 $\pm$ 2,93	45,49 $\pm$ 3,66
Т-НК-клетки T-NK cells	4,28 $\pm$ 0,58	5,25 $\pm$ 0,52	8,43 $\pm$ 1,11	5,19 $\pm$ 0,79	6,1 $\pm$ 1,06
Двойные позитивные Т-клетки Double positive T cells	0,79 $\pm$ 0,1	0,67 $\pm$ 0,09	0,65 $\pm$ 0,06	0,79 $\pm$ 0,24	0,93 $\pm$ 0,37
Двойные негативные Т-клетки Double negative T cells	5,18 $\pm$ 0,57	8,16 $\pm$ 1,73	7,4 $\pm$ 0,68	7,14 $\pm$ 1,23	8,23 $\pm$ 2,65
Эффекторные CD4 ⁺ -Т-клетки Effector CD4 ⁺ T cells	1,04 $\pm$ 0,27	2,24 $\pm$ 0,49	1,91 $\pm$ 0,48	4,54 $\pm$ 1,53*	4,68 $\pm$ 2,9
Наивные CD4 ⁺ -Т-клетки Naive CD4 ⁺ T cells	59,73 $\pm$ 2,41	50,57 $\pm$ 3,58	41,17 $\pm$ 4,95	43,45 $\pm$ 5,31*	36,12 $\pm$ 7,34
CD4 ⁺ -Т-клетки памяти Memory CD4 ⁺ T cells	37,99 $\pm$ 2,46	46,24 $\pm$ 3,6	56,46 $\pm$ 4,72	51,14 $\pm$ 4,6*	58,67 $\pm$ 6,32
Эффекторные CD8 ⁺ -Т-клетки Effector CD8 ⁺ T cells	23,78 $\pm$ 2,22	31,39 $\pm$ 1,94**	22,37 $\pm$ 3,19**	41,88 $\pm$ 5,17*	34,47 $\pm$ 6,03
Наивные CD8 ⁺ -Т-клетки Naive CD8 ⁺ T cells	28,8 $\pm$ 3,13	21,99 $\pm$ 3,02	18,79 $\pm$ 4,03	16,41 $\pm$ 3,02*	14,2 $\pm$ 5,28
CD8 ⁺ -Т-клетки памяти Memory CD8 ⁺ T cells	41,92 $\pm$ 2,77	43,44 $\pm$ 3,8	43,96 $\pm$ 3,43	36,98 $\pm$ 3,48	48,74 $\pm$ 5,14
Т-регуляторные клетки T-regulatory cells	9,36 $\pm$ 0,54	9,38 $\pm$ 0,85	8,33 $\pm$ 1,35	9,85 $\pm$ 1,05	7,26 $\pm$ 0,84
Активированные CD4 ⁺ -Т-клетки Activated CD4 ⁺ T cells	17,44 $\pm$ 2,63	21,9 $\pm$ 2,95	28,35 $\pm$ 3,22	21,09 $\pm$ 3,8	29,59 $\pm$ 3,85

*Статистически значимые различия между субпопуляциями Т-лимфоцитов выделенной группы и донорами.

**Статистически значимые различия между субпопуляциями Т-клеток больных с ответом на лечение до начала ИСТ и их значениями через 6 мес от начала терапии.

Примечание. ЛАТГ — лошадиный антиtimoцитарный глобулин.

*Statistically significant differences between T-lymphocyte subpopulations of the selected group and donors.

**Statistically significant differences between T cell subpopulations in patients with response to treatment before IST and 6 months after therapy initiation.

Note. hATG — horse antithymocyte globulin.

коррелировало с ответом на ИСТ. У больных, у которых не было получено ответа на лечение к 3-му месяцу от начала ИСТ, происходит дальнейший рост количества эффекторных CD8⁺-Т-клеток, несмотря на продолжение ИСТ, что диктует необходимость усиления и интенсификации ИСТ в кратчайшие сроки (между 3-м и 6-м месяцами), а именно проведение 2-го курса ЛАТГ и продолжение терапии ЦС либо рассмотрение в частном порядке вопроса об альтернативном лечении (аллогенной трансплантации ГСК).

Обсуждение

Проведено исследование субпопуляционного состава Т-клеток у больных АА на разных этапах течения заболевания с использованием методики проточной цитометрии. Помимо основных наиболее изученных субпопуляций (эффекторные и Т-клетки памяти, Т-reg), исследованы менее известные при АА субпопуляции, такие как двойные позитивные, двойные негативные и наивные Т-клетки, активированные Т-клетки, Т-НК-клетки. Обнаружено, что у всех

больных АА, включенных в исследование, до начала ИСТ имели место разнонаправленные изменения субпопуляционного состава Т-клеток (см. рис. 1). При детальном исследовании субпопуляций обнаружено, что у больных АА наблюдается сдвиг в сторону терминальных эффекторных клеток. Меньшая доля наивных $CD4^{+}$ - и $CD8^{+}$ -Т-клеток может свидетельствовать об истощении этих субпопуляций в результате длительной антигенной стимуляции или вытеснения эффекторными Т-клетками за счет увеличения их доли в процессе наблюдения. Также охарактеризованы субпопуляционные изменения у больных АА в зависимости от степени тяжести в сравнении друг с другом и с донорами (см. рис. 1). Большинство достоверных результатов затрагивали больных НАА, что связано, вероятно, с большей численностью наблюдений в данной группе ($n = 24$), однако, несмотря на небольшое число больных в группе сТАА ($n = 6$), достоверно выявлена наибольшая доля эффекторных $CD4^{+}$ - и $CD8^{+}$ -Т-клеток по сравнению с донорами ($p = 0,012$ и $0,003$ соответственно), а также наблюдалась тенденция к дальнейшему уменьшению относительного количества наивных Т-клеток и Т-reg, что может свидетельствовать, возможно, о более агрессивном антигенном воздействии и невозможности адекватной регуляции иммунного ответа.

Исследование субпопуляционного состава Т-клеток в динамике в процессе ИСТ проводилось до начала ИСТ, через 3 и 6 мес после начала лечения. Учитывая, что субпопуляционный состав Т-клеток может быть значительно гетерогенным у больных с разным ответом на лечение, был проведен анализ динамики субпопуляций Т-клеток в зависимости от ответа на ИСТ (см. рис. 2, 3). Наиболее значимые изменения получены у больных без ответа на лечение при оценке данных через 6 мес от начала терапии: по сравнению с донорами у этих больных отмечена значительно большая доля эффекторных $CD4^{+}$ - и $CD8^{+}$ -Т-клеток ($p = 0,045$ и $0,0006$ соответственно), $CD4^{+}$ -Т-клеток памяти ($p = 0,023$), меньшее относительное количество наивных $CD4^{+}$ - и $CD8^{+}$ -Т-клеток ($p = 0,0008$ и $0,018$ соответственно). При сравнении эффекторных Т-клеток в динамике у больных без ответа на лечение в дебюте и через 6 мес от начала лечения достоверных изменений не получено. В то же время у больных, достигших первичного ответа, к 6-му месяцу по сравнению с дебютом болезни достоверно уменьшалась доля популяции эффекторных $CD8^{+}$ -Т-клеток ($p = 0,037$). Также в процессе лечения у больных без ответа на терапию отмечена тенденция к дальнейшему увеличению доли $CD4^{+}$ - и $CD8^{+}$ -Т-клеток памяти по сравнению с дебютом заболевания ($p = 0,062$ и $0,056$ соответственно). Учитывая, что Т-клетки памяти подразделяются как минимум на 3 субпопуляции, увеличение их доли у больных без ответа на лечение связано, вероятно, с преобладанием популяции эффекторных

Т-клеток с высокой цитокиновой активностью и низким пролиферативным потенциалом. Таким образом, несмотря на проведение ИСТ у этих больных, вероятно, продолжалась выраженная антигенная стимуляция или проведенная ИСТ была недостаточной, что требовало интенсификации основного лечения на более ранних сроках, в частности до 6 мес.

Был проведен многофакторный корреляционно-регрессионный анализ на повторных наблюдениях, с помощью которого получена достоверная связь между динамикой эффекторных $CD8^{+}$ -Т-клеток и благоприятным ответом на ИСТ (см. рис. 4). В работе отечественных исследователей показано, что у 70 % больных, достигших ответа на 1-й курс ЛАТГ, гематологическое улучшение наблюдалось уже в первые 3 мес от начала лечения ЛАТГ. Было предположено, что интервал между 3-м и 6-м месяцами от начала ИСТ можно считать оптимальным сроком для принятия решения о проведении 2-го курса ЛАТГ [13]. В нашем исследовании у больных без ответа на лечение к 3-му месяцу от начала ИСТ происходил дальнейший рост относительного количества эффекторных $CD8^{+}$ -Т-клеток, несмотря на продолжение ИСТ (ЦС), что диктует необходимость усиления и интенсификации ИСТ в кратчайшие сроки (проведение 2-го курса ЛАТГ между 3-м и 6-м месяцами). Доля эффекторных $CD8^{+}$ -Т-клеток в дебюте и контрольных точках достоверно коррелировала с ответом на 1-й курс ЛАТГ.

Таким образом, результаты исследования доказывают необходимость проведения 2-го курса ЛАТГ в сроки от 3 до 6 мес у больных без ответа на лечение к 3-му месяцу, особенно у больных с выявленными лабораторными факторами неблагоприятного прогноза (низкое количество нейтрофилов, ретикулоцитов, высокая концентрация сывороточного ферритина). Определение динамики относительного количества эффекторных $CD8^{+}$ -Т-клеток с помощью метода проточной цитометрии до ИСТ и через 3 и 6 мес после 1-го курса ЛАТГ может быть дополнительным способом, позволяющим оценить иммунный ответ и необходимость проведения 2-го курса ЛАТГ в ближайшее время или рассмотрения вопроса об аллогенной трансплантации ГСК.

Заключение

Апластическая анемия является одним из наиболее сложных в понимании патогенеза заболеванием системы крови. Многочисленное количество клеточных субпопуляций, участвующих в аномальном иммунном ответе при АА, до сих пор требует дальнейшего изучения: ни аутоантиген(ы), ни причины развития аутореактивности при АА на сегодняшний день не установлены. Подробное изучение субпопуляционного состава Т-клеток при этом заболевании необходимо для лучшего понимания патофизиологии АА, а также для поиска оптимальных сроков и программ лечения.

Л И Т Е Р А Т У Р А / R E F E R E N C E S

1. Bacigalupo A. How I treat acquired aplastic anemia. *Blood* 2017;129(11):1428–36. DOI: 10.1182/blood-2016-08-693481
2. Dokal I., Vulliamy T. Inherited aplastic anaemias/bone marrow failure syndromes. *Blood Rev* 2008;22(3):141–53. DOI: 10.1016/j.blre.2007.11.003
3. Shallis R.M., Ahmad A.M., Zeidan R. Aplastic anemia: etiology, molecular pathogenesis, and emerging concepts. *Eur J Haematol* 2018;101(6):711–20. DOI: 10.1111/ejh.13153
4. 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
5. Willinger T., Freeman T., Hasegawa H. et al. Molecular signatures distinguish human central memory from effector memory CD8 T cell subsets. *J Immunol* 2015;175(9):5895–903. DOI: 10.4049/jimmunol.175.9.5895
6. Lanzavecchia A., Sallusto F. Understanding the generation and function of memory T cell subsets. *Curr Opin Immunol* 2005;17(3):326–32. DOI: 10.1016/j.coi.2005.04.010
7. Zhu J. T-helper cell differentiation, heterogeneity, and plasticity. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2018;10(10):1–18c. DOI: 10.1101/cshperspect.a030338
8. 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
9. Young K.J., Zhang L. The Nature and mechanisms of DN regulatory T-cell mediated suppression. *Hum Immunol* 2002;63(10):926–34. DOI: 10.1016/s0198-8859(02)00446-9
10. Zhang Z., Ma Y., Wang H. et al. Double-negative T cells, activated by xenoantigen, lyse autologous B and T cells using a perforin. Granzyme-dependent, Fas-Fas ligand-independent pathway. *J Immunol* 2016;177(10):6920–9. DOI: 10.4049/jimmunol.177.10.6920
11. Bacigalupo A. Antithymocyte globulin and cyclosporin: standard of care for older patients with aplastic anemia. *Haematologica* 2019;104(2):215–6. DOI: 10.3324/haematol.2018.207167
12. Михайлова Е.А., Фидарова З.Т., Устинова Е.Н. и др. Комбинированная иммуносупрессивная терапия больных апластической анемией: эффективность повторных курсов анти тимокитарного глобулина. *Гематология и трансфузиология* 2014;50(7):11–8. Михайлова Е.А., Фидарова З.Т., Устинова Е.Н. et al. Combined immunosuppressive therapy of patients with aplastic anemia: efficiency of repeated antithymocytic globulin courses. *Gematologiya i transfuziologiya = Russian Journal of Hematology and Transfusiology* 2014;50(7):11–8. (In Russ.).
13. Михайлова Е.А., Фидарова З.Т., Абрамова А.В. и др. Иммуносупрессивная терапия больных апластической анемией: успехи и неудачи (одноцентровое исследование 2007–2016 гг.). *Терапевтический архив* 2020;92(7):4–9. DOI: 10.26442/00403660.2020.07.000756 Михайлова Е.А., Фидарова З.Т., Абрамова А.В. et al. Immunosuppressive therapy of aplastic anemia patients: successes and failures (single center experiment 2007–2016). *Terapevticheskiy arkhiv = Therapeutic Archive* 2020;92(7):4–9. (In Russ.). DOI: 10.26442/00403660.2020.07.000756
14. Михайлова Е.А., Фидарова З.Т., Троицкая В.В. и др. Клинические рекомендации по диагностике и лечению апластической анемии (редакция 2019 г.). *Гематология и трансфузиология* 2020;65(2):208–26. DOI: 10.35754/0234-5730-2020-65-2-208-226 Михайлова Е.А., Фидарова З.Т., Троицкая В.В. et al. Clinical recommendations for the diagnosis and treatment of aplastic anemia (2019 edition). *Gematologiya i transfuziologiya = Russian Journal of Hematology and Transfusiology* 2020;65(2):208–26. (In Russ.). DOI: 10.35754/0234-5730-2020-65-2-208-226
15. Абрамова А.В., Гальцева И.В., Михайлова Е.А. и др. Олигоклональность и субпопуляционный состав Т-клеток костного мозга у больных апластической анемией. *Гематология и трансфузиология* 2020;65(4):417–30. DOI: 10.35754/0234-5730-2020-65-4-417-430 Абрамова А.В., Гальцева И.В., Михайлова Е.А. et al. Oligoclonality and subpopulation structure of bone marrow T-cells in patients with aplastic anaemia. *Gematologiya i transfuziologiya = Russian Journal of Hematology and Transfusiology* 2020;65(4):417–30. (In Russ.). DOI: 10.35754/0234-5730-2020-65-4-417-430

Вклад авторов

А.В. Абрамова, Н.М. Капранов, Ю.О. Давыдова: разработка дизайна исследования, получение данных для анализа, анализ данных, написание текста статьи;

Е.А. Михайлова, И.В. Гальцева, З.Т. Фидарова, А.В. Лучкин, В.В. Троицкая, Е.Н. Паровичникова: разработка дизайна исследования, анализ данных, написание текста статьи;

С.М. Куликов: статистическая обработка данных.

Authors' contributions

A.V. Abramova, N.M. Kapranov, Yu.O. Davydova: study design development, obtaining data, data analysis, article writing;

E.A. Mikhailova, I.V. Galtseva, Z.T. Fidarova, A.V. Luchkin, V.V. Troitskaya, E.N. Parovichnikova: study design development, data analysis, article writing;

S.M. Kulikov: statistical analysis.

ORCID авторов / ORCID of authors

А.В. Абрамова / A.V. Abramova: <https://orcid.org/0000-0002-8113-6115>

Е.А. Михайлова / E.A. Mikhailova: <https://orcid.org/0000-0002-2449-2682>

И.В. Гальцева / I.V. Galtseva: <https://orcid.org/0000-0002-8490-6066>

З.Т. Фидарова / Z.T. Fidarova: <https://orcid.org/0000-0003-0934-6094>

А.В. Лучкин / A.V. Luchkin: <https://orcid.org/0000-0002-4400-4711>

Н.М. Капранов / N.M. Kapranov: <https://orcid.org/0000-0002-6512-910X>

Ю.О. Давыдова / Yu.O. Davydova: <https://orcid.org/0000-0001-5932-0285>

С.М. Куликов / S.M. Kulikov: <https://orcid.org/0000-0002-6288-7570>

В.В. Троицкая / V.V. Troitskaya: <https://orcid.org/0000-0002-4827-8947>

Е.Н. Паровичникова / E.N. Parovichnikova: <https://orcid.org/0000-0001-6177-3566>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.
Funding. The study was performed without external funding.

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики

Протокол исследования одобрен комитетом по биомедицинской этике ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава России.

Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Compliance with patient rights and principles of bioethics

The study protocol was approved by the biomedical ethics committee of National Medical Research Center for Hematology, Ministry of Health of Russia

All patients gave written informed consent to participate in the study.