© Коллектив авторов, 2020

Гринько Е.К.¹, Донецкова А.Д.^{2,3}, Мухина Е.А.², Андреева О.С.²,
Шарова Н.И.², Комогорова В.В.², Литвина М.М.², Марзанова С.Н.¹,
Митин А.Н.²

Динамика восстановления Т-лимфоцитов после индукции лимфопении циклофосфаном

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина», 109472, г. Москва, Российская Федерация

² Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства, 115522, г. Москва, Российская Федерация

³ Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 117997, г. Москва, Российская Федерация

Резюме

Введение. Химиотерапевтические препараты, применяемые в медицине главным образом для лечения онкологических заболеваний, относятся к группе факторов, вызывающих повреждение иммунной системы. Исследование механизмов восстановления Т-клеточного звена иммунной системы после воздействия цитостатических препаратов имеет важное значение как для понимания патогенеза их повреждающего действия, так и для поиска адекватных способов коррекции возникающих нарушений.

Цель работы – изучить вклад тимуса и периферического отдела иммунной системы в восстановление популяции Т-клеток после воздействия циклофосфана на мышах линии C57BL/6.

Материал и методы. Экспериментальным животным вводили циклофосфан внутрибрюшинно однократно в дозе 125 мг/кг. Мышей забивали на 0, 10, 20, 30, 60-е сутки после введения циклофосфана. В тимусе и селезенке определяли общее количество клеток и субпопуляционный состав методом проточной цитофлуориметрии.

Результаты. Обнаружено, что активно делящиеся клетки тимуса более уязвимы к действию препарата, чем лимфоциты селезенки. В то же время восстановительные процессы в тимусе начинаются раньше (на 20-е сутки) с последующим медленным восстановлением лимфоцитов селезенки (к 60-м суткам). Однако полной регенерации субпопуляции цитотоксических Т-клеток (ЦТЛ) в селезенке не отмечается даже к 60-м суткам. Исследование возрастного фенотипа Т-клеточных субпопуляций показало, что в результате действия циклофосфана происходит усиление конверсии фенотипа наивных Т-клеток в центральные Т-клетки памяти.

Заключение. Циклофосфан оказывает выраженное цитотоксическое действие на Т-клеточное звено иммунной системы мышей линии C57BL/6 с преимущественным поражением быстро делящихся популяций тимоцитов. Тимопоэз не способен компенсировать дефицит периферических Т-клеточных популяций, что ведет к усилению гомеостатической пролиферации Т-клеток, конверсии фенотипа наивных Т-клеток и накоплению Т-хелперов и ЦТЛ с фенотипом центральных Т-клеток памяти. Следствием данных изменений может стать сужение репертуара Т-клеточных рецепторов с нарушением полноценного иммунного надзора и возможным ростом онкологических, аутоиммунных и инфекционных заболеваний в последующем.

Ключевые слова: Т-лимфоциты; тимус; селезенка; циклофосфан; регенерация; проточная цитометрия

Статья поступила 06.05.2020. Принята в печать 16.06.2020.

Для цитирования: Гринько Е.К., Донецкова А.Д., Мухина Е.А., Андреева О.С., Шарова Н.И., Комогорова В.В., Литвина М.М., Марзанова С.Н., Митин А.Н. Динамика восстановления Т-лимфоцитов после индукции лимфопении циклофосфаном. Иммунология. 2020; 41 (4): 285–294. DOI: <https://doi.org/10.33029/0206-4952-2020-41-4-285-294>

Финансирование. Исследование выполнено в рамках проведения научно-исследовательских работ по заданию ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России в соответствии с соглашением № 388-02-2020-008 от 15.01.2020.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции
Донецкова Альмира Дмитриевна –
доктор медицинских наук,
ведущий научный сотрудник
лаборатории
дифференцировки лимфоцитов
ФГБУ «ГНЦ «Институт иммунологии»
ФМБА России,
профессор кафедры иммунологии
ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова
Минздрава России,
Москва, Российская Федерация
E-mail: almira_donetskova@yahoo.com
<http://orcid.org/0000-0003-2465-2444>

Grinko E.K.¹, Donetskova A.D.^{2,3}, Mukhina E.A.², Andreeva O.S.², Sharova N.I.², Komogorova V.V.², Litvina M.M.², Marzanova S.N.¹, Mitin A.N.²

Dynamics of T-lymphocytes regeneration after lymphopenia induction by cyclophosphane

¹ Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology – MVA named after K.I. Skryabin, 109472, Moscow, Russian Federation

² National Research Center – Institute of Immunology of the Federal Medical-Biological Agency, 115522, Moscow, Russian Federation

³ N.I. Pirogov Russian National Research Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, 117997, Moscow, Russian Federation

Abstract

Introduction. Chemotherapy drugs used in medicine, mainly for the treatment of cancer, belong to a group of factors that cause damage of the immune system. The study of the mechanisms of T-cell recovery after exposure to cytostatic agents is important both for understanding the pathogenesis of their damaging action and for finding the correct therapy.

Aim of the study – to investigate the role of thymus and the peripheral lymphoid organs in T-cell restoration after exposure to cyclophosphamide in C57BL/6 mice.

Material and methods. Cyclophosphamide was administered intraperitoneally to experimental animals once at a dose of 125 mg/kg. Mice were euthanized on days 0, 10, 20, 30, and 60 after cyclophosphamide administration. The total number of cells and the lymphocyte subpopulations in the thymus and spleen were determined by flow cytometry.

Results. We found that actively dividing thymus cells are more defenseless to the action of the drug than spleen lymphocytes. At the same time, recovery processes in the thymus begin earlier (on day 20), followed by slow recovery of spleen lymphocytes (by day 60). However, complete regeneration of cytotoxic T-cells (CTLs) in the spleen is not observed even by 60 days. The study of the age phenotype of T-cell subpopulations showed that cyclophosphamide intensifies the phenomenon of the conversion of the naïve T-cells into central memory T-cells.

Conclusion. Cyclophosphamide has a heavy cytotoxic effect on the T cells of C57BL/6 mice, with predominant damage in highly dividing thymocyte populations. Thymopoiesis is unable to compensate for the deficiency of peripheral T-cell populations, which leads to an increase in homeostatic proliferation of T-cells, conversion of naïve T-cell phenotype and the accumulation of T-helpers and CTLs with the phenotype of central memory T-cells. These changes can narrow the repertoire of T-cell receptors, lead to impaired immune surveillance and the possible growth of oncological, autoimmune and infectious diseases in the future.

Keywords: T-lymphocytes; thymus; spleen; cyclophosphamide; regeneration; flow cytometry

Received 06.05.2020. Accepted 16.06.2020.

For citation: Grinko E.K., Donetskova A.D., Mukhina E.A., Andreeva O.S., Sharova N.I., Komogorova V.V., Litvina M.M., Marzanova S.N., Mitin A.N. Dynamics of T-lymphocytes regeneration after lymphopenia induction by cyclophosphane. *Immunologiya*. 2020; 41 (4): 285–94. DOI: <https://doi.org/10.33029/0206-4952-2020-41-4-285-294> (in Russian)

Funding. The study was carried out as part of research on the State task of the NRC Institute of Immunology FMBA of Russia under the agreement No. 388-02-2020-008 of 15.01.2020.

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

For correspondence

Almira D. Donetskova – MD,
Leader Researcher of the Laboratory
of Lymphocyte Differentiation,
NRC «Institute of Immunology»
FMBA of Russia,
Professor of Immunology Department,
N.I. Pirogov Russian National
Research Medical University,
Ministry of Health of the Russian
Federation Moscow, Russian Federation
E-mail: almira_donetskova@yahoo.com
<http://orcid.org/0000-0003-2465-2444>

Введение

Лимфопения, в том числе затрагивающая Т-лимфоциты, развивается при разнообразных внешних воздействиях на организм (ионизирующие излучения, химические агенты, инфекции и пр.) [1]. При прекращении действия повреждающих факторов количество лимфоцитов и их субпопуляций в крови возвращается к норме. Восстановление количества Т-лимфоцитов происходит

за счет двух механизмов: тимопоэза в тимусе и гомеостатической пролиферации в периферическом отделе иммунной системы [1, 2].

Химиотерапевтические препараты, которые применяются в медицине в первую очередь для лечения онкологических заболеваний, относятся к группе факторов, которые способствуют атрофии тимуса и уменьшению пула циркулирующих лимфоцитов [2–4]. Алкилирующие

щие цитостатики (в частности циклофосфан) вызывают повреждение генетического аппарата активно делящихся клеток, что приводит к апоптозу как опухолевых клеток, так и иммунокомпетентных клеток в лимфоидных органах [3]. В проведенных ранее исследованиях при изучении действия циклофосфана в терапевтических дозах был установлен его выраженный иммуносупрессивный эффект, наиболее сильно затрагивающий Т-клеточное звено иммунной системы [1, 2, 5–7]. Этот эффект проявлялся при применении циклофосфана как в дозе 20 мг/кг (уменьшение количества Т-лимфоцитов на 50 %), так и в режиме высокодозовой химиотерапии – 200 мг/кг (снижение числа Т-клеток на 90 %) [6].

После воздействия цитостатиков число Т-клеток восстанавливается за счет усиления тимопоэза и гомеостатической пролиферации [2]. При этом тимопоэз можно рассматривать в качестве нормального способа восстановления дефицита Т-лимфоцитов, сохраняющего качественные характеристики периферических Т-клеток и полноценный репертуар Т-клеточных рецепторов (TCR), а гомеостатическую пролиферацию – в качестве вынужденной меры, ведущей к конверсии фенотипа наивных Т-клеток (Tnaïve), клональной экспансии и сужению репертуара TCR [7–9].

Оценка вклада каждого из этих механизмов в регенерацию Т-клеточного звена иммунной системы при различных патологических состояниях, сопровождающихся Т-клеточным дефицитом (в частности после воздействия цитостатических препаратов), имеет важное значение как для понимания патогенеза этих состояний, так и для поиска адекватных методов их коррекции. В частности, в ряде исследований показано, что иммуномодуляторы различной природы способны восстанавливать количественный и субпопуляционный состав лимфоидных клеток после действия цитостатиков [10–13].

Несмотря на длительную историю изучения циклофосфана и его побочных эффектов на иммунную систему до последнего времени не уделялось достаточного внимания исследованию спонтанного восстановления Т-клеточного звена иммунной системы после воздействия цитостатика. В данной работе мы исследовали вклад тимуса и периферического отдела иммунной системы (на примере селезенки) в восстановление популяции Т-клеток после воздействия цитостатика (циклофосфан) в терапевтической дозе.

Материал и методы

Исследование проводилось на мышах линии C57BL/6 в возрасте 6–8 нед, самках массой 18–20 г, полученных из питомника «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России. Все манипуляции с экспериментальными мышами осуществляли в соответствии с правилами лабораторной практики [«Европейская конвенция о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» (ETS N123), приказ Минздравсоцразвития РФ от 23.08.2010 № 708н «Об утверждении правил лабораторной практики»

и «Положение об этическом отношении к лабораторным животным «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России)].

Экспериментальной группе животных вводили циклофосфан (препарат Циклофосфан-ЛЭНС®) внутривенно в дозе 125 мг/кг однократно (доза, используемая при терапии опухолей) [14–17]. Мышей забивали на 10, 20, 30 и 60-е сутки после введения препарата (по 5 мышей в каждой группе). Контролем служили мыши соответствующего возраста и того же помета, что и мыши экспериментальной группы, без введения циклофосфана (8 мышей, по 2 мыши в каждой точке исследования). Поскольку мыши контрольной группы в каждой точке исследования (10, 20, 30 и 60-е сутки) статистически значимо не отличались между собой по содержанию Т-лимфоцитов, при анализе полученных результатов они были объединены в одну группу («Контроль»).

Мышей забивали цервикальной дислокацией. Извлекали тимус и селезенку, освобождали от соединительной ткани и гомогенизировали, эритроциты лизировали буфером фирмы eBioscience (США). Для дальнейшего анализа субпопуляционного состава лимфоидных органов полученные суспензии клеток переводили в фосфатно-солевой буфер (ФСБ) с 1,0 % BSA и 0,1 % NaN₃. Количество клеток в органах и их жизнеспособность определяли в камере Горяева, предварительно окрасив суспензию эозином. Для определения поверхностных маркеров клетки инкубировали с моноклональными антителами в течение 30 мин при 4 °С. Лазерную цитометрию клеток выполняли на проточном цитометре BD FACSCanto™ II (Becton Dickinson, США) в стандартном режиме. Данные анализировали с помощью программного обеспечения BD FACSDiva и FCS Express (США).

В настоящем исследовании определяли общее содержание клеток, процент и абсолютное содержание Т-лимфоцитов (CD3⁺) и их основных субпопуляций [суммарной фракции CD4⁺-Т-хелперов, включающей регуляторные Т-клетки, цитотоксических CD8⁺-Т-лимфоцитов (ЦТЛ)], а также возрастной фенотип Т-клеток, который оценивали по содержанию Tnaïve и центральных Т-клеток памяти (Tcm).

Использовали следующие комбинации моноклональных антител фирмы eBioscience (США) (препараты для изотипических контролей той же фирмы):

1. Анти-CD3-FITC + анти-CD4-PerCP-Cy5.5 + анти-CD8-APC-eFluor780 + анти-CD44-PE-Cy7 + анти-CD25-APC (тимус).
2. Анти-CD3-FITC + анти-CD4-PerCP-Cy5.5 + анти-CD8-APC-eFluor780 + анти-CD44-PE-Cy7 + анти-CD62L-PE (селезенка).

Статистическую обработку результатов проводили методами непараметрического анализа. Исследованные данные представляли в виде *Me* (LQ–UQ), где *Me* – медиана, LQ – нижний квартиль, UQ – верхний квартиль. Для сопоставления экспериментальных групп с контролем применяли *U*-критерий Манна–Уитни, при

Рис. 1. Динамика изменения общей численности клеток тимуса и селезенки мышей линии C57BL/6 после однократного введения циклофосфана

Здесь и на рис. 2–4, 6, 8: нормализованные относительно контроля данные, медианы соответствующих показателей в контроле приняты за единицу.

Здесь и на рис. 2–4, 6–8: * $p < 0,05$ в сравнении с контролем.

этом различие групп полагали статистически значимым при $p < 0,05$. Обработку проводили с помощью программного пакета Statistica 12.5 (Stat Soft Inc., США).

Результаты

На рис. 1 в графической форме показана динамика изменения общего числа клеток в тимусе и селезенке

мышей линии C57BL/6 после однократного введения циклофосфана в терапевтической дозе. Результаты представлены как нормализованные данные относительно интактного контроля, принятого за единицу. В тимусе число клеток было минимально на 10-е сутки после введения препарата и составляло 60,00 млн (57,00–66,00 млн) клеток при 162,80 млн (142,30–183,00 млн) клеток в контроле, т. е. снижение до 37 % от показателей интактного контроля ($p < 0,05$; табл. 1). На 20-е сутки общая численность тимоцитов восстанавливалась, достигнув уровня контроля.

В селезенке клеточность снижалась более постепенно, достигая минимальных значений к 20-м суткам: 60,50 млн (56,50–64,50 млн) клеток при 127,88 млн (118,5–139,5 млн) клеток в контроле ($p < 0,05$; табл. 2). Восстановление численности лимфоцитов селезенки происходило только к 60-м суткам после введения циклофосфана.

Динамика восстановления отдельных популяций тимоцитов представлена на рис. 2. На 10-е сутки после введения циклофосфана отмечалось статистически значимое снижение численности всех популяций тимоцитов, кроме двойных негативных (DN) тимоцитов ($p > 0,05$). К 20-м суткам популяции двойных позитивных (DP) и $CD4^+$ -timoцитов практически достигали уровня контроля, а популяции DN- и одинарно позитивных (SP) $CD8^+$ -timoцитов превышали его, вернувшись к нормальным показателям через 2 мес после введения цитостатика (см. табл. 1; рис. 2).

Таблица 1. Численность тимоцитов у мышей линии C57BL/6 после однократного введения циклофосфана, млн клеток на орган (тимус)

Сутки	Количество мышей	Тимоциты	$CD4^+CD8^-$ (DN)	$CD4^+CD8^+$ (DP)	$CD4^+$ (SP)	$CD8^+$ (SP)
Контроль	8	162,80 (142,30–183,00)	2,69 (2,33–3,16)	139,05 (118,37–156,80)	17,39 (13,43–18,80)	3,45 (2,89–3,93)
10	5	60,00* (57,00–66,00)	0,92 (0,88–1,2)	51,41* (49,17–54,36)	3,60* (3,59–3,97)	0,86* (0,74–0,94)
20	5	165,00 (154,00–172,00)	8,61* (4,15–13,83)	129,69 (123,35–142,07)	13,25 (12,04–13,52)	8,62* (4,5–13,04)
30	5	155,00 (155,00–159,00)	4,33* (4,28–4,4)	130,86 (128,65–131,60)	14,21 (13,94–15,5)	5,22* (5,08–6,39)
60	5	152,00 (148,50–162,00)	2,35 (1,81–2,74)	131,48 (129,64–135,27)	12,58 (12,28–14,23)	4,01 (3,25–4,1)

Примечание. Здесь и в табл. 2–4: * – $p < 0,05$ в сравнении с интактным контролем.

Здесь и в табл. 3: DN – двойные негативные; DP – двойные позитивные; SP – одинарно позитивные тимоциты.

Таблица 2. Численность основных Т-клеточных субпопуляций в селезенке мышей линии C57BL/6 после однократного введения циклофосфана, млн клеток на орган

Сутки	Количество мышей	Лимфоциты	$CD3^+CD4^+$ Т-хелперы	$CD3^+CD8^+$ -ЦТЛ
Контроль	8	127,88 (118,5–139,5)	26,17 (23,93–29,41)	24,9 (24,38–26,26)
10	5	100,50 (91,00–100,50)	17,67 (14,39–20,19)	13,39* (12,55–13,58)
20	5	60,50* (56,50–64,50)	12,61* (12,17–13,29)	6,55* (6,16–7,28)
30	5	70,00* (62,50–71,25)	16,34* (12,73–17,66)	6,14* (6,13–6,60)
60	5	140,00 (110,00–148,50)	27,37 (21,52–27,39)	18,97* (13,58–20,45)

Примечание. ЦТЛ – цитотоксические Т-лимфоциты.

Рис. 2. Динамика изменения численности основных популяций тимоцитов мышей линии C57BL/6 после однократного введения циклофосфана

Здесь и на рис. 3: DN – двойные негативные; DP – двойные позитивные; SP – одинарно позитивные тимоциты.

Исследование субпопуляций DN-timoцитов выявило их статистически значимое снижение на 10-е сутки в сравнении с интактным контролем (табл. 3; рис. 3). Увеличение общего содержания DN-timoцитов на 20-е и 30-е сутки связано с ростом уровня тимоцитов, находящихся на последней стадии дифференцировки – DN4: 6,62 млн клеток (2,38–9,81 млн) и 2,13 млн клеток (1,65–2,27 млн) против 0,62 млн клеток (0,48–0,71 млн) в контроле соответственно ($p < 0,05$).

Оценка восстановления периферических Т-клеток в селезенке выполнена отдельно для Т-хелперов (фенотип $CD3^+CD4^+$) и цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ) (фенотип $CD3^+CD8^+$). Оценивались динамика восстановления обеих Т-клеточных популяций и их возрастной фенотип.

После введения циклофосфана численность обеих популяций в селезенке снижалась (см. табл. 2; рис. 4). Минимальное значение числа Т-хелперов и ЦТЛ отмечалось на 20-е сутки: 12,61 млн (12,17–13,29 млн) клеток при 26,17 млн (23,93–29,41 млн) клеток в контроле для Т-хелперов и 6,55 млн (6,16–7,28 млн) клеток при 24,9 млн (24,38–26,26 млн) клеток в контроле для ЦТЛ. Количество последних снижалось более выражено и быстро: уже на 10-е сутки оно составило 54 % от уровня интактного контроля ($p < 0,05$). Восстановление численности обеих популяций начиналось с 30-х суток.

Рис. 3. Динамика изменения численности субпопуляций DN-timoцитов мышей линии C57BL/6 после однократного введения циклофосфана

К 60-м суткам количество Т-хелперов полностью восстанавливалось. В то же время уровень ЦТЛ не восстанавливался даже через 2 мес после введения циклофосфана: 18,97 млн (13,58–20,45 млн) клеток при 24,9 млн (24,38–26,26 млн) клеток в контроле ($p < 0,05$).

Исследование возрастного фенотипа у мышей проводилось по коэкспрессии поверхностных маркеров CD44 и CD62L: Tnaïve – фенотип $CD62L^{+}44^{low/-}$, а Tcm – $CD62L^{+}44^{high}$ (рис. 5).

Выявлено, что численность Tnaïve, как и всей популяции в целом, снижалась до 20 сут после введения химиопрепарата (табл. 4, рис. 6). Снижение численности Т-хелперов с фенотипом Tcm начиналось только после 10-х суток, достигая минимальных значений на 30-е сутки, и было менее выражено, чем Tnaïve – 51 % и 29 % от уровня интактного контроля соответственно.

Дальнейшее восстановление численности возрастных субпопуляций Т-хелперов происходило с преобладанием лимфоцитов с фенотипом Tcm: на 60-е сутки их содержание составляло 1,51 млн (0,84–1,59 млн) клеток при 0,79 млн (0,68–0,96 млн) клеток в контроле. Численность Tnaïve даже через 2 мес после введения циклофосфана не достигала уровня контроля: 13,94 млн (9,1–15,38 млн) клеток при содержании 20,33 млн (16,27–21,64 млн) клеток у интактных мы-

Таблица 3. Численность субпопуляций DN-timoцитов у мышей линии C57BL/6 после однократного введения циклофосфана, млн клеток на орган (тимус)

Сутки	Количество мышей	DN1	DN2	DN3	DN4
Контроль	8	0,24 (0,20–0,26)	0,79 (0,72–0,98)	1,03 (0,87–1,23)	0,62 (0,48–0,71)
10	5	0,14* (0,13–0,21)	0,064* (0,05–0,065)	0,41* (0,29–0,43)	0,32* (0,2–0,33)
20	5	0,56* (0,41–0,71)	0,36* (0,24–0,43)	1,49* (1,34–2,1)	6,62* (2,38–9,81)
30	5	0,41 (0,32–0,43)	0,67 (0,56–0,71)	1,41 (1,32–1,5)	2,13* (1,65–2,27)
60	5	0,22 (0,20–0,23)	0,30* (0,26–0,28)	0,96 (0,83–1,39)	0,69 (0,49–0,93)

Рис. 4. Динамика изменения численности основных популяций лимфоцитов селезенки мышей линии C57BL/6 после однократного введения циклофосфана

ЦТЛ – цитотоксические Т-лимфоциты.

шей ($p < 0,05$). Эта тенденция наглядно продемонстрирована на графике изменения соотношения числа Tnaïve и Tcm – Tnaïve/Tcm, которое у Т-хелперов статистически значимо снижалось с 23,6 (показатель интактных мышей) до 10,4 на 60-е сутки после введения циклофосфана ($p < 0,05$; рис. 7).

Восстановление численности возрастных субпопуляций ЦТЛ с преобладанием лимфоцитов с фено-

типом Tcm выявлялось лишь в конце восстановления численности обеих субпопуляций – в период с 30-х по 60-е сутки после назначения циклофосфана (табл. 4, рис. 8). На 60-е сутки содержание лимфоцитов с фенотипом Tcm составляло 4,29 млн (3,18–5,07 млн) клеток при 3,44 млн (3,24–4,51 млн) клеток у интактных мышей. Численность наивных ЦТЛ, как и наивных Т-хелперов, через 60 дней после введения цитостатика не достигала уровня контроля: 11,82 млн (7,55–12,01 млн) клеток при 15,45 млн (13,3–16,1 млн) клеток в контроле ($p < 0,05$). При этом соотношение численности ЦТЛ с фенотипами Tnaïve и Tcm так же, как и у Т-хелперов, снижалось с 3,9 у интактных мышей до 2,4 у животных на 60-е сутки после введения цитостатика, отличие статистически значимо ($p < 0,05$; см. рис. 7).

Обсуждение

При исследовании клеточности лимфоидных органов было показано, что тимоциты быстрее реагируют на токсическое действие циклофосфана: уже на 10-е сутки их количество статистически значимо упало до $1/3$ от показателей интактного контроля с последующим восстановлением начиная с 20-х суток. Результаты подтверждаются предыдущими исследованиями морфологической структуры тимуса, в которых показано, что при введении циклофосфана наблюдается тимическая атрофия с уменьшением размеров органа и обеднением морфологии долек с миелометапластическими из-

Рис. 5. Алгоритм цитометрического определения субпопуляций наивных и центральных Т-клеток памяти на примере ЦТЛ селезенки интактной мыши линии C57BL/6

Таблица 4. Численность основных возрастных субпопуляций Т-хелперов (CD4⁺) и цитотоксических Т-лимфоцитов (CD8⁺) в селезенке мышей линии C57BL/6 после однократного введения циклофосфана, млн клеток на орган

Сутки	Количество мышей	CD4 ⁺ -Tnaïve	CD4 ⁺ -Tcm	CD8 ⁺ -Tnaïve	CD8 ⁺ -Tcm
Контроль	8	20,33 (16,27–21,64)	0,79 (0,68–0,96)	15,45 (13,3–16,1)	3,44 (3,24–4,51)
10	5	8,77* (7,18–9,81)	0,79 (0,65–0,94)	5,41* (4,31–5,59)	1,36* (1,17–1,36)
20	5	5,81* (5,18–5,97)	0,43* (0,38–0,46)	3,94* (3,85–4,12)	0,94* (0,92–1,21)
30	5	8,87* (7,7–8,93)	0,40* (0,4–0,59)	3,40* (3,35–3,95)	1,07* (0,64–1,08)
60	5	13,94* (9,1–15,38)	1,51 (0,84–1,59)	11,82* (7,55–12,01)	4,29 (3,18–5,07)

Примечание. Tnaïve – наивные Т-клетки; Tcm – центральные Т-клетки памяти.

Рис. 6. Динамика изменения численности возрастных субпопуляций Т-хелперов мышей линии C57BL/6 после однократного введения циклофосфана

Здесь и на рис. 7, 8: Tnaïve – наивные Т-клетки; Tcm – центральные Т-клетки памяти.

менениями в субкапсулярной и кортико-медуллярной зонах, увеличением количества апоптотических клеток с фрагментированной ДНК [1, 18, 19]. В то же время численность лимфоцитов селезенки к 10-м суткам снизилась менее существенно и только к 20-м суткам их количество стало значимо отличаться от показателей интактных мышей, достигнув 47 % от их уровня. Следовательно, можно говорить о более высокой чувствительности активно пролиферирующих тимоцитов к действию циклофосфана по сравнению со зрелыми клетками селезенки, а также, ввиду быстрого восстановления тимопоэза, об отсутствии выраженного токсического действия цитостатика на гемопоэтические предшественники тимоцитов и строму центральных органов иммунной системы (костного мозга и тимуса). Отсрочка восстановления количества лимфоцитов селезенки указывает на зависимость этого процесса от лимфопоэза, идущего в центральных органах иммунной системы.

При исследовании динамики восстановления отдельных популяций тимоцитов (DN, DP, SP CD4⁺ и CD8⁺) было показано, что их содержание статистически значимо снизилось в ранние сутки после введения циклофосфана (за исключением популяции DN-timoцитов, уровень снижения которой не был статистически значимым). Похожие результаты были получены в работе R. Frawley и соавт., которые показали, что циклофосфан, как и ряд других иммуносупрессивных препаратов, вызывает атрофию тимуса с прямым повреждающим действием на развивающиеся CD3⁺-, CD4⁺CD8⁺-, CD4⁺- и CD8⁺-timoциты [5]. К 20-м суткам численность всех популяций тимоцитов достигла уровня контроля, а популяции DN- и CD8⁺-SP-timoцитов на 20-е и 30-е сутки даже значимо превосходили уровень интактного контроля, вернувшись к нормальным показателям на 60-е сутки. С другой стороны, анализ отдельных субпопуляций DN-timoцитов показал, что, в отличие от суммарной популяции, снижение численности для каждой из них на 10-е сутки оказалось статистически зна-

Рис. 7. Изменение соотношения наивных и центральных Т-клеток памяти среди Т-хелперов (CD4⁺) и цитотоксических Т-лимфоцитов (CD8⁺) в селезенке мышей линии C57BL/6 на 60-е сутки после однократного введения циклофосфана

чимым, а рост на 20-е и 30-е сутки обусловлен чрезмерным увеличением количества DN4-timoцитов, что косвенно указывает на более высокую интенсивность восстановительных процессов в костном мозге по сравнению с тимопоэзом, который не справляется с дифференцировкой всех поступающих предшественников, формируя своеобразный блок дифференцировки на стадии DN4.

Таким образом, можно констатировать, что после однократного введения циклофосфана в терапевтических дозах происходит кратковременное угнетение тимопоэза, которое к 20-м суткам полностью устраняется и даже сопровождается компенсаторным усилением дифференцировки, в частности популяции CD8⁺-SP-timoцитов. В то же время восстановление тимопоэза несколько отстает от восстановления лимфопоэза, идущего в костном мозге, что может свидетельствовать или о меньшей чувствительности гемопоэтических стволовых клеток и стромы костного мозга к повреждающему действию циклофосфана, или, в целом, о более высоком регенеративном потенциале костного мозга по сравнению с тимусом.

После введения циклофосфана численность как Т-хелперов, так и ЦТЛ в селезенке стала постепенно снижаться, достигнув минимальных значений на 20-е сутки, причем снижение ЦТЛ было более выраженным и быстрым, а Т-хелперы оказались более устойчивыми к действию циклофосфана (снижение их численности стало статистически значимым только на 20-е сутки). В опубликованных ранее работах проводилось исследование клеточного состава селезенки и периферической крови в ранние сроки после введения циклофосфана мышам линии Balb/c [20, 21]. Авторами было показано, что в ранние сроки (исследование проводилось начиная с 4-го часа после введения препарата) отмечалось статистически значимое снижение количества CD4⁺-лимфоцитов, в то время как изменения количества CD8⁺-клеток не наблюдалось; авторы отмечали восстановление исходных показателей лимфоидного роста

Рис. 8. Динамика изменения численности возрастных субпопуляций цитотоксических Т-лимфоцитов мышей линии C57BL/6 после однократного введения циклофосфана

на 5–7-е сутки после введения цитостатика [20]. В работе Х.Н. Нууан и соавт. также было показано, что при введении циклофосфана мышам в дозах 100 и 150 мг/кг отмечалось дозозависимое снижение количества CD3⁺- и CD4⁺-лимфоцитов и увеличение количества CD8⁺-клеток на 4-й день после введения химиопрепарата [21].

В нашем исследовании восстановление численности обеих популяций лимфоцитов началось с 30-х суток и полностью завершилось для Т-хелперов на 60-е сутки после введения цитостатика, тогда как ЦТЛ полностью не восстановили свою численность даже к 60-м суткам, достигнув только 76 % от уровня контроля, несмотря на полное восстановление CD8⁺-SP-популяции в тимусе. Таким образом, можно утверждать, что ЦТЛ являются более уязвимой популяцией при назначении циклофосфана в терапевтических дозировках по сравнению с Т-хелперами: восстановление их численности требует большего времени и не компенсируется полностью восстановленным тимопозом.

Вторым существенным механизмом поддержания и восстановления численности периферических Т-клеток является гомеостатическая пролиферация, которая при значительном своем повышении в условиях Т-лимфопении ведет к конверсии фенотипа Tnaïve. Последний феномен заключается в приобретении Tnaïve фенотипа Tcm в отсутствие контакта с антигеном. Оценив их соотношение, можно судить о вкладе тимопоза и гомеостатической пролиферации в процесс восстановления популяций периферических Т-лимфоцитов [1, 2].

Восстановление численности возрастных субпопуляций Т-хелперов проходило с явным преобладанием лимфоцитов с фенотипом Tcm, уровень которых на 60-е сутки после введения препарата почти в 2 раза превышал уровень интактного контроля, тогда как численность наивных Т-хелперов достигла только 69 % от показателя нормальных мышей.

При анализе возрастных субпопуляций ЦТЛ селезенки после введения циклофосфана тенденция к пре-

обладанию лимфоцитов с фенотипом Tcm памяти начинала проследиваться только в конце восстановления численности обеих субпопуляций.

Таким образом, анализ спектра Tnaïve и Т-клеток памяти в популяции Т-лимфоцитов регенерирующих лимфоидных органов свидетельствует о высокой эффективности восстановления Т-клеток памяти и неполноценности этого процесса для Tnaïve. Однако по всей вероятности значительный (если не основной) вклад в восстановление Т-клеток памяти (по крайней мере их центральной фракции) вносит не их пролиферация, а формирование за счет конверсии фенотипа пролиферирующих Tnaïve.

Анализ возрастного фенотипа периферических Т-клеток указывает на существенный вклад гомеостатической пролиферации в восстановление численности как Т-хелперов, так и ЦТЛ, а также на обусловленный этим процессом абсолютный и относительный рост числа клеток с фенотипом Tcm у мышей линии C57BL/6 после однократного введения циклофосфана в терапевтической дозировке.

Заключение

Подводя итог исследования, можно констатировать, что циклофосфан оказывает выраженное цитотоксическое действие на Т-клеточное звено иммунной системы мышей линии C57BL/6 с преимущественным поражением быстро делящихся популяций тимоцитов. Препарат в меньшей степени затрагивает гемопоэтические стволовые клетки и строму центральных лимфоидных органов – костного мозга и тимуса. Восстановление Т-клеточного звена иммунной системы начинается с центральных лимфоидных органов: нормализации лимфо- и тимопоза. Однако уровень повреждения периферических Т-клеток оказывается таким глубоким, что восстановившийся к 20-м суткам тимопоз не способен компенсировать дефицит Т-клеточных популяций как минимум в течение 60 сут после однократного введения циклофосфана. Сохраняющийся дефицит периферических Т-лимфоцитов, в свою очередь, ведет к усилению гомеостатической пролиферации и конверсии фенотипа Tnaïve и накоплению Т-хелперов и ЦТЛ с фенотипом Tcm. Клональная экспансия периферических Т-клеток ведет к сужению репертуара Т-клеточных рецепторов, возможному накоплению аутоагрессивных клонов и преждевременному старению иммунной системы, что необходимо учитывать при назначении циклофосфана в терапевтических целях.

Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – Митин А.Н., Марзанова С.Н., Донецкова А.Д.; сбор и обработка материала – Гринько Е.К., Мухина Е.А., Андреева О.С., Шарова Н.И.; анализ цитометрических данных – Литвина М.М.; статистическая обработка – Гринько Е.К., Комогорова В.В.; написание и редактирование текста – Донецкова А.Д.

■ Литература

1. Ярилин А.А. Гомеостатические процессы в иммунной системе. Контроль численности лимфоцитов. Иммунология. 2004; 25 (5): 312–20.
2. Williams K.M., Hakim F.T., Gress R.E. T cell immune reconstitution following lymphodepletion. *Semin. Immunol.* 2007; 19 (5): 318–30. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.smim.2007.10.004>
3. ten Berge R.J., Schellekens P.T. Immunosuppressive drugs in clinical medicine. *Neth. J. Med.* 1994; 45 (6): 329–38.
4. Ito K., Okamoto M., Inaguma Y. et al. Influence of R-CHOP Therapy on immune system restoration in patients with B-Cell lymphoma. *Oncology.* 2016; 91 (6): 302–10. DOI: <https://doi.org/10.1159/000449251>
5. Frawley R., White K. Jr., Brown R. et al. Gene expression alterations in immune system pathways in the thymus after exposure to immunosuppressive chemicals. *Environ. Health Perspect.* 2011; 119 (3): 371–6. DOI: <https://doi.org/10.1289/ehp.1002358>
6. Motoyoshi Y., Kaminoda K., Saitoh O. et al. Different mechanisms for anti-tumor effects of low- and high-dose cyclophosphamide. *Oncol. Rep.* 2006; 16 (1): 141–6.
7. Mahajan V.S., Leskov I.B., Chen J.Z. Homeostasis of T cell diversity. *Cell. Mol. Immunol.* 2005; 2 (1): 1–10.
8. Sallusto F., Geginat J., Lanzavecchia A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu. Rev. Immunol.* 2004; 22: 745–63. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.22.012703.104702>
9. Boyman O., Letourneau S., Krieg C., Sprent J. Homeostatic proliferation and survival of naïve and memory T cells. *Eur. J. Immunol.* 2009; 39 (8): 2088–94. DOI: <https://doi.org/10.1002/eji.200939444>
10. Стеценко О.Н., Борзова Н.В., Линднер Д.П., Иванова А.С. Влияние иммуномодулятора полиоксидония на восстановление костного мозга, поврежденного действием гидрокортизона и циклофосфана. *Иммунология.* 2005; 26 (1): 27–32.
11. Artym J., Zimecki M., Kruzel M.L. Reconstitution of the cellular immune response by lactoferrin in cyclophosphamide-treated mice is correlated with renewal of T cell compartment. *Immunobiology.* 2003; 207 (3): 197–205. DOI: <https://doi.org/10.1078/0171-2985-00233>
12. Jung J.Y., Shin J.S., Rhee Y.K. et al. In vitro and in vivo immunostimulatory activity of an exopolysaccharide-enriched fraction from *Bacillus subtilis*. *J. Appl. Microbiol.* 2015; 118 (3): 739–52. DOI: <https://doi.org/10.1111/jam.12742>
13. Feng H., Fan J., Lin L. et al. Immunomodulatory effects of phosphorylated radix cyathulae officinalis polysaccharides in immunosuppressed mice. *Molecules.* 2019; 24 (22): 4150. Published 2019 Nov 15. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules24224150>
14. Schiavoni G., Mattei F., Di Pucchio T. et al. Cyclophosphamide induces type I interferon and augments the number of CD44(hi) T lymphocytes in mice: implications for strategies of chemioimmunotherapy of cancer. *Blood.* 2000; 95 (6): 2024–30.
15. Kuwatani M., Ikarashi Y., Mineishi S. et al. An irradiation-free nonmyeloablative bone marrow transplantation model: importance of the balance between donor T-cell number and the intensity of conditioning. *Transplantation.* 2005; 80 (9): 1145–52. DOI: <https://doi.org/10.1097/01.tp.0000183289.79693.3d>
16. Ramirez D.A., Collins K.P., Aradi A.E. et al. Kinetics of cyclophosphamide metabolism in humans, dogs, cats, and mice and relationship to cytotoxic activity and pharmacokinetics. *Drug Metab. Dispos.* 2019; 47 (3): 257–68. DOI: <https://doi.org/10.1124/dmd.118.083766>
17. Arai Y., Choi U., Corsino C.I. et al. Myeloid conditioning with c-kit-Targeted CAR-T cells enables donor stem cell engraftment. *Mol. Ther.* 2018; 26 (5): 1181–97. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2018.03.003>
18. Milicevic N.M., Milicevic Z. Restriction of regenerative capacity of the rat thymus after the application of cyclophosphamide. *J. Comp. Pathol.* 1984; 94 (3): 425–31.
19. Prakash, Gupta V., Singh S.M. et al. Effect of intrauterine exposure of murine fetus to cyclophosphamide on development of thymus. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 2007; 29 (1): 17–30. DOI: <https://doi.org/10.1080/08923970701277635>
20. Лебединская Е.А., Лебединская О.В., Годовалов А.П. и др. Морфологические характеристики индуцированной иммуносупрессии. В сб.: Новые задачи современной медицины : материалы I Международной научной конференции (г. Пермь, январь 2012 г.). Пермь : Меркурий, 2012: 63–7.
21. Huyen X.H., Lin Y.P., Gao T. et al. Immunosuppressive effect of cyclophosphamide on white blood cells and lymphocyte subpopulations from peripheral blood of Balb/c mice. *Int. Immunopharmacol.* 2011; 11 (9): 1293–7. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2011.04.011>

■ References

1. Yarilin A.A. Homeostatic processes in the immune system. Control of lymphocyte population. *Immunologiya.* 2004; 25 (5): 312–20. (in Russian)
2. Williams K.M., Hakim F.T., Gress R.E. T cell immune reconstitution following lymphodepletion. *Semin. Immunol.* 2007; 19 (5): 318–30. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.smim.2007.10.004>
3. ten Berge R.J., Schellekens P.T. Immunosuppressive drugs in clinical medicine. *Neth. J. Med.* 1994; 45 (6): 329–38.
4. Ito K., Okamoto M., Inaguma Y. et al. Influence of R-CHOP Therapy on immune system restoration in patients with B-Cell lymphoma. *Oncology.* 2016; 91 (6): 302–10. DOI: <https://doi.org/10.1159/000449251>
5. Frawley R., White K. Jr., Brown R. et al. Gene expression alterations in immune system pathways in the thymus after exposure to immunosuppressive chemicals. *Environ. Health Perspect.* 2011; 119 (3): 371–6. DOI: <https://doi.org/10.1289/ehp.1002358>
6. Motoyoshi Y., Kaminoda K., Saitoh O. et al. Different mechanisms for anti-tumor effects of low- and high-dose cyclophosphamide. *Oncol. Rep.* 2006; 16 (1): 141–6.
7. Mahajan V.S., Leskov I.B., Chen J.Z. Homeostasis of T cell diversity. *Cell. Mol. Immunol.* 2005; 2 (1): 1–10.
8. Sallusto F., Geginat J., Lanzavecchia A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu. Rev. Immunol.* 2004; 22: 745–63. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.22.012703.104702>
9. Boyman O., Letourneau S., Krieg C., Sprent J. Homeostatic proliferation and survival of naïve and memory T cells. *Eur. J. Immunol.* 2009; 39 (8): 2088–94. DOI: <https://doi.org/10.1002/eji.200939444>
10. Stetsenko O.N., Borzova N.V., Lindner D.P., Ivanova A.S. The effect of the immunomodulator polyoxidonium on the bone marrow restoration damaged by the action of hydrocortisone and cyclophosphamide. *Immunologiya.* 2005; 26 (1): 27–32. (in Russian)
11. Artym J., Zimecki M., Kruzel M.L. Reconstitution of the cellular immune response by lactoferrin in cyclophosphamide-treated mice is correlated with renewal of T cell compartment. *Immunobiology.* 2003; 207 (3): 197–205. DOI: <https://doi.org/10.1078/0171-2985-00233>
12. Jung J.Y., Shin J.S., Rhee Y.K. et al. In vitro and in vivo immunostimulatory activity of an exopolysaccharide-enriched fraction from *Bacillus subtilis*. *J. Appl. Microbiol.* 2015; 118 (3): 739–52. DOI: <https://doi.org/10.1111/jam.12742>
13. Feng H., Fan J., Lin L. et al. Immunomodulatory effects of phosphorylated radix cyathulae officinalis polysaccharides in immunosuppressed mice. *Molecules.* 2019; 24 (22): 4150. Published 2019 Nov 15. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules24224150>
14. Schiavoni G., Mattei F., Di Pucchio T. et al. Cyclophosphamide induces type I interferon and augments the number of CD44(hi) T lymphocytes in mice: implications for strategies of chemioimmunotherapy of cancer. *Blood.* 2000; 95 (6): 2024–30.
15. Kuwatani M., Ikarashi Y., Mineishi S. et al. An irradiation-free nonmyeloablative bone marrow transplantation model: importance of the balance between donor T-cell number and the intensity of conditioning. *Transplantation.* 2005; 80 (9): 1145–52. DOI: <https://doi.org/10.1097/01.tp.0000183289.79693.3d>
16. Ramirez D.A., Collins K.P., Aradi A.E. et al. Kinetics of cyclophosphamide metabolism in humans, dogs, cats, and mice and relationship to cytotoxic activity and pharmacokinetics. *Drug Metab. Dispos.* 2019; 47 (3): 257–68. DOI: <https://doi.org/10.1124/dmd.118.083766>
17. Arai Y., Choi U., Corsino C.I. et al. Myeloid conditioning with c-kit-Targeted CAR-T cells enables donor stem cell engraftment.

ment. Mol. Ther. 2018; 26 (5): 1181–97. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2018.03.003>

18. Milicevic N.M., Milicevic Z. Restriction of regenerative capacity of the rat thymus after the application of cyclophosphamide. J. Comp. Pathol. 1984; 94 (3): 425–31.

19. Prakash, Gupta V., Singh S.M., et al. Effect of intrauterine exposure of murine fetus to cyclophosphamide on development of thymus. Immunopharmacol. Immunotoxicol. 2007; 29 (1): 17–30. DOI: <https://doi.org/10.1080/08923970701277635>

Сведения об авторах

Гринько Екатерина Константиновна – студентка ФГБОУ ВО МГАВМиБ – МВА имени К.И. Скрябина, Москва, Российская Федерация; e-mail: virys.s@yandex.ru, <http://orcid.org/0000-0002-2771-4535>

Донецкова Альмира Дмитриевна – д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории дифференцировки лимфоцитов ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, профессор кафедры иммунологии ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России; Москва, Российская Федерация; e-mail: almira_donetskova@yahoo.com, <http://orcid.org/0000-0003-2465-2444>

Мухина Елена Александровна – научный сотрудник лаборатории дифференцировки лимфоцитов ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Москва, Российская Федерация; e-mail: mukhina_mnioi@mail.ru, <http://orcid.org/0000-0002-4197-9492>

Андреева Ольга Сергеевна – научный сотрудник лаборатории дифференцировки лимфоцитов ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Москва, Российская Федерация; e-mail: helgaa1997@gmail.com, <http://orcid.org/0000-0001-8912-9393>

Шарова Нина Ивановна – к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории дифференцировки лимфоцитов ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Москва, Российская Федерация; e-mail: ni_sharova@mail.ru, <http://orcid.org/0000-0002-6774-961X>

Комогорова Виктория Вячеславовна – к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории дифференцировки лимфоцитов ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Москва, Российская Федерация; e-mail: polbor@inbox.ru, <http://orcid.org/0000-0002-3460-7981>

Литвина Марина Михайловна – к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории дифференцировки лимфоцитов ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Москва, Российская Федерация; e-mail: litvina@inbox.ru, <http://orcid.org/0000-0003-3766-9843>

Марзанова Саида Нурбиевна – к.б.н., доцент кафедры иммунологии и биотехнологии ФГБОУ ВО МГАВМиБ – МВА имени К.И. Скрябина, Москва, Российская Федерация; e-mail: s.marzanova@mail.ru, <http://orcid.org/0000-0001-9895-8046>

Митин Александр Николаевич – к.м.н., заведующий лабораторией дифференцировки лимфоцитов ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Москва, Российская Федерация; e-mail: mitin@inbox.ru, <http://orcid.org/0000-0003-1333-0757>

20. Lebedinskaya E.A., Lebedinskaya O.V., Godovalov A.P., et al. Morphological characteristics of induced immunosuppression. In collection: New Tasks of Modern Medicine: Materials of the I International Scientific Conference (Perm, January 2012). Perm: Merkuriy, 2012: 63–7. (in Russian)

21. Huan X.H., Lin Y.P., Gao T., et al. Immunosuppressive effect of cyclophosphamide on white blood cells and lymphocyte subpopulations from peripheral blood of Balb/c mice. Int. Immunopharmacol. 2011; 11 (9): 1293–7. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2011.04.011>

Authors' information

Ekaterina K. Grinko – student MSAVM&B – MVA named after K.I. Skryabin, Moscow, Russian Federation; e-mail: virys.s@yandex.ru, <http://orcid.org/0000-0002-2771-4535>

Almira D. Donetskova – MD, Leader Researcher of the Laboratory of Lymphocyte Differentiation of NRC – Institute of Immunology FMBA of Russia; Prof. of Immunology Department of N.I. Pirogov RNRMU MOH of Russia, Moscow, Russian Federation; e-mail: almira_donetskova@yahoo.com, <http://orcid.org/0000-0003-2465-2444>

Elena A. Mukhina – Researcher of the Laboratory of Lymphocyte Differentiation of NRC – Institute of Immunology FMBA of Russia, Moscow, Russian Federation; e-mail: mukhina_mnioi@mail.ru, <http://orcid.org/0000-0002-4197-9492>

Olga S. Andreeva – Researcher of the Laboratory of Lymphocyte Differentiation of NRC – Institute of Immunology FMBA of Russia, Moscow, Russian Federation; e-mail: helgaa1997@gmail.com, <http://orcid.org/0000-0001-8912-9393>

Nina I. Sharova – PhD, Leader Researcher of the Laboratory of Lymphocyte Differentiation of NRC – Institute of Immunology FMBA of Russia, Moscow, Russian Federation; e-mail: ni_sharova@mail.ru, <http://orcid.org/0000-0002-6774-Russian Federation>

Viktoriya V. Komogorova – PhD, Senior Researcher of the Laboratory of Lymphocyte Differentiation of NRC – Institute of Immunology FMBA of Russia, Moscow, Russian Federation; e-mail: polbor@inbox.ru, <http://orcid.org/0000-0002-3460-7981>

Marina M. Litvina – PhD, Senior Researcher of the Laboratory of Lymphocyte Differentiation of NRC – Institute of Immunology FMBA of Russia, Moscow, Russian Federation; e-mail: litvina@inbox.ru, <http://orcid.org/0000-0003-3766-9843>

Saida N. Marzanova – PhD, Associate Prof. of Immunology and Biotechnology Department, MSAVM&B – MVA named after K.I. Skryabin, Moscow, Russian Federation; e-mail: s.marzanova@mail.ru, <http://orcid.org/0000-0001-9895-8046>

Alexander N. Mitin – PhD, Head of the Laboratory of Lymphocyte Differentiation of NRC – Institute of Immunology FMBA of Russia, Moscow, Russian Federation; e-mail: mitin@inbox.ru, <http://orcid.org/0000-0003-1333-0757>