© Коллектив авторов, 2021

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

Динамика восстановления субпопуляций Т-лимфоцитов после действия различных повреждающих агентов

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. Различные повреждающие агенты отличаются по характеру иммуносупрессивного действия на иммунную систему и вызывают в ней патогенетически различные репаративные изменения. Исследование механизмов восстановления Т-клеточного звена иммунитета при неблагоприятных воздействиях имеет важное значение как для понимания патогенеза этих процессов, так и для поиска адекватных методов их коррекции.

Цель работы – изучить вклад тимуса и периферических лимфоидных органов (на примере селезенки) в восстановление субпопуляций Т-лимфоцитов при равной степени исходного повреждения цитостатиком циклофосфаном и сублетальным облучением.

Материал и методы. Мыши линии С57BL/6 были разделены на 3 группы. 1-й группе (20 мышей) однократно вводили циклофосфан, 2-ю группу (20 мышей) однократно облучали рентгеновскими лучами в сублетальной дозе, 3-ю группу (8 мышей) составили интактные мыши (контроль). Забой мышей проводили на 10, 20, 30 и 60-е сутки. В тимусе и селезенке определяли клеточность и субпопуляционный состав Т-клеток методом проточной цитофлуориметрии.

Результаты. Выявлено, что облучение более глубоко повреждает активно делящиеся тимоциты, чем циклофосфан. В тимусе формируется своеобразный блок на стадии DN4-timoцитов. Полного восстановления тимуса не происходит даже через 2 мес после сублетального облучения. В наибольшей степени поражение радиацией затрагивает субпопуляцию цитотоксических Т-лимфоцитов, которая к 60-м суткам не восстанавливается полностью ни в тимусе, ни на периферии. Активно делящиеся тимоциты более подвержены действию повреждающих факторов, чем зрелые спленоциты. Существенный вклад в регенеративные процессы вносит гомеостатическая пролиферация, которая сопровождается конверсией фенотипа наивных Т-клеток и, как следствие, увеличением числа центральных Т-клеток памяти.

Заключение. Т-клеточное звено иммунной системы более чувствительно к ионизирующему облучению, чем к действию цитостатиков. При этом облучение в значительной степени повреждает не только лимфоидные элементы, но и строу тимуса. Оба вида воздействия приводят к снижению численности наивных Т-клеток и накоплению суррогатных Т-клеток памяти, следствием чего должно стать сужение репертуара Т-клеточных рецепторов, развитие иммунодефицита и различных иммунопатологических состояний, связанных с Т-клеточным ответом. Это следует учитывать при назначении оптимальных схем корригирующего лечения после облучения и химиотерапии.

Ключевые слова: Т-лимфоциты; циклофосфан; рентгеновское облучение; восстановление; проточная цитофлуориметрия

Статья получена 10.04.2021. Принята в печать 15.05.2021.

Для цитирования: Гринько Е.К., Вериге К.С., Мухина Е.А., Шарова Н.И., Комогорова В.В., Литвина М.М., Марзанова С.Н., Донецкова А.Д., Митин А.Н. Динамика восстановления субпопуляций Т-лимфоцитов после действия различных повреждающих агентов. Иммунология. 2021; 42 (4): 346–355. DOI: <https://doi.org/10.33029/0206-4952-2021-42-4-346-355>

Финансирование. Работа проведена в рамках госзадания ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России (ГЗ № 22.005.16.800).

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

Dynamics of T-lymphocyte subpopulations' recovery after influence of various damaging agents

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 (RNRMU) of the Ministry of Health of the Russian Federation, 117997, Moscow, Russian Federation

Abstract

Introduction. Various damaging agents have different immunosuppressive effect on the immune system and cause pathogenetically varied reparative changes in it. Studying the mechanisms of T-cell recovery is important both for understanding the pathogenesis of reparative processes and for finding adequate methods for their correction.

Aim – to study the role of thymus and peripheral lymphoid organs (for example, the spleen) in the T-lymphocyte restoration after equal damage by cytostatic cyclophosphamide or sublethal irradiation.

Material and methods. C57BL/6 mice were divided into 3 groups. Group 1 (20 mice) received with cyclophosphamide once, group 2 (20 mice) was irradiated with X-rays (4 Gy) once, and group 3 (8 mice) was used as control. Mice were euthanized on days 10, 20, 30 and 60. The cellularity and subpopulations of T-cells in thymus and spleen were determined by flow cytometry.

Results. We have shown that radiation damages actively dividing thymocytes more deeply than cyclophosphamide. Some block is formed in the thymus at the stage of DN4 thymocytes, and complete recovery of cytotoxic T-cells in the spleen is not observed even by two months after sublethal irradiation. Radiation is more damaging to the CTL subpopulation, and CTLs are not completely restored either in the thymus or in the periphery by day 60. Actively dividing thymocytes are more susceptible to the action of damaging factors than mature splenocytes. Homeostatic proliferation with the conversion of the phenotype of naive T cells into central memory T-cells makes a significant contribution to the regenerative processes.

Conclusion. T-cells are more sensitive to ionizing radiation than to the action of cytostatics. And irradiation significantly damages not only the lymphoid elements, but also the thymic stroma. Both types of exposure lead to a decrease in the number of naive T-cells and the accumulation of surrogate memory T-cells, which should result in a narrowing of the T-cell receptor repertoire, the development of immunodeficiency and immunopathology associated with the T-cell response. We should understand it when prescribing the optimal corrective treatment after radiation and chemotherapy.

Keywords: T-lymphocytes; cyclophosphamide; X-ray; recovery; flow cytometry

Received 10.04.2021. Accepted 15.05.2021.

For citation: Grinko E.K., Verigo K.S., Mukhina E.A., Sharova N.I., Komogorova V.V., Litvina M.M., Marzanova S.N., Donetskova A.D., Mitin A.N. Dynamics of T-lymphocytes regeneration after lymphopenia induction by cyclophosphane. *Immunologiya*. 2021; 42 (4): 346–55. DOI:<https://doi.org/10.33029/0206-4952-2021-42-4-346-355> (in Russian)

Funding. The study was carried out within the framework of the state task of the NRC Institute of Immunology FMBA of Russia (№ 22.005.16.800).

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

Введение

При воздействии на организм различных повреждающих агентов (ионизирующая радиация, некоторые химические соединения) развивается лимфопения, затрагивающая Т-клеточное звено иммунитета [1]. Неблагоприятные факторы могут действовать на живые орга-

низмы как спонтанно при экологических катастрофах, так и в качестве побочного эффекта при лечении ряда опухолевых и аутоиммунных заболеваний.

Высокая чувствительность лимфоцитов к действию радиации и цитостатиков обусловлена их интенсивной пролиферацией, причиной гибели лимфоцитов является

For correspondence

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

развитие апоптоза [2, 3]. В восстановлении численности Т-клеток задействованы 2 механизма: тимопоз и гомеостатическая пролиферация. 1-й механизм обеспечивает приток наивных Т-лимфоцитов из тимуса, 2-й – за счет чрезмерной пролиферации ведет к накоплению Т-клеток памяти [4, 5]. Оценка вклада каждого механизма в восстановление Т-клеточного звена иммунной системы при неблагоприятных внешних воздействиях на организм имеет важное значение как для понимания патогенеза данных процессов, так и для поиска адекватных методов их коррекции [6].

Учитывая, что различные повреждающие агенты отличаются по характеру иммуносупрессивного действия на Т-клеточное звено иммунитета и вызывают в нем патогенетически различные репаративные изменения, в настоящей работе мы исследовали вклад тимуса и периферических лимфоидных органов (на примере селезенки) в восстановление субпопуляций Т-лимфоцитов при равной степени исходного повреждения.

Материал и методы

Экспериментальные животные и дизайн исследования. Эксперимент проводили на мышах линии C57BL/6, самках весом 18–20 г, полученных из питомника «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России. Мыши были разделены на 3 группы: группа, подвергнутая однократному воздействию цитостатика (20 мышей); группа, подвергнутая сублетальному облучению (20 мышей); контрольная группа интактных животных (8 мышей). В качестве цитостатического препарата использовали Циклофосфан-ЛЭНС (ЦФ, Россия) в дозе 125 мг/кг внутривенно [7]. Для получения сублетальной дозы облучения (4 Гр) использовали рентгеновский аппарат «АРДОК-1» (Россия). Все процедуры с экспериментальными животными проводили 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 ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России].

Лабораторные исследования. Оценку состояния Т-клеточного звена иммунной системы проводили на 10, 20, 30 и 60-е сутки после воздействия повреждающих факторов. Мышей забивали методом цервикальной дислокации, извлекали тимус и селезенку, освобождали их от соединительной ткани и гомогенизировали. Полученную суспензию клеток освобождали от эритроцитов с помощью лизирующего буфера фирмы eBioscience (США) и переводили в раствор PBS с 1,0 % BSA и 0,1 % ЭДТА. Численность и жизнеспособность клеток, предварительно окрашенных эозином, определяли в камере Горяева.

Фенотипическую оценку выделенных тимоцитов и спленоцитов выполняли методом проточной цитометрии. Оценивали соотношение основных субпопуля-

ций тимоцитов по экспрессии маркеров CD4 и CD8 – дубль-негативные (DN – double-negative), дубль-позитивные (DP – double-positive), сингл-позитивные CD4⁺- и CD8⁺-timoциты (SP CD4⁺ и SP CD8⁺ – single-positive), а также соотношение субпопуляций DN-timoцитов по коэкспрессии маркеров CD44 и CD25 – DN1 (CD44^{high}CD25^{low/-}), DN2 (CD44^{high}CD25^{high}), DN3 (CD44^{low}CD25^{high}), DN4 (CD44^{low}CD25^{low}). Среди спленоцитов оценивали долю всех Т-клеток (CD3⁺), Т-хелперов (CD3⁺CD4⁺), цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ – CD3⁺CD8⁺), а также соотношение основных возрастных субпопуляций Т-клеток, отражающих состояние гомеостаза Т-клеточного звена иммунной системы, по коэкспрессии маркеров CD44 и CD62L – наивных Т-клеток (Tnaïve – CD44^{low}CD62L^{high}) и центральных Т-клеток памяти (Tcm – CD44^{high}CD62L^{high}). Использовали следующие комбинации моноклональных антител фирмы eBioscience (США) (препараты для изотипических контролей той же фирмы): 1) anti-CD3-FITC, anti-CD4-PerCP-Cy5.5, anti-CD8-APC-eFluor780, anti-CD44-PE-Cy7, anti-CD25-APC; 2) anti-CD3-FITC, anti-CD4-PerCP-Cy5.5, anti-CD8-APC-eFluor780, anti-CD44-PE-Cy7, anti-CD62L-PE. Проточную цитометрию выполняли на проточном цитометре BD FACSCanto™ II (Becton Dickinson, США). Данные анализировали с помощью программного обеспечения FlowJo X (США).

Статистическая обработка. Статистическую обработку выполняли методами непараметрического анализа в программном пакете Statistica 12.5 (Stat Soft Inc., США). Данные представляли в виде *Me* (LQ–UQ), где *Me* – медиана, LQ – нижний квартиль, UQ – верхний квартиль. Для попарного сравнения опытных групп с контрольной использовали *U*-критерий Манна–Уитни. Статистически значимым различие групп считали при $p < 0,05$.

Результаты

Анализ динамики восстановления Т-клеточного звена иммунной системы после введения ЦФ или сублетального облучения начали с оценки динамики общей численности клеток тимуса и селезенки, представленных на графике нормализованных данных (рис. 1), где за единицу принято число клеток у мышей контрольной группы (0-е сутки), и абсолютных значений (табл. 1).

После введения ЦФ численность тимоцитов упала до минимума на 10-е сутки, составив 37 % от уровня контрольной группы, и восстановилась до уровня контроля на 20-е сутки, статистически значимо не меняясь до конца эксперимента. Численность тимоцитов после облучения снижалась более равномерно, к 10-м суткам составив 58 %, а к 20-м суткам – 36 % от уровня контрольной группы. Но и восстановление численности началось позже, достигнув к 30-м суткам 57 %, а к 60-м суткам – только 65 % от уровня контрольной группы, то есть не достигнув показателей интактных животных.

Численность спленоцитов после однократного введения ЦФ статистически значимо снизилась только к 20-м суткам и составила 47 % от уровня контрольной

группы, оставаясь достоверно ниже уровня контроля к 30-м суткам (55 %) и полностью восстановившись к концу эксперимента. После сублетального рентгеновского облучения численность спленоцитов снизилась до 39 % от уровня контрольной группы уже на 10-е сутки и оставалась на низком уровне вплоть до 30-х суток, составляя соответственно 40 и 53% на 20-е и 30-е сутки. Однако к концу эксперимента число клеток в селезенке возросло до 116 % от уровня контроля, статистически значимо превысив число клеток у интактных мышей.

При оценке популяционного состава тимоцитов после воздействия ЦФ (рис. 2, табл. 2) было показано, что численность наиболее юной популяции – DN-timoцитов – после снижения на 10-е сутки до 30 % выросла более чем 3 раза по сравнению с уровнем контрольной группы к 20-м суткам, оставаясь в 1,6 раза выше на 30-е сутки и вернувшись к уровню интактных мышей на 60-е сутки. После облучения численность DN-timoцитов (рис. 2, табл. 2) снизилась до минимума только к 20-м суткам – 18 % от уровня контрольной группы, к 30-м суткам достигла выраженного пика восстановления, в 2,2 раза превышающего уровень контрольной группы. К концу эксперимента численность DN-timoцитов снова достоверно снизилась до 76 % от уровня интактных животных.

Более детальный субпопуляционный анализ DN-timoцитов (рис. 3, табл. 3) показал, что при введении ЦФ после статистически значимого уменьшения численности всех субпопуляций DN-timoцитов на 10-е сутки резкий рост численности всей популяции на 20-е сутки в основном был обусловлен ростом численности DN4, которая почти в 11 раз превышала уровень контрольной группы, тогда как для DN1 и DN3 этот рост достигал 230 и 140 %, а для DN2 – только 50 % от уровня контрольной группы. К 60-м суткам все субпопуляции DN-timoцитов, кроме DN2, достигли уровня интактных мышей, а численность DN2 к концу эксперимента составила только 40 % от уровня контрольной группы.

При анализе динамики восстановления DN-timoцитов после сублетального облучения (см. рис. 3, табл. 3) было установлено, что основной вклад в восстановление численности DN-timoцитов на 30-е сутки, как и при воздействии ЦФ, вносили DN4, а самой чувствительной оказалась DN2-субпопуляция. Важной особенностью динамики восстановления тимопоэза после сублетального облучения стало статистически

Рис. 1. Динамика восстановления общей клеточности в тимусе и селезенке после введения циклофосфана (ЦФ)/облучения (здесь и на рис. 2–6 данные нормализованы относительно контроля)

значимое превышение DN4-субпопуляцией в 1,5 раза уровня контроля. К 20-м суткам, времени наиболее выраженного снижения численности всей популяции DN-timoцитов, уровень DN1 упал до 70 %, DN2 – до 10 %, DN3 – до 12 % и DN4 – до 21 % от уровня контрольной группы, все отличия статистически достоверны. На 30-е сутки численность субпопуляций DN3 и DN4 выросла и превысила уровень интактных мышей в 1,6 и 7 раз соответственно, а численность субпопуляций DN1 и DN2 осталась ниже уровня контрольной группы и составила 54 % и 28 % соответственно. Однако в отличие от группы с цитостатиком к 60-м суткам после сублетального облучения большая часть DN-субпопуляций не достигла уровня контрольной группы. Только численность субпопуляции DN4 в 1,5 раза превышала уровень контроля, численность всех остальных субпопуляций была снижена. Численность субпопуляций DN1, DN2 и DN3 составляла 58, 51 и 63 % от уровня интактных животных соответственно.

Динамика изменения численности более зрелой DP-популяции (см. рис. 2, табл. 2), самой многочисленной среди тимоцитов, практически полностью сов-

Таблица 1. Численность клеток в тимусе и селезенке мышей линии C57BL/6 после воздействия циклофосфана (ЦФ) и облучения, млн

Сутки	Тимус		Селезенка	
	ЦФ	4 Гр	ЦФ	4 Гр
0	162,80 (142,30–183,00)		127,88 (118,50–139,50)	
10	60,00* (57,00–66,00)	94,50* (72,00–102,00)	100,50 (91,00–100,50)	49,50* (25,50–75,00)
20	165,00 (154,00–172,00)	58,00* (50,50–59,00)	60,50 (56,50–64,50)*	51,00* (49,50–63,00)
30	155,00 (155,00–159,00)	93,00* (76,50–103,50)	70,00* (62,50–71,25)	67,50* (67,50–79,50)
60	152,00 (148,50–162,00)	106,00* (88,00–112,00)	140,00 (110,00–148,50)	148,00* (146,00–158,00)

Примечание. Здесь и в табл. 2–5: * – $p < 0,05$ в сравнении с контролем.

Рис. 2. Динамика восстановления основных субпопуляций тимоцитов (DN, DP, SP)

Здесь и на рис. 3: А – после введения циклофосфана (ЦФ); Б – после облучения.

Рис. 3. Динамика восстановления субпопуляций DN-timoцитов

падала с динамикой изменения общей численности всех тимоцитов. Так, после введения ЦФ численность DP-timoцитов на 10-е сутки снизилась до 40 %, а уже к 30-м суткам восстановилась до уровня контрольной группы. После сублетального облучения численность DP-timoцитов снижалась более равномерно, достигнув 63 и 28 % от уровня контрольной группы на 10-е и 20-е сутки соответственно, после чего происходило частичное восстановление их численности до 55 % к 30-м суткам, которое сохранялось вплоть до 60-х суток, времени окончания эксперимента.

Динамика изменения численности зрелых SP-популяций после воздействия цитостатика в целом по-

вторяла динамику снижения и восстановления DP-популяции, только в случае SP CD4⁺-популяции нормализованные по отношению к контролю показатели в фазе восстановления были несколько ниже – 20 % на 10-е сутки (отличие достоверное по отношению к показателям контрольной группы) и от 80 до 70 % с 20-х по 60-е сутки, а в случае SP CD8⁺-популяции, наоборот, значительно выше – также 20 % на 10-е сутки, но уже 250 % на 20-е сутки, 150 % на 30-е сутки и 120 % на 60-е сутки. Отличия от контроля во всех точках, кроме 60-х суток, были достоверными. В то же время после рентгеновского облучения динамика восстановления SP-популяций значительно отличалась от динамики

Таблица 2. Численность субпопуляций тимоцитов мышей линии C57BL/6 после воздействия циклофосфана (ЦФ) и облучения, млн

Сут-ки	CD4 ⁺ CD8 ⁺ (DN)		CD4 ⁺ CD8 ⁺ (DP)		CD4 ⁺ (SP)		CD8 ⁺ (SP)	
	ЦФ	4 Гр	ЦФ	4 Гр	ЦФ	4 Гр	ЦФ	4 Гр
0	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	0,92 (0,88–1,2)	1,57* (1,19–1,59)	51,41* (49,17–54,36)	87,60* (63,72–93,43)	3,60* (3,59–3,97)	5,11* (4,77–5,50)	0,86* (0,74–0,94)	1,06* (0,97–1,18)
20	8,61* (4,15–13,83)	0,48* (0,33–0,61)	129,69 (123,35–142,07)	38,52* (35,70–41,52)	13,25 (12,04–13,52)	10,30* (9,97–11,77)	8,62* (4,5–13,04)	3,15 (3,01–3,79)
30	4,33* (4,28–4,4)	5,96* (5,68–6,08)	130,86 (128,65–131,60)	74,31* (61,28–84,35)	14,21 (13,94–15,5)	8,24* (7,22–9,67)	5,22* (5,08–6,39)	2,29 (1,92–2,60)
60	2,35 (1,81–2,74)	2,05* (1,76–2,19)	131,48 (129,64–135,27)	75,79* (65,13–75,93)	12,58 (12,28–14,23)	24,18 (19,36–24,69)	4,01 (3,25–4,1)	1,69* (1,67–2,27)

восстановления DP-timoцитов. Максимальное снижение численности SP-популяций наблюдалось уже на 10-е сутки после облучения, то есть на 10 суток раньше, чем в случае DP- и DN-timoцитов, и достигало 31 % как для SP CD4⁺, так и для SP CD8⁺-популяций. Восстановление SP-timoцитов также начиналось на 10 дней раньше: на 20-е сутки численность SP CD4⁺-популяции составляла 59 %, на 30-е сутки – 47 %, а на 60-е сутки уже превосходила уровень контрольной группы в 1,4 раза. Численность SP CD8⁺-популяции на 20-е сутки составляла 91 % от уровня контроля, но затем постепенно снижалась до 66 и 49 % на 30-е и 60-е сутки соответственно.

В целом, полученные результаты указывают на более глубокие повреждения тимуса при облучении, чем при воздействии ЦФ, затрагивающие не только быстро-деляющиеся тимоциты, но и клетки стромы тимуса, а возможно, и гемопоэтические клетки – костномозговые предшественники тимоцитов.

Анализ восстановления периферического отдела Т-клеточного звена иммунной системы был выполнен на спленоцитах мышей, подвергшихся воздействию ЦФ или сублетального облучения. Изначально была проведена оценка динамики численности Т-хелперов и ЦТЛ среди спленоцитов (рис. 4, табл. 4).

После введения ЦФ динамика изменения численности Т-хелперов и ЦТЛ в селезенке в целом соответствовала динамике изменения общей численности спленоцитов – с максимальным снижением относительно показателей контрольной группы обеих популяций на 20-е сутки и с постепенным восстановлением

к 60-м суткам. При этом снижение численности было более выраженным, а восстановление – менее полным среди ЦТЛ, чем среди Т-хелперов. Так, численность Т-хелперов достигла минимальных значений на 20-е сутки и составила 48 % от уровня контрольной группы, на 30-е сутки она восстановилась до 62 % и достигла уровня контроля на 60-е сутки после введения ЦФ. Численность ЦТЛ постепенно снижалась до 54 % на 10-е сутки, 26 % на 20-е сутки и 25 % на 30-е сутки после введения ЦФ, и только к 60-м суткам восстановилась до 76 % от уровня контрольной группы. Все описанные изменения были статистически достоверными.

Изменение численности Т-хелперов и ЦТЛ после сублетального облучения было более выражено, при этом популяция CD8⁺-Т-клеток, как и в случае введения ЦФ, страдала в большей степени, чем популяция CD4⁺-Т-клеток. Численность Т-хелперов менялась следующим образом: 62, 30, 42 и 137 % от уровня контрольной группы на 10, 20, 30 и 60-е сутки соответственно. Численность ЦТЛ составила 16, 20, 28 и 65 % от уровня контроля на 10, 20, 30 и 60-е сутки соответственно. Таким образом, восстановление ЦТЛ было неполным, как и в группе с введением ЦФ.

Предполагая участие гомеостатической пролиферации в восстановлении периферических Т-клеток при развитии Т-лимфопении после воздействия повреждающих факторов и, как следствие, конверсию фенотипа наивных Т-клеток, при которой они приобретают фенотип Т-клеток памяти без контакта с антигеном, мы

Таблица 3. Численность DN-timoцитов мышей линии C57BL/6 после действия циклофосфана (ЦФ)/облучения, млн

Сут-ки	DN1		DN2		DN3		DN4	
	ЦФ	4 Гр	ЦФ	4 Гр	ЦФ	4 Гр	ЦФ	4 Гр
0	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	0,14* (0,13–0,21)	0,11* (0,10–0,12)	0,064* (0,05–0,065)	0,03* (0,02–0,03)	0,41* (0,29–0,43)	0,34* (0,30–0,41)	0,32* (0,2–0,33)	0,94* (0,72–1,01)
20	0,56* (0,41–0,71)	0,19* (0,13–0,21)	0,36* (0,24–0,43)	0,01* (0,01–0,01)	1,49* (1,34–2,1)	0,12* (0,12–0,13)	6,62* (2,38–9,81)	0,13* (0,10–0,14)
30	0,41 (0,32–0,43)	0,13* (0,09–0,13)	0,67 (0,56–0,71)	0,22* (0,22–0,26)	1,41 (1,32–1,5)	1,68* (1,50–1,84)	2,13* (1,65–2,27)	4,23* (3,31–4,30)
60	0,22 (0,20–0,23)	0,14* (0,09–0,16)	0,30* (0,26–0,28)	0,40* (0,29–0,41)	0,96 (0,83–1,39)	0,65* (0,54–0,72)	0,69 (0,49–0,93)	0,90 (0,62–1,01)

Рис. 4. Динамика восстановления Т-хелперов и цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ) в селезенке после действия циклофосфана (ЦФ)/облучения

Рис. 5. Динамика восстановления возрастных субпопуляций Т-хелперов в селезенке после действия циклофосфана (ЦФ)/облучения

исследовали динамику восстановления численности наивных (Tnaïve) и центральных Т-клеток памяти (Tcm) среди Т-хелперов (рис. 5, табл. 5) и ЦТЛ (рис. 6, табл. 5).

После введения ЦФ численность наивных Т-хелперов значительно снизилась, оставаясь ниже уровня контрольной группы вплоть до 60-х суток, когда она достигла 65 % от уровня контрольной группы. В то же время численность Т-хелперов с фенотипом центральных Т-клеток памяти снижалась менее выражено на всем протяжении восстановительного периода, а на 60-е сутки в 1,9 раза превышала уровень контрольной группы. Соотношение наивных Т-хелперов и Т-хелперов с фенотипом центральных клеток памяти (Tnaïve/Tcm) снизилось с 23,6 (показатель контрольной группы) до 10,4 (рис. 7). Аналогичная динамика изменения численности наивных Т-хелперов и Т-хелперов с фенотипом центральных клеток памяти наблюдалась после сублетального облучения. При этом на 60-е сутки их численность составила 105 и 245 % соответственно, а соотношение Tnaïve/Tcm снизилось с 23,6 до 9,9.

При оценке численности возрастных популяций ЦТЛ (см. рис. 6, табл. 5) наблюдалась та же тенденция к более выраженному снижению численности наивных Т-клеток по сравнению с центральными Т-клетками па-

мяти на всем протяжении периода восстановления как после введения ЦФ, так и после рентгеновского облучения. На 60-е сутки после введения ЦФ численность наивных ЦТЛ составила 76 %, ЦТЛ с фенотипом центральных клеток памяти – 125 % от уровня контрольной группы, а соотношение Tnaïve/Tcm снизилось с 3,9 до 2,4 по отношению к контрольной группе (см. рис. 7). После сублетального облучения на 60-е сутки численность наивных ЦТЛ составила 50 %, ЦТЛ с фенотипом центральных клеток памяти – 141 % от уровня контрольной группы, а соотношение Tnaïve/Tcm снизилось с 3,9 до 1,7 по отношению к контрольной группе.

Таким образом, развившаяся Т-лимфопения независимо от повреждающего фактора приводила к конверсии фенотипа наивных Т-клеток как среди Т-хелперов, так и среди ЦТЛ.

Обсуждение

Воздействие цитостатика и ионизирующего излучения на организм животных приводит к развитию лимфопении, затрагивающей как периферические, так и центральные органы иммунной системы, в частности селезенку и тимус.

Таблица 4. Численность спленоцитов мышей линии C57BL/6 после действия циклофосфана (ЦФ)/облучения, млн

Сутки	Т-хелперы		ЦТЛ	
	ЦФ	4 Гр	ЦФ	4 Гр
0	26,17 (23,93–29,41)		24,9 (24,38–26,26)	
10	17,67 (14,39–20,19)	16,53* (5,70–16,75)	13,39 (12,55–13,58)*	4,05* (2,56–6,35)
20	12,61 (12,17–13,29)*	7,87* (7,46–8,18)	6,55 (6,16–7,28)*	5,17* (4,57–5,19)
30	16,34 (12,73–17,66)*	11,07* (8,50–11,73)	6,14 (6,13–6,60)*	7,00* (5,76–7,59)
60	27,37 (21,52–27,39)	36,51* (30,36–36,76)	18,97 (13,58–20,45)*	16,46* (14,74–17,20)

Рис. 6. Динамика восстановления возрастных субпопуляций цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ) в селезенке после действия циклофосфана (ЦФ)/облучения

В проведенном исследовании было установлено, что в тимусе численность клеток достигает минимума на 10-е сутки после воздействия ЦФ и на 20-е сутки после сублетального рентгеновского облучения. В то же время после введения ЦФ уже на 20-е сутки численность тимоцитов восстанавливается до уровня контрольной группы, а после сублетального облучения даже на 60-е сутки, в последний день наблюдения, не достигает уровня контроля. Можно предположить, что более позднее снижение численности тимоцитов при сублетальном облучении обусловлено пиком экстренной регенерации тимуса, который следует за более выраженным снижением численности тимоцитов на 5-е сутки после сублетального облучения [8], а менее эффективное восстановление тимопоэза после сублетального облучения, возможно, свидетельствует о более глубоком повреждении органа, в частности тимусного эпителия, который отвечает за дифференцировку тимоцитов, и, соответ-

Рис. 7. Изменение соотношения наивных и центральных Т-клеток памяти среди Т-хелперов и цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ) в селезенке на 60-е сутки после действия циклофосфана (ЦФ)/облучения

ственно, о большей устойчивости тимусных эпителиальных клеток к повреждающему действию ЦФ в терапевтических дозах.

В пользу данных предположений говорит и анализ динамики восстановления отдельных субпопуляций тимоцитов. Так, на 10-е сутки после сублетального облучения в отсутствие роста численности DN1-субпопуляции, отражающей поступление предшественников тимоцитов из костного мозга, наблюдается рост численности DN4-субпопуляции, сопровождающийся последующим ростом численности CD4⁺-SP- и CD8⁺-SP-субпопуляций на 20-е сутки, что, скорее всего, свидетельствует об экстренном восстановлении тимуса на 10-е сутки за счет дифференцировки радиоустойчивой субпопуляции DN-timoцитов, например за счет DN2-субпопуляции, которая по результатам ранее проведен-

Таблица 5. Численность «возрастных» субпопуляций Т хелперов (CD4⁺) и ЦТЛ (CD8⁺) мышей линии C57BL/6 после действия циклофосфана (ЦФ)/облучения, млн

Сутки	CD4 ⁺ -Tnaïve		CD4 ⁺ -Tcm		CD8 ⁺ -Tnaïve		CD8 ⁺ -Tcm	
	ЦФ	4 Гр	ЦФ	4 Гр	ЦФ	4 Гр	ЦФ	4 Гр
0	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	8,77* (7,18–9,81)	5,86* (1,88–6,01)	0,79 (0,65–0,94)	0,64 (0,19–0,73)	5,41* (4,31–5,59)	1,19* (0,49–1,44)	1,36* (1,17–1,36)	1,62* (0,90–2,59)
20	5,81* (5,18–5,97)	3,61* (3,55–3,64)	0,43* (0,38–0,46)	0,31* (0,23–0,37)	3,94* (3,85–4,12)	1,43* (1,34–1,48)	0,94* (0,92–1,21)	1,67* (1,48–1,75)
30	8,87* (7,7–8,93)	5,24* (3,86–5,25)	0,40* (0,4–0,59)	0,51* (0,34–0,63)	3,40* (3,35–3,95)	2,77* (2,63–2,94)	1,07* (0,64–1,08)	1,83* (1,81–2,38)
60	13,94* (9,1–15,38)	21,35 (16,24–22,06)	1,51* (0,84–1,59)	1,91* (1,81–1,95)	11,82* (7,55–12,01)	7,69* (7,68–8,90)	4,29 (3,18–5,07)	4,86* (4,57–5,29)

ных работ была определена как наиболее резистентная к действию радиационного облучения по сравнению с остальными популяциями тимоцитов [9].

Рост численности наиболее юной субпопуляции, DN-timoцитов, достигает пика на 20-е сутки после введения ЦФ и на 30-е сутки после облучения, который в случае воздействия цитостатика сопровождается одновременным ростом численности всех остальных, более зрелых, субпопуляций до и выше уровня интактных мышей, а в случае рентгеновского облучения – менее выраженным ростом, статистически значимо не достигающим уровня контроля даже к последнему дню эксперимента через 60 дней после облучения, что, по всей вероятности, и свидетельствует о нарушении процесса дифференцировки тимоцитов при радиационном поражении. Более глубокое поражение тимуса при облучении согласуется с результатами ранее выполненных работ [4, 10, 11].

Однако, несмотря на столь значимые различия в восстановлении тимопоэза, восстановление численности спленоцитов, включая Т-лимфоциты, на 60-е сутки было одинаково эффективным как после воздействия ЦФ, так и после сублетального рентгеновского облучения – для Т-хелперов оно было полным, а для ЦТЛ частичным, что говорит о сходном уровне поражения стромы периферических лимфоидных органов и о задействовании одинаковых механизмов периферического восстановления при развитии Т-лимфопении, в частности, о гомеостатической пролиферации Т-клеток [12, 13], которая приводит к накоплению сур-

рогатных Т-клеток памяти, о чем свидетельствует как увеличение абсолютной численности лимфоцитов с фенотипом центральных Т-клеток памяти, так и снижение соотношения численности наивных Т-клеток и центральных Т-клеток памяти (Tnaïve/Tcm).

Заключение

Можно констатировать, что Т-клеточное звено иммунной системы более чувствительно к ионизирующему облучению, чем к действию цитостатиков. При этом облучение в значительной степени повреждает не только лимфоидные элементы, но и строму тимуса. Оба вида воздействия приводят к снижению численности наивных Т-клеток и накоплению суррогатных Т-клеток памяти, следствием чего должно стать сужение репертуара Т-клеточных рецепторов, развитие иммунодефицита и различных иммунопатологических состояний, связанных с Т-клеточным ответом, что следует учитывать при выборе терапии, требующей назначения цитостатиков или ионизирующего облучения, а также последующего корригирующего лечения.

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

■ Литература

- 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>.
- Суслов А.П., Караулов А.В., Геринг С., Брондз Б.Д. Чувствительность предшественников субпопуляций Т-лимфоцитов к циклофосфамиду и гидрокортизону. *Иммунология.* 1980; 2: 53–6.
- Ярилин А.А. *Иммунология: учебник.* Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2010: 752 с.
- Донецкова А.Д., Шарова Н.И., Никонова М.Ф., Митин А.Н., Литвина М.М., Комогорова В.В., Ярилин А.А. Вклад тимуса в восстановление популяции Т-клеток после действия различных повреждающих агентов. *Иммунология.* 2013; 6: 309–13.
- Митин А.Н., Литвина М.М., Комогорова В.В., Шарова Н.И., Ярилин А.А. Вклад гомеостатической пролиферации и связанных с ней процессов в восстановление популяции периферических Т-клеток в условиях лимфопении, индуцированной облучением. *Иммунология.* 2013; 5: 242–7.
- Hickman S.P., Turka L.A. Homeostatic T cell proliferation as a barrier to T cell tolerance. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 2005; 360 (1461): 1713–21. DOI: <https://doi.org/10.1098/rstb.2005.1699>
- Arai Y., Choi U., Corsino C.I., Koontz S.M., Tajima M., Sweeney C.L., Black M.A., Feldman S.A., Dinanuer M.C., Malech H.L. 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>

■ References

- 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>.

- Митин А.Н., Комогорова В.В., Литвина М.М., Шевелев С.В., Шарова Н.И., Ярилин А.А. Динамика субпопуляций при регенерации тимуса после облучения. *Иммунология.* 2012; 33 (6): 297–302.
- Calvo-Asensio I., Sugrue T., Bosco N., Rolink A., Ceredig R. DN2 thymocytes activate a specific robust DNA damage response to ionizing radiation-induced DNA double-strand breaks. *Front. Immunol.* 2018; 9: 1312. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01312>
- Hiesche K.D., Révész L. The role of bone marrow in different phases of the cellular repopulation of irradiated mouse thymus. *Beitr. Pathol.* 1975; 155 (2): 181–92. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0005-8165\(75\)80191-0](https://doi.org/10.1016/s0005-8165(75)80191-0)
- Лебединская Е.А., Лебединская О.В., Годовалов А.П., Прокудин В.С. Иммуноморфологические особенности тимуса крыс на фоне введения цитостатика в эксперименте. *Саратовский научно-медицинский журнал.* 2016; 1: 12–4.
- Wu T., Plett P.A., Chua H.L., Jacobsen M., Sandusky G.E., MacVittie T.J., Orschell C.M. Immune reconstitution and thymic involution in the acute and delayed hematopoietic radiation syndromes. *Health Phys.* 2020; 119 (5): 647–58. DOI: <https://doi.org/10.1097/HP.0000000000001352>
- Włodarczyk M., Ograczyk E., Kowalewicz-Kulbat M., Druszczyńska M., Rudnicka W., Fol M. effect of cyclophosphamide treatment on central and effector memory T cells in mice. *Int. J. Toxicol.* 2018; 37 (5): 373–82. DOI: <https://doi.org/10.1177/1091581818780128>

- Suslov A.P., Karaulov A.V., Gering S., Brondz B.D. Sensitivity of T-lymphocyte precursors to cyclophosphamide and hydrocortisone. *Immunologiya.* 1980; 2: 53–6. (in Russian)

3. Yarilin A.A. Immunology: Textbook. Moscow: GEOTAR-Media, 2010: 752 p. (in Russian)

4. Donetskova A.D., Sharova N.I., Nikonova M.F., Mitin A.N., Litvina M.M., Komogorova V.V., Yarilin A.A. Role of thymus in recovery of T-cells population after influence of various damaging agents. *Immunologiya*. 2013; 6: 309–13. (in Russian)

5. Mitin A.N., Litvina M.M., Komogorova V.V., Sharova N.I., Yarilin A.A. Contribution of homeostatic proliferation and related processes to restoration of peripheral T cell population in irradiation induced lymphopenia. *Immunologiya*. 2013; 5: 242–7. (in Russian)

6. Hickman S.P., Turka L.A. Homeostatic T cell proliferation as a barrier to T cell tolerance. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 2005; 360 (1461): 1713–21. DOI: <https://doi.org/10.1098/rstb.2005.1699>

7. Arai Y., Choi U., Corsino C.I., Koontz S.M., Tajima M., Sweeney C.L., Black M.A., Feldman S.A., Dinanuer M.C., Malech H.L. 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>

8. Mitin A.N., Komogorova V.V., Litvina M.M., Shevelev S.V., Sharova N.I., Yarilin A.A. Dynamics of populations thymocytes during the regeneration of the thymus after irradiation. *Immunologiya*. 2012; 33 (6): 297–302. (in Russian)

Сведения об авторах

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

Вериге Кристина Сергеевна – студент МГАВМиБ МВА имени К.И. Скрябина, Москва, Российская Федерация
E-mail: verigo.kristina@yandex.ru
<http://orcid.org/0000-0002-1721-6479>

Мухина Елена Александровна – науч. сотр. лаб. дифференцировки лимфоцитов ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Москва, Российская Федерация
E-mail: mukhina_mnioi@mail.ru
<http://orcid.org/0000-0002-4197-9492>

Шарова Нина Ивановна – канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. 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 – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. 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 – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. 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 – канд. биол. наук, доцент кафедры иммунологии и биотехнологии МГАВМиБ – МВА имени К.И. Скрябина, Москва, Российская Федерация
E-mail: s.marzanova@mail.ru
<http://orcid.org/0000-0001-9895-8046>

Донецкова Альмира Дмитриевна – д-р мед. наук, вед. науч. сотр. лаб. дифференцировки лимфоцитов ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России; проф. кафедры иммунологии МБФ РНИМУ им. Н.И. Пирогова, Москва, Российская Федерация
E-mail: almira_donetskova@yahoo.com
<http://orcid.org/0000-0003-2465-2444>

Митин Александр Николаевич – канд. мед. наук, зав. лаб. дифференцировки лимфоцитов ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Москва, Российская Федерация
E-mail: mitin@inbox.ru
<http://orcid.org/0000-0003-1333-0757>

9. Calvo-Asensio I., Sugrue T., Bosco N., Rolink A., Ceredig R. DN2 thymocytes activate a specific robust DNA damage response to ionizing radiation-induced DNA double-strand breaks. *Front. Immunol.* 2018; 9: 1312. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01312>

10. Hiesche K.D., Révész L. The role of bone marrow in different phases of the cellular repopulation of irradiated mouse thymus. *Beitr. Pathol.* 1975; 155 (2): 181–92. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0005-8165\(75\)80191-0](https://doi.org/10.1016/s0005-8165(75)80191-0)

11. Lebedinskaya E.A., Lebedinskaya O.V., Godovalov A.P., Prokudin V.S. Immunomorphological features of rats' thymus after cytostatic injection in the experiment. *Saratov Scientific and Medical Journal.* 2016; 12 (1): 12–4. (in Russian)

12. Wu T., Plett P.A., Chua H.L., Jacobsen M., Sandusky G.E., MacVittie T.J., Orschell C.M. Immune reconstitution and thymic involution in the acute and delayed hematopoietic radiation syndromes. *Health Phys.* 2020; 119 (5): 647–58. DOI: <https://doi.org/10.1097/HP.0000000000001352>

13. Włodarczyk M., Ograczyk E., Kowalewicz-Kulbat M., Druszczyńska M., Rudnicka W., Fol M. effect of cyclophosphamide treatment on central and effector memory T cells in mice. *Int. J. Toxicol.* 2018; 37 (5): 373–82. DOI: <https://doi.org/10.1177/1091581818780128>

Authors' information

Ekaterina K. Grinko – Student of MVA named after K.I. Skryabin, Moscow, Russian Federation
E-mail: virys.s@yandex.ru
<http://orcid.org/0000-0002-2771-4535>

Kristina S. Verigo – Student of MVA named after K.I. Skryabin, Moscow, Russian Federation
E-mail: verigo.kristina@yandex.ru
<http://orcid.org/0000-0002-1721-6479>

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

Nina I. Sharova – PhD, Leader Researcher of the Lymphocyte Differentiation Lab., NRC «Institute of Immunology» FMBA of Russia, Moscow, Russian Federation
E-mail: ni_sharova@mail.ru
<http://orcid.org/0000-0002-6774-961X>

Viktoriya V. Komogorova – PhD, Senior Researcher of the Lymphocyte Differentiation Lab., 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 Lymphocyte Differentiation Lab., 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 Professor of the Immunology and Biotechnology Chair, MVA named after K.I. Skryabin, Moscow, Russian Federation
E-mail: s.marzanova@mail.ru
<http://orcid.org/0000-0001-9895-8046>

Almira D. Donetskova – MD, PhD, Leader Researcher of the Lymphocyte Differentiation Lab., NRC «Institute of Immunology» FMBA of Russia; Prof. of Immunology Chair, MBF N.I. Pirogov RNMU, Moscow, Russian Federation
E-mail: almira_donetskova@yahoo.com
<http://orcid.org/0000-0003-2465-2444>

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