

# ИССЛЕДОВАНИЕ ДОЛГОСРОЧНОГО ЭФФЕКТА ВЫСОКИХ ДОЗ ЦИКЛОФОСФАМИДА НА РЕПЕРТУАР Т-КЛЕТОЧНЫХ РЕЦЕПТОРОВ Т-ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ С АУТОИММУННЫМИ ВАСКУЛИТАМИ

Е. М. Мерзляк<sup>1</sup>, С. А. Касацкая<sup>1</sup>, А. В. Сосновская<sup>2</sup>, М. А. Израэльсон<sup>1</sup>, Д. Б. Староверов<sup>1</sup>, Т. О. Наконечная<sup>1</sup>, П. И. Новиков<sup>2</sup>, Д. М. Чудаков<sup>1</sup>, О. В. Британова<sup>1</sup>✉

<sup>1</sup> Институт биоорганической химии имени академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва

<sup>2</sup> Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва

Механизмы развития аутоиммунных васкулитов и полиангиитов мало изучены, однако известно, что патогенез этих заболеваний в значительной степени опосредуется Т-лимфоцитами. Циклофосфамид (ЦФ) широко используется для лечения аутоиммунных заболеваний. Клетки лимфоидного ряда (Т, В и НК-клетки), и в особенности наивные Т-лимфоциты, обладают высокой чувствительностью к ЦФ. Мы проанализировали репертуары Т-клеточных рецепторов (T-cell receptors, TCRs) периферической крови молодых (24–35 лет, n = 4) и пожилых (52–68 лет, n = 5) пациентов с синдромами Вегенера и Чарга–Стросса, получавших не ранее чем за 3 года до начала исследования ЦФ в высоких дозах. В контрольную группу включили здоровых доноров: 7 молодых и 14 пожилых людей. Мы не выявили описанных ранее вариантов TCRs, характерных для ANCA-ассоциированных васкулитов. Представленность «публичных» (часто встречающихся в популяции, в значительной степени формирующихся в эмбриональном периоде) вариантов TCRs в репертуарах молодых пациентов оказалась существенно ниже, чем в репертуарах здоровых доноров того же возраста, и была близка к таковой пожилых здоровых доноров. Мы предполагаем, что терапия высокими дозами ЦФ элиминирует значительную часть наивных Т-лимфоцитов молодых доноров, содержащих публичные варианты TCR эмбрионального происхождения. Отдаленные последствия таких изменений в структуре Т-клеточного иммунитета требуют дальнейшего изучения.

**Ключевые слова:** аутоиммунные заболевания, аутоиммунный васкулит, циклофосфамид, Т-клеточный рецептор, наивный Т-лимфоцит, высокопроизводительное секвенирование

**Финансирование:** работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, грант № 16-15-00149. В исследовании было использовано оборудование Центра коллективного пользования ИБХ РАН, поддержанного Министерством образования и науки России, идентификатор соглашения — RFMEFI62117X0018.

✉ Для корреспонденции: Британова Ольга Владимировна  
ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10, г. Москва, 117997; olbritan@gmail.com

Статья получена: 04.10.2017 Статья принята к печати: 25.10.2017

## LONG-TERM EFFECT OF HIGH CYCLOPHOSPHAMIDE DOSES ON THE REPERTOIRE OF T-CELL RECEPTORS OF PERIPHERAL BLOOD T-LYMPHOCYTES IN PATIENTS WITH AUTOIMMUNE VASCULITIS

Merzlyak EM<sup>1</sup>, Kasatskaya SA<sup>1</sup>, Sosnovskaya AV<sup>2</sup>, Israelson MA<sup>1</sup>, Staroverov DB<sup>1</sup>, Nakonechnaya TO<sup>1</sup>, Novikov PI<sup>2</sup>, Chudakov DM<sup>1</sup>, Britanova OV<sup>1</sup>✉

<sup>1</sup> Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

<sup>2</sup> I. M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

Although mechanisms underlying development of autoimmune vasculitis and polyangiitis remain understudied, these pathologies are already known to be largely mediated by T-lymphocytes. Cyclophosphamide (CF) is widely used to treat autoimmune diseases. Lymphoid cells in general (T, B, and NK cells) and naive T-lymphocytes in particular are highly sensitive to CF. In this work we analyzed the repertoires of T-cell receptors (TCRs) in the peripheral blood of young (aged 24 to 35 years, n = 4) and elderly (aged 52 to 68 years, n = 5) patients with ANCA-associated vasculitis (Wegener granulomatosis and Churg–Strauss syndrome) treated with high doses of CF > 3 years before the study. The control group included 7 young and 14 elderly healthy individuals. We revealed no TCR variants previously reported as typically found in patients with ANCA-associated vasculitis. Relative frequency of “public” (often found in a population, largely formed during an embryonic period) TCR variants in the repertoires of young patients was significantly lower than in the repertoires of healthy donors of the same age, and was similar to the elderly healthy donors. We hypothesize that CF-treatment eliminates substantial proportion of naive T-cells in the young donors, that contains “public” TCR variants of fetal origin. Long-term consequences of such changes in the structure of T-cell immunity require further investigations.

**Keywords:** autoimmune disease, autoimmune vasculitis, cyclophosphamide, T-cell receptor, naive T-lymphocyte, high-throughput sequencing

**Funding:** this work was supported by the Russian Science Foundation (Grant No. 16-15-00149). Equipment used in the study was provided by the shared facility of the Institute of Bioorganic Chemistry (the facility is supported by the Ministry of Education and Science of the Russian Federation, project ID RFMEFI62117X0018).

✉ Correspondence should be addressed: Olga Britanova  
ul. Miklukho-Maklaya, d. 16/10, Moscow, Russia, 117997; olbritan@gmail.com

Received: 04.10.2017 Accepted: 25.10.2017

Препараты, обладающие иммуносупрессивными свойствами, нашли широкое применение в терапии аутоиммунных заболеваний. Для лечения патологий с потенциально тяжелым течением, таких как аутоиммунные васкулиты, часто применяют цитостатический препарат циклофосфамид (ЦФ), иммуносупрессивные свойства которого не до конца изучены. ЦФ преобразуется в печени в 4-гидроциклофосфамид, который легко проникает в клетки, где подвергается дальнейшим изменениям: формируется либо активное цитотоксическое вещество фосфорамид, либо — при высоком содержании альдегиддегидрогеназы — неактивное соединение карбоксифосфамид. Клетки лимфоидного ряда (Т, В и НК-клетки) содержат небольшое количество альдегиддегидрогеназы и быстро гибнут при терапии высокими дозами ЦФ. Однако недифференцированные клетки, участвующие в гемопоэзе, характеризуются высоким содержанием альдегиддегидрогеназы и оказываются крайне устойчивыми к действию ЦФ. Таким образом, препарат имеет выраженный иммуносупрессивный, но не миелоаблативный эффект, т. к. стволовые клетки крови сохраняются и в дальнейшем происходит восстановление гемопоэза без необходимости трансплантации костного мозга [1]. Клинически подтверждено, что использование ЦФ в высоких дозах приводит к ремиссии у больных с разными типами аутоиммунных заболеваний (острой апластической анемией, миастенией Гравис, склеродермией и др.), но только у 10 % больных не наблюдается рецидив в течение 5 лет после курса ЦФ [2].

В литературе существуют указания на специфическое воздействие ЦФ на наивные Т-клетки. Так, в работе Gladstone и соавт. [3] приводятся данные о лечении больных, страдающих рассеянным склерозом, с помощью ЦФ. Авторы показали существенное снижение числа наивных Т-лимфоцитов CD45RA<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> по сравнению с популяцией клеток памяти CD45RO<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>. Практически все пациенты сохранили свой иммунологический статус, в том числе устойчивость к перенесенным в детстве инфекциям, которая поддерживается клетками памяти, что свидетельствует об их меньшей чувствительности к ЦФ.

Развитие технологий высокопроизводительного секвенирования качественно изменило глубину анализа репертуара Т-клеточных рецепторов (T-cell receptors, TCR). Совмещение этого подхода с иммунофенотипированием ранее позволило нам сделать ряд выводов о возрастных изменениях в адаптивной иммунной системе. В частности, на когорте доноров разного возраста, включая образцы пуповинной крови и материал от людей старше 100 лет, нами было продемонстрировано, что выраженное снижение доли наивных Т-лимфоцитов в периферической крови коррелирует с уменьшением разнообразия репертуара TCR, а также был описан ряд структурных изменений в нем [4].

Механизмы, лежащие в основе развития васкулитов, остаются малоизученными. Основным маркером заболевания является наличие антител к цитоплазматическим компонентам нейтрофилов (anti-neutrophil cytoplasmic antibody, ANCA). В случае гранулематоза с полиангиитом (ГПА, гранулематоз Вегенера) показано наличие антител к протеиназе-3 (PR-3), а в случае эозинофильного гранулематоза с полиангиитом (ЭГПА, синдром Чарга–Стросса) и микроскопического полиангиита — антител к миелопероксидазе. Считается, что ANCA участвуют в патогенезе заболеваний, взаимодействуя с антигенной мишенью и приводя к дегрануляции нейтрофилов, в результате чего разрушается эндотелий, а затем и сам сосуд [5]. Т-клет-

ки также принимают активное участие в патогенезе перечисленных патологий. У пациентов, страдающих ими, наблюдается повышение числа циркулирующих в периферической крови активированных CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов и увеличение содержания воспалительных факторов, связанных с их активацией. Также гранулемы обычно инфильтрированы активированными Т-клетками [6, 7]. На животных моделях было показано снижение скорости клубочковой инфильтрации при деплеции Т-лимфоцитов [8].

Остается открытым вопрос о том, как ЦФ действует на различные функциональные популяции клеток крови и каково его влияние на адаптивную иммунную систему в долгосрочной перспективе. В последние несколько лет были опубликованы работы с использованием новых технологий, которые посвящены роли ЦФ в восстановлении TCR после аллогенной трансплантации клеток крови и костного мозга. Показано, что прием высоких доз ЦФ на 3–4 сутки после трансплантации существенно снижает риск возникновения острой и хронической реакции «трансплантат против хозяина», а также вирусных инфекций в целом и лимфопролиферативных посттрансплантационных заболеваний, связанных с вирусом Эпштейна–Бара, в частности [9]. В исследовании Капакгу и соавт. показано, что первыми восстанавливаются эффекторные клетки памяти и разнообразие их существенно ниже по сравнению с разнообразием аналогичных клеток донора [10].

В данной работе методом высокопроизводительного секвенирования были исследованы репертуары TCR периферической крови 9 доноров, страдающих васкулитами и имевших в анамнезе прием циклофосфамида в высоких дозах. Акцент сделан на сравнение характеристик репертуара бета-цепей TCR пациентов и здоровых доноров и поиск характерных вариантов TCR либо высокопредставленных V-beta и J-beta сегментов TCR, сцепленных с патологией. Проведена оценка долгосрочного эффекта ЦФ, оказываемого на репертуар TCR периферической крови.

## ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

### Подбор доноров

В рамках исследования сформировали две группы — группу пациентов и группу здоровых доноров (контрольная группа). В каждой группе выделили условные подгруппы молодых (24–35 лет) и пожилых (52–68 лет) людей. В группу молодых пациентов включили 4 человека (3 мужчины и 1 женщина), пожилых — 5 человек (все — женщины), в контрольную группу — 7 (4 мужчины и 3 женщины) и 14 (6 мужчин, 8 женщин) соответственно. Пациенты страдали васкулитами и получали активную иммуносупрессивную терапию циклофосфамидом в высоких дозах не менее чем за 3 года до начала исследования. Когорту здоровых доноров формировали из добровольцев.

Исследование было одобрено локальным этическим комитетом Национального научно-практического центра детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева (Москва) (протокол № 2013-5/4). Все участники дали письменное информированное согласие на участие в исследовании.

### Выделение моноклеаров и иммунофенотипический анализ образцов периферической крови

У участников исследования получали по 8 мл периферической крови, которые использовали для клинического

анализа крови, а также для иммунофенотипирования, которое проводили так, как описано в работе [11]. Брали 100 мкл цельной периферической крови, инкубировали ее с моноклональными антителами: анти-CD45RA-Fitc (eBioscience, Thermo Fisher Scientific, США), CD27-PC5 (eBioscience), CD4-PE (Beckman Coulter, США), CD8-eFluor 405 (eBioscience), — и лизировали раствором Optilyse-C (Beckman Coulter). Образцы анализировали на проточном цитофлуориметре Cytomics CF500 (Beckman Coulter). Также из 6 мл периферической крови методом градиентного центрифугирования на фиколле («ПанЭко», Россия) выделяли мононуклеарную фракцию, которую использовали для дальнейших исследований.

### Выделение тотальной РНК, получение библиотек кДНК TCR и их секвенирование

Тотальную РНК выделяли с помощью реагента Trizol (Invitrogen, США) по протоколу производителя. Количество выделенной РНК определяли по интенсивности флуоресценции интеркалирующего агента на QuBit 3 (Invitrogen), качество полученного препарата оценивали методом геле-электрофореза.

Библиотеки кДНК TCR получали так, как описано в работе [11]. Для синтеза кДНК бета-цепи TCR использовали набор реагентов Mint («Евроген», Россия) и 1,5 мкг РНК на одну реакцию синтеза. Реакцию проводили в соответствии с протоколом производителя. В зависимости от количества выделенной РНК число реакций синтеза для образца варьировало от 4 до 6. Структура праймеров для синтеза и свитч-адаптера, а также программа амплификации описаны в статье [11]. В последовательность свитч-адаптера были введены 12 случайных нуклеотидов для уникального баркодирования каждой синтезированной молекулы кДНК. Схема эксперимента приведена на рис. 1.

Полученную кДНК амплифицировали, объединяли, очищали на колонках Cleanup Standard («Евроген») и концентрировали. Концентрацию полученных библиотек определяли на QuBit 3 (Invitrogen), к концам кДНК лигировали адаптеры Illumina TruSeq (Illumina, США). Далее секвенировали библиотеки на платформе Illumina HiSeq 2000 (Illumina), парное чтение 150 + 150 нуклеотидов.

### Биоинформатическая обработка и анализ данных секвенирования

Демультипликацию данных секвенирования и сборку групп прочтений по молекулярным баркодам проводили с помощью программы MiGEC [12], как описано в работе [11]. Для экстракции CDR3 и сборки T-клеточных клонов использовали программу MiXCR [13]. Качественный анализ клонов (*V*- и *J*-usage, пересечение репертуаров

разных образцов) и оценку разнообразия образцов проводили с помощью пакета программ VDJtools [14].

Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета программ GraphPad Prism5 (Graph Pad Software, США). Анализ публичных клонов проводили с помощью алгоритмов R.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### Цитометрический анализ T-клеточных популяций в периферической крови

Содержание наивных T-лимфоцитов определяли как в популяции CD3<sup>+</sup>-клеток периферической крови, так и во фракциях CD4<sup>+</sup>- и CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов пациентов, страдающих васкулитами и прошедших курс терапии ЦФ в высоких дозах. Популяцию наивных CD3<sup>+</sup>-лимфоцитов выделяли по фенотипу CD3<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>. Полученные данные были сопоставлены с ранее опубликованными нами для когорты здоровых доноров разного возраста [4, 11]. Значимого различия в содержании наивных T-лимфоцитов у пациентов и здоровых доноров одного возраста обнаружено не было (рис. 2, А).

### Анализ разнообразия TCR методом высокопроизводительного секвенирования

Молекулярное баркодирование библиотек кДНК позволило провести коррекцию нуклеотидных замен, произошедших в ходе амплификации и секвенирования библиотек, а для анализа репертуаров TCR пациентов с васкулитами были получены библиотеки кДНК с помощью специфической затравки синтеза и технологии кэп-свитч [4] (рис. 1). Эта технология позволяет равномерно амплифицировать фрагменты, соответствующие различным T-клеточным рецепторам, не искажая данные о представленности различных варибельных генных сегментов. Для подготовки библиотеки каждого образца была использована вся тотальная РНК, выделенная в среднем из 3,5 млн мононуклеаров. Вся полученная кДНК использовалась для дальнейшей амплификации. В результате секвенирования было получено более 30 млн прочтений (ридов), минимальное число ридов, соответствующих последовательностям TCR, для образца составило  $1,3 \times 10^5$ , максимальное —  $6,5 \times 10^6$ . Анализ данных секвенирования проводили с учетом молекулярных баркодов, введенных на стадии синтеза кДНК библиотек репертуаров TCR (рис. 1). В данном эксперименте учитывали только те молекулы кДНК, молекулярный баркод которых покрывался хотя бы 3 ридами. В результате для каждого образца было получено от 27 000 до 400 000 групп ридов, несущих уникальные

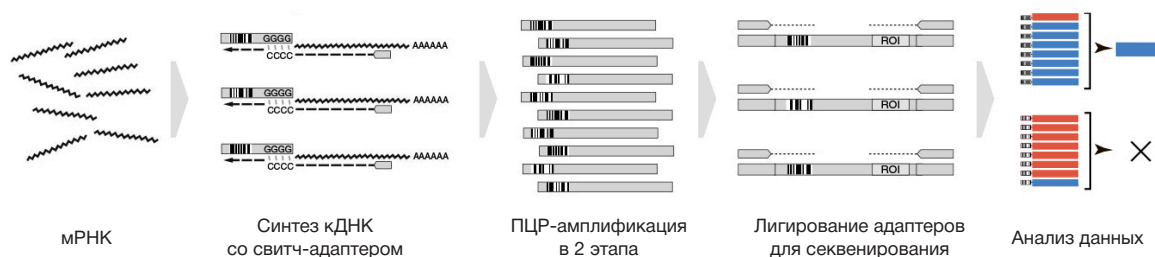


Рис. 1. Схема получения библиотек кДНК T-клеточных рецепторов (T-cell receptors, TCR). Свитч-адаптер содержит уникальную последовательность, обозначенную на рисунке стрих-кодом. Наличие молекулярного баркода позволяет производить коррекцию ошибок, как в упрощенном виде показано на последнем этапе. Амплифицированный фрагмент содержит последовательность CDR3 бета-цепи TCR, которая определяет разнообразие рецепторов

молекулярные баркоды и соответствующих уникальным молекулам кДНК.

Данные секвенирования были нормированы путем экстракции 25 000 случайных молекул кДНК для каждого образца — по наименьшему результату для одного из пациентов. Иными словами, в дальнейшем при анализе учитывали 25 000 уникальных молекул кДНК бета-цепей TCR для каждого образца. Референтная группа была сформирована из данных секвенирования репертуаров TCR когорты здоровых доноров, которые ранее уже были проанализированы аналогичным методом и опубликованы [11]. Данные референтной группы также были проанализированы с нормировкой на 25 000 случайных молекулярных событий на образец. Наш предыдущий экспериментальный опыт показал, что одно событие может быть эквивалентно в среднем одной Т-клетке [15]. Таким образом, разнообразие Т-клеточного репертуара в данном эксперименте оценивали в среднем для 25 000 случайных Т-лимфоцитов периферической крови.

Анализ разнообразия репертуаров бета-цепей TCR проводили с применением таких статистических метрик, как оценка нижней границы разнообразия (индекс Chao1), индекс равномерности распределения (индекс Шеннона-Винера) и наблюдаемое разнообразие CDR3 на 25 000 Т-лимфоцитов.

Мы не выявили значительных изменений в структуре репертуаров TCR у пациентов с васкулитами относительно результатов здоровых доноров (рис. 2, Б–Г). Однако можно отметить, что, несмотря на то, что доля наивных Т-клеток в периферической крови больных практически не отличалась от таковой у здоровых людей, значения индекса Chao1, рассчитанные для них, лежат по нижней границе (рис. 2, Б, Д), что свидетельствует в пользу снижения разнообразия репертуаров TCR.

#### Анализ использования переменных сегментов бета-цепей

В клинических данных вовлеченность клонального ответа Т-клеток в патогенез болезни зачастую оценивается без использования высокопроизводительного секвенирования — по спектротипам, т. е. распределениям длин участков CDR3 TCR в целом и TCR с конкретными V-сегментами.

Ранее для гранулематоза с полиангиитом (ГПА) [18] и эозинофильного гранулематоза с полиангиитом (ЭГПА) [17] анализ спектротипов TCR показал участие клонального либо олигоклонального ответа Т-клеток, несущих TCR с определенными вариантами V-сегментов. В более поздней работе методом проточной цитофлуориметрии было показано значительное увеличение представленности одного или нескольких V-сегментов TCR в периферической крови пациентов с ЭГПА [23].

Эти данные явились предпосылкой для направленного поиска описанных V-сегментов в репертуарах Т-клеток пациентов с ГПА и ЭГПА. Мы проанализировали частоты встречаемости вариантов сегментов бета-цепи в репертуарах TCR пациентов и здоровых доноров и не выявили характерных паттернов экспрессии V- либо J-сегментов TCR, которые бы объединяли репертуары TCR пациентов или здоровых доноров в отдельные различимые кластеры.

#### Поиск CDR3, ассоциированных с ГПА и ЭГПА

На следующем этапе анализа мы провели поиск аннотированных в литературе последовательностей CDR3, ассоци-

ированных как с ГПА, так и с ЭГПА [17, 18, 23], в данных секвенирования пациентов, включенных в наше исследование. Анализ проводили в клонсетах без количественной нормировки по каждому индивидууму. В результате нам не удалось обнаружить мотивы CDR3, опубликованные ранее как ассоциированные с ГПА либо ЭГПА.

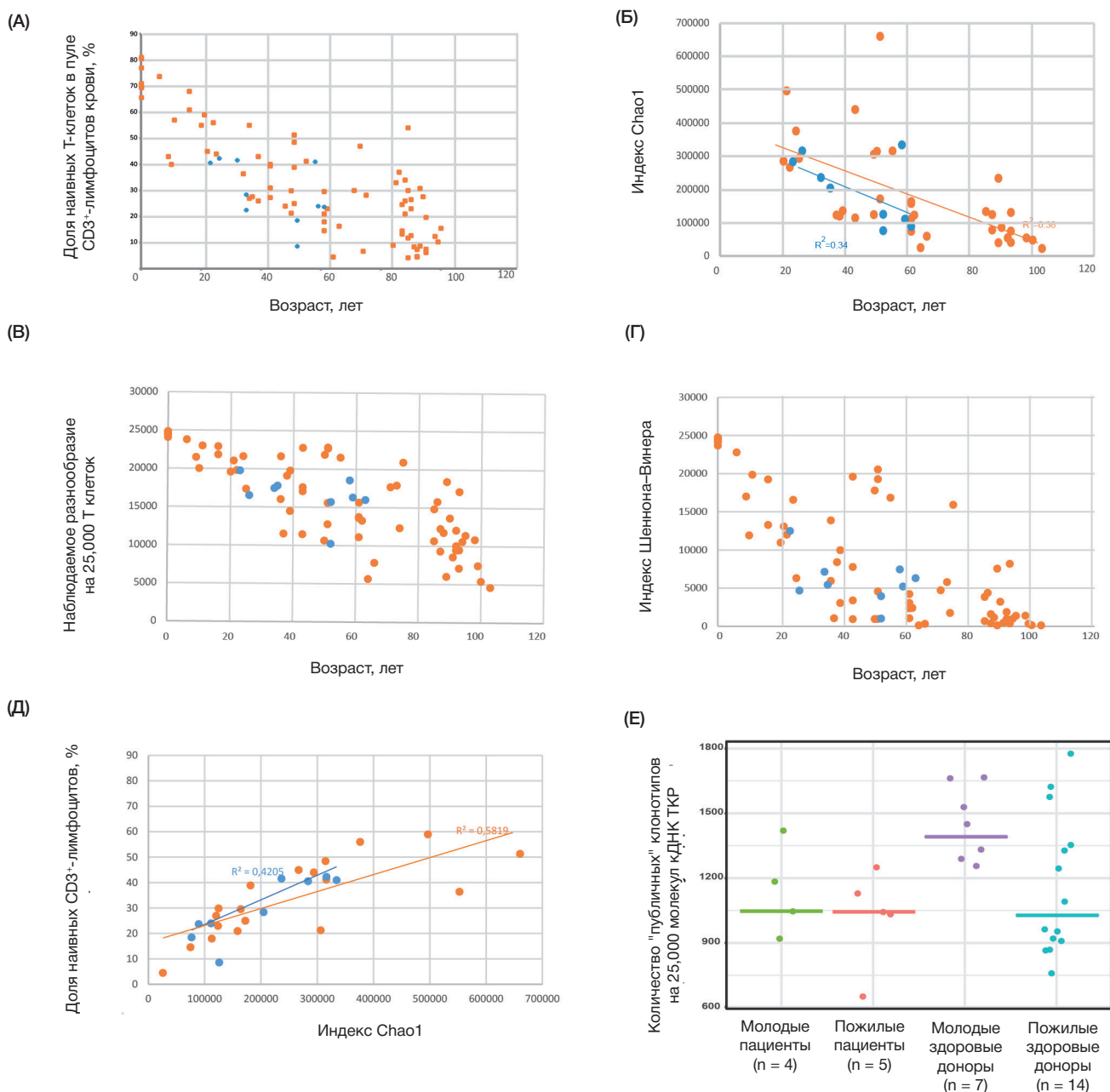
#### Оценка содержания «публичных» клонотипов в репертуаре TCR

Исследования иммунных репертуаров методами высокопроизводительного секвенирования позволяют получить индивидуальный список вариантов последовательностей TCR, которые организм может использовать в адаптивном иммунном ответе. Прочтение миллионов вариантов TCR в наших исследованиях и работах других коллективов позволило обнаружить варианты TCR, которые формируются независимо в иммунных репертуарах неродственных доноров — неуникальные, или «публичные» варианты TCR [11, 19, 20]. Формирование одинаковых последовательностей TCR у неродственных доноров в процессе случайной сборки связывают с вероятностными процессами сборки TCR при рекомбинации, а также с формированием оптимальных клонов TCR для иммунного ответа на широко распространенные инфекции и с коэволюцией сборки TCR с персистирующими, передающимися в поколениях инфекциями. У родственных доноров обнаруживается больше общих вариантов TCR, чем «публичных» клонотипов у неродственных доноров, и в целом генетическое окружение когорты доноров может влиять на анализ «публичного» репертуара в каждом исследовании TCR.

В предыдущей нашей работе было показано, что доля «публичных» клонотипов в репертуаре TCR снижается с возрастом [4]. Таким образом, этот параметр может служить маркером старения репертуара TCR. Ранее нами был сформирован список клонотипов бета-цепей TCR человека, которые присутствуют в репертуарах Т-лимфоцитов разных доноров. В качестве источника «публичных» клонотипов были выбраны данные секвенирования репертуаров TCR пуповинной крови, характеризующиеся высоким разнообразием TCR и значительной долей «публичных» вариантов TCR в репертуаре. Мы отобрали клонотипы с совпадающей аминокислотной последовательностью участка CDR3, которые встретились как минимум в 4 из 8 образцов репертуаров TCR нормальной пуповинной крови. Этот список был обогащен вариантами коротких CDR3, которые формируются в процессе VDJ-рекомбинации, преимущественно в эмбриогенезе, с повышенной частотой [16] и вариантами, в которых отсутствуют случайные N-инсерции нуклеотидов на стыке сегментов V–D либо D–J генов TCR в результате упрощенной VDJ-рекомбинации в эмбриональном периоде до начала экспрессии TdT-трансферазы.

«Публичные» клонотипы бета-цепей TCR, возникшие в эмбриональный период, частично совпадают со списком «супер-публичных» вариантов TCR, которые могут быть обнаружены у взрослых здоровых доноров (от 8 до 85 лет, n = 68, «суперпубличные» клоны обнаруживаются как минимум в 20 образцах из 68; данные не опубликованы).

Как и при оценке разнообразия репертуаров TCR, в данном анализе использовались клонсеты, нормированные на 25 000 молекул кДНК. Используя список, содержащий 7 200 «публичных» клонотипов, мы провели сравнительный анализ частоты их встречаемости в клонсетах референтной когорты здоровых доноров и пациентов



**Рис. 2.** Доля наивных Т-клеток среди CD3<sup>+</sup>-лимфоцитов периферической крови и разнообразие репертуаров бета-цепей Т-клеточных рецепторов (Т-cell receptors, TCR) у пациентов с аутоиммунными васкулитами, получавшими терапию циклофосфамидом в высоких дозах (синие точки), и здоровых людей (оранжевые точки). **(А)** Доля наивных Т-клеток в общем пуле CD3<sup>+</sup>-лимфоцитов. Точки нанесены на график с учетом возраста участников исследования. **(Б)** Разнообразие TCR, оцененное по индексу Chao1. Основной вклад в значение индекса вносят клоны с низкой встречаемостью, т. е. преимущественно TCR наивных Т-лимфоцитов. **(В)** Разнообразие вариантов последовательности CDR3 на 25 000 случайных молекул кДНК бета-цепей TCR. **(Г)** Разнообразие бета-цепей TCR, оцененное по индексу Шеннона–Винера. Важно равномерное распределение клонотипов в репертуаре TCR. **(Д)** Доля наивных Т-клеток в общем пуле CD3<sup>+</sup>-лимфоцитов с учетом значений индекса Chao1. **(Е)** Количество «публичных» клонотипов в клонсетах в зависимости от возраста донора. Для **(Б–Е)** произведены расчеты на 25 000 произвольно выбранных молекул кДНК бета-цепей TCR

с васкулитами, который показал, что у молодых пациентов достоверно ниже число «публичных» клонотипов ( $p = 0,04$ , тест Манна–Уитни, рис. 2, Д) в репертуаре TCR по сравнению со здоровыми людьми того же возраста.

#### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Как уже отмечалось, к настоящему времени не было опубликовано работ по глубокому секвенированию репертуаров TCR пациентов с ГПА и ЭГПА. В одной из работ анализ последовательностей Т-клеточных рецепторов с помощью

секвенирования по Сэнгеру выявил у пациентов с ЭГПА общий мотив CDR3 среди высокопредставленных клонотипов Vbeta21 семейства TCR [17]. Также есть данные о доминирующем клонотипе Vbeta8 семейства при ГПА [18].

В настоящей работе нами не были обнаружены специфичные клонотипы или специфичные паттерны экспрессии семейств V- и J-сегментов, которые бы выделяли группу доноров, страдающих ГПА или ЭГПА, по сравнению со здоровыми донорами такого же возраста. Возможно, исследование на значительно большей выборке пациентов позволит установить Т-клеточные клоны, ассоциированные с болезнью. Так, в недавних исследованиях на выборке из

191 донора, страдающего анкилозирующим спондилитом, и 227 здоровых донорах удалось установить консенсусный мотив CDR3 T-клонов, участвующих в патогенезе этого аутоиммунного заболевания [21]. Также анализ репертуаров TCR, полученных не из периферической крови, а из лимфоцитов, мигрирующих в места воспаления, в совокупности с новыми алгоритмами подсчета вероятности сборки той или иной последовательности CDR3 может привести к успешному решению проблемы идентификации аутоиммунных клонов [22].

Анализ разнообразия репертуаров TCR пациентов с васкулитами показал отсутствие значимых изменений в степени клональности и наблюдаемом разнообразии CDR3 по сравнению с референтной группой. Незначительное изменение в соотношении доли наивных T-лимфоцитов и индекса границы нижнего разнообразия репертуара может указывать на незначительную клональную экспансию наивных T-клеток на периферии, которые количественно восстановились до нормального уровня после лечения ЦФ.

Мы показали, что у молодых пациентов достоверно ниже число «публичных» клонотипов по сравнению со здоровыми донорами того же возраста. Такое изменение структуры репертуара TCR молодых пациентов после терапии ЦФ в высоких дозах может являться признаком преждевременного старения T-клеточного адаптивного

иммунитета. Можно утверждать, что заложенный в эмбриональный период набор «публичных» вариантов TCR наивных T-лимфоцитов существенным образом элиминируется в результате терапии высокими дозами ЦФ. Дальнейшие исследования необходимы для того, чтобы показать, насколько существенны возможные отдаленные последствия таких изменений в структуре T-клеточного иммунитета.

## ВЫВОДЫ

В результате анализа репертуаров T-клеточных рецепторов, полученных методом глубокого секвенирования, было установлено, что репертуары TCR после лечения циклофосфамидом в высоких дозах восстанавливаются в значительной степени. Вместе с тем количество «публичных» клонотипов у пациентов с аутоиммунными васкулитами снижено по сравнению со здоровыми донорами того же возраста, что свидетельствует о преждевременном старении репертуаров TCR.

В данной работе не было обнаружено клональных изменений TCR, сцепленных с аутоиммунными васкулитами. В полученных массивах данных у пациентов не были найдены аннотированные ранее в литературе T-клеточные клонотипы.

## Литература

1. Brodsky RA. High dose cyclophosphamide treatment for autoimmune disorders. *ScientificWorldJournal*. 2002 Jun 28; 2: 1808–15. DOI: 10.1100/tsw.2002.863.
2. DeZern AE, Styler MJ, Drachman DB, Hummers LK, Jones RJ, Brodsky RA. Repeated treatment with high dose cyclophosphamide for severe autoimmune diseases. *Am J Blood Res*. 2013; 3 (1): 84–90.
3. Gladstone DE, Golightly MG, Brannagan TH 3rd. High dose cyclophosphamide preferentially targets naïve T (CD45/CD4/RA+) cells in CIDP and MS patients. *J Neuroimmunol*. 2007 Oct; 190 (1–2): 121–6. DOI: 10.1016/j.jneuroim.2007.07.005.
4. Britanova OV, Shugay M, Merzlyak EM, Staroverov DB, Putintseva EV, Turchaninova MA et al. Dynamics of Individual T Cell Repertoires: From Cord Blood to Centenarians. *J Immunol*. 2016 Jun 15; 196 (12): 5005–13. DOI: 10.4049/jimmunol.1600005.
5. Wilde B, Thewissen M, Damoiseaux J, van Paassen P, Witzke O, Tervaert JWC. T cells in ANCA-associated vasculitis: what can we learn from lesional versus circulating T cells? *Arthritis Res Ther*. 2010; 12 (1): 204. DOI: 10.1186/ar2923.
6. McKinney EF, Willcocks LC, Broecker V, Smith KGC. The immunopathology of ANCA-associated vasculitis. *Semin Immunopathol*. 2014 Jul; 36 (4): 461–78. DOI: 10.1007/s00281-014-0436-6.
7. Giscombe R, Wang XB, Kakoulidou M, Lefvert AK. Characterization of the expanded T-cell populations in patients with Wegener's granulomatosis. *J Intern Med*. 2006 Sep; 260 (3): 224–30. DOI: 10.1111/j.1365-2796.2006.01688.x.
8. Ruth AJ, Kitching AR, Kwan RY, Odobasic D, Ooi JD, Timoshanko J et al. Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies and effector CD4+ cells play nonredundant roles in anti-myeloperoxidase crescentic glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol*. 2006 Jul; 17 (7): 1940–9. DOI: 10.1681/ASN.2006020108.
9. Kanakry CG, Ganguly S, Zahurak M, Bolaños-Meade J, Thoburn C, Perkins B et al. Aldehyde dehydrogenase expression drives human regulatory T cell resistance to posttransplantation cyclophosphamide. *Sci Transl Med*. 2013 Nov 13; 5 (211): 211ra157. DOI: 10.1126/scitranslmed.3006960.
10. Kanakry CG, Coffey DG, Towler AM, Vulic A, Storer BE, Chou J et al. Origin and evolution of the T cell repertoire after posttransplantation cyclophosphamide. *JCI Insight*. 2016; 1 (5): e86252. DOI: 10.1172/jci.insight.86252.
11. Britanova OV, Putintseva EV, Shugay M, Merzlyak EM, Turchaninova MA, Staroverov DB et al. Age-related decrease in TCR repertoire diversity measured with deep and normalized sequence profiling. *J Immunol*. 2014 Mar 15; 192 (6): 2689–98. PubMed PMID:24510963 doi: 10.4049/jimmunol.1302064.
12. Shugay M, Britanova OV, Merzlyak EM, Turchaninova MA, Mamedov IZ, Tuganbaev TR et al. Towards error-free profiling of immune repertoires. *Nat Methods*. 2014 Jun; 11 (6): 653–5. DOI: 10.1038/nmeth.2960.
13. Shugay M, Bagaev DV, Turchaninova MA, Bolotin DA, Britanova OV, Putintseva EV et al. VDJtools: Unifying Post-analysis of T Cell Receptor Repertoires. *PLoS Comput Biol*. 2015 Nov 25; 11 (11): e1004503. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1004503.
14. Bolotin DA, Poslavsky S, Mitrophanov I, Shugay M, Mamedov I, Putintseva E et al. MiXCR: software for comprehensive adaptive immunity profiling. *Nat Methods*. 2015 May; 12 (5): 380–1. DOI: 10.1038/nmeth.3364.
15. Egorov ES, Merzlyak EM, Shelonkov AA, Britanova OV, Sharonov GV, Staroverov DB et al. Quantitative profiling of immune repertoires for minor lymphocyte counts using unique molecular identifiers. *J Immunol*. 2015; 194 (12): 6155–63. DOI: 10.4049/jimmunol.1500215.
16. Pogorelyy MV, Elhanati Y, Marcou Q, Sycheva AL, Komech EA, Nazarov VI et al. Persisting fetal clonotypes influence the structure and overlap of adult human T cell receptor repertoires. *PLoS Comput Biol*. 2017 Jul 6; 13 (7): e1005572. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1005572.
17. Grunewald J, Halapi E, Wahlström J, Giscombe R, Nityanand S, Sanjeevi C et al. T-cell expansions with conserved T-cell receptor beta chain motifs in the peripheral blood of HLA-DRB1\*0401 positive patients with necrotizing vasculitis. *Blood*. 1998; 92 (10): 3737–44.
18. Müschen M, Warskulat U, Perniok A, Even J, Moers C, Kismet B et al. Involvement of Soluble CD95 in Churg-Strauss Syndrome. *Am J Pathol*. 1999 Sep; 155 (3): 915–25. DOI: 10.1016/S0002-9440(1)65191-7.
19. Link CS, Eugster A, Heidenreich F, Rücker-Braun E,

- Schmiedgen M, Oelschlägel U et al. Abundant cytomegalovirus (CMV) reactive clonotypes in the CD8+ T cell receptor alpha repertoire following allogeneic transplantation. *Clin Exp Immunol.* 2016 Jun; 184 (3): 389–402. DOI: 10.1111/cei.12770.
20. Ruggiero E, Nicolay JP, Fronza R, Arens A, Paruzynski A, Nowrouzi A et al. High-resolution analysis of the human T-cell receptor repertoire. *Nat Commun.* 2015 Sep 1; 6: 8081. DOI: 10.1038/ncomms9081.
21. Faham M, Carlton V, Moorhead M, Zheng J, Klinger M, Pepin F et al. Discovery of T Cell Receptor  $\beta$  Motifs Specific to HLA-B27-Positive Ankylosing Spondylitis by Deep Repertoire Sequence Analysis. *Arthritis Rheumatol.* 2017 Apr; 69 (4): 774–84. DOI: 10.1002/art.40028.
22. Komech E, Zvyagin I, Shmidt E, Klimenko A, Shostak N, Mamedov I, Lebedev Y. Shared T-cell clones are found in synovial fluid of patients with ankylosing spondylitis. In: Abstract book of 12th EJI-EFIS Tatra Immunology Conference; 2016 Sep 3–7; Strbske Pleso, Slovakia. p. 39.
23. Guida G, Vallario A, Stella S, Boita M, Circosta P, Mariani S et al. Clonal CD8+ TCR-Vbeta expanded populations with effector memory phenotype in Churg Strauss syndrome. *Clin Immunol.* 2008 Jul; 128 (1): 94–102. DOI: 10.1016/j.clim.2008.03.505.

## References

1. Brodsky RA. High dose cyclophosphamide treatment for autoimmune disorders. *ScientificWorldJournal.* 2002 Jun 28; 2: 1808–15. DOI: 10.1100/tsw.2002.863.
2. DeZern AE, Styler MJ, Drachman DB, Hummers LK, Jones RJ, Brodsky RA. Repeated treatment with high dose cyclophosphamide for severe autoimmune diseases. *Am J Blood Res.* 2013; 3 (1): 84–90.
3. Gladstone DE, Golightly MG, Brannagan TH 3rd. High dose cyclophosphamide preferentially targets naïve T (CD45/CD4/RA+) cells in CIDP and MS patients. *J Neuroimmunol.* 2007 Oct; 190 (1–2): 121–6. DOI: 10.1016/j.jneuroim.2007.07.005.
4. Britanova OV, Shugay M, Merzlyak EM, Staroverov DB, Putintseva EV, Turchaninova MA et al. Dynamics of Individual T Cell Repertoires: From Cord Blood to Centenarians. *J Immunol.* 2016 Jun 15; 196 (12): 5005–13. DOI: 10.4049/jimmunol.1600005.
5. Wilde B, Thewissen M, Damoiseaux J, van Paassen P, Witzke O, Tervaert JWC. T cells in ANCA-associated vasculitis: what can we learn from lesional versus circulating T cells? *Arthritis Res Ther.* 2010; 12 (1): 204. DOI: 10.1186/ar2923.
6. McKinney EF, Willcocks LC, Broecker V, Smith KGC. The immunopathology of ANCA-associated vasculitis. *Semin Immunopathol.* 2014 Jul; 36 (4): 461–78. DOI: 10.1007/s00281-014-0436-6.
7. Giscombe R, Wang XB, Kakoulidou M, Lefvert AK. Characterization of the expanded T-cell populations in patients with Wegener's granulomatosis. *J Intern Med.* 2006 Sep; 260 (3): 224–30. DOI: 10.1111/j.1365-2796.2006.01688.x.
8. Ruth AJ, Kitching AR, Kwan RY, Odobasic D, Ooi JD, Timoshanko J et al. Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies and effector CD4+ cells play nonredundant roles in anti-myeloperoxidase crescentic glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol.* 2006 Jul; 17 (7): 1940–9. DOI: 10.1681/ASN.2006020108.
9. Kanakry CG, Ganguly S, Zahurak M, Bolaños-Meade J, Thoburn C, Perkins B et al. Aldehyde dehydrogenase expression drives human regulatory T cell resistance to posttransplantation cyclophosphamide. *Sci Transl Med.* 2013 Nov 13; 5 (211): 211ra157. DOI: 10.1126/scitranslmed.3006960.
10. Kanakry CG, Coffey DG, Towler AM, Vulic A, Storer BE, Chou J et al. Origin and evolution of the T cell repertoire after posttransplantation cyclophosphamide. *JCI Insight.* 2016; 1 (5): e86252. DOI: 10.1172/jci.insight.86252.
11. Britanova OV, Putintseva EV, Shugay M, Merzlyak EM, Turchaninova MA, Staroverov DB et al. Age-related decrease in TCR repertoire diversity measured with deep and normalized sequence profiling. *J Immunol.* 2014 Mar 15; 192 (6): 2689–98. PubMed PMID:24510963 doi: 10.4049/jimmunol.1302064.
12. Shugay M, Britanova OV, Merzlyak EM, Turchaninova MA, Mamedov IZ, Tuganbaev TR et al. Towards error-free profiling of immune repertoires. *Nat Methods.* 2014 Jun; 11 (6): 653–5. DOI: 10.1038/nmeth.2960.
13. Shugay M, Bagaev DV, Turchaninova MA, Bolotin DA, Britanova OV, Putintseva EV et al. VD Jtools: Unifying Post-analysis of T Cell Receptor Repertoires. *PLoS Comput Biol.* 2015 Nov 25; 11 (11): e1004503. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1004503.
14. Bolotin DA, Poslavsky S, Mitrophanov I, Shugay M, Mamedov I, Putintseva E et al. MiXCR: software for comprehensive adaptive immunity profiling. *Nat Methods.* 2015 May; 12 (5): 380–1. DOI: 10.1038/nmeth.3364.
15. Egorov ES, Merzlyak EM, Shelenkov AA, Britanova OV, Sharonov GV, Staroverov DB et al. Quantitative profiling of immune repertoires for minor lymphocyte counts using unique molecular identifiers. *J Immunol.* 2015; 194 (12): 6155–63. DOI: 10.4049/jimmunol.1500215.
16. Pogorelyy MV, Elhanati Y, Marcou Q, Sycheva AL, Komech EA, Nazarov VI et al. Persisting fetal clonotypes influence the structure and overlap of adult human T cell receptor repertoires. *PLoS Comput Biol.* 2017 Jul 6; 13 (7): e1005572. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1005572.
17. Grunewald J, Halapi E, Wahlström J, Giscombe R, Nityanand S, Sanjeevi C et al. T-cell expansions with conserved T-cell receptor beta chain motifs in the peripheral blood of HLA-DRB1\*0401 positive patients with necrotizing vasculitis. *Blood.* 1998; 92 (10): 3737–44.
18. Müschen M, Warskulat U, Perniok A, Even J, Moers C, Kismet B et al. Involvement of Soluble CD95 in Churg-Strauss Syndrome. *Am J Pathol.* 1999 Sep; 155 (3): 915–25. DOI: 10.1016/S0002-9440(1)65191-7.
19. Link CS, Eugster A, Heidenreich F, Rücker-Braun E, Schmiedgen M, Oelschlägel U et al. Abundant cytomegalovirus (CMV) reactive clonotypes in the CD8+ T cell receptor alpha repertoire following allogeneic transplantation. *Clin Exp Immunol.* 2016 Jun; 184 (3): 389–402. DOI: 10.1111/cei.12770.
20. Ruggiero E, Nicolay JP, Fronza R, Arens A, Paruzynski A, Nowrouzi A et al. High-resolution analysis of the human T-cell receptor repertoire. *Nat Commun.* 2015 Sep 1; 6: 8081. DOI: 10.1038/ncomms9081.
21. Faham M, Carlton V, Moorhead M, Zheng J, Klinger M, Pepin F et al. Discovery of T Cell Receptor  $\beta$  Motifs Specific to HLA-B27-Positive Ankylosing Spondylitis by Deep Repertoire Sequence Analysis. *Arthritis Rheumatol.* 2017 Apr; 69 (4): 774–84. DOI: 10.1002/art.40028.
22. Komech E, Zvyagin I, Shmidt E, Klimenko A, Shostak N, Mamedov I, Lebedev Y. Shared T-cell clones are found in synovial fluid of patients with ankylosing spondylitis. In: Abstract book of 12th EJI-EFIS Tatra Immunology Conference; 2016 Sep 3–7; Strbske Pleso, Slovakia. p. 39.
23. Guida G, Vallario A, Stella S, Boita M, Circosta P, Mariani S et al. Clonal CD8+ TCR-Vbeta expanded populations with effector memory phenotype in Churg Strauss syndrome. *Clin Immunol.* 2008 Jul; 128 (1): 94–102. DOI: 10.1016/j.clim.2008.03.505.