

УДК 571.27

# Исследование репертуара Т-лимфоцитов после аутологичной ТГСК у пациентов с анкилозирующим спондилитом

Е. А. Комеч<sup>1\*</sup>, И. В. Звягин<sup>1</sup>, М. В. Погорелый<sup>1</sup>, И. З. Мамедов<sup>1</sup>, Д. А. Федоренко<sup>2</sup>, Ю. Б. Лебедев<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

<sup>2</sup>Клиника гематологии и клеточной терапии им. А.А. Максимова, Национальный медико-хирургический центр им. Н.И. Пирогова Минздрава России, 105203, Москва, ул. Нижняя Первомайская, 70

\*E-mail: ekomech@gmail.com

Поступила в редакцию 24.10.2017

Принята к печати 16.04.2018

**РЕФЕРАТ** Аутологичная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК), более безопасная по сравнению с аллогенной трансплантацией, является перспективным методом терапии при тяжелых формах аутоиммунных заболеваний (АЗ). Несмотря на достаточно длительную историю применения, вопрос о структурных изменениях системы адаптивного иммунитета в результате аутологичной ТГСК у пациентов с различными типами АЗ остается малоизученным. С помощью массированного секвенирования нами изучены изменения структуры клонального репертуара Т-лимфоцитов периферической крови у взрослых пациентов с анкилозирующим спондилитом (АС) в результате аутологичной ТГСК на протяжении 2 лет восстановительного периода. Применение техники молекулярного баркодирования позволило в существенной степени снизить влияние искажений, возникающих в ходе пробоподготовки, провести сравнительный анализ различных характеристик Т-клеточного репертуара между разными временными точками и отследить динамику отдельных групп клонотипов и субпопуляций Т-лимфоцитов. Клональное разнообразие Т-клеточного репертуара оставалось значительно сниженным по сравнению с исходным в течение первого года восстановительного периода у обоих пациентов, продолжив увеличиваться на протяжении всех 24 мес. наблюдения, и у одного пациента достигло нормального значения для данной возрастной группы. Рост разнообразия связан с появлением большого числа низкопредставленных клонотипов, которые не были выявлены в образцах до трансплантации. Детектируемость клонотипов после ТГСК в значительной степени зависела от их представленности в исходном репертуаре. Практически все из 100 клонотипов, наиболее высокопредставленных до ТГСК, обнаружены в репертуаре 2 года спустя и остались при этом высокопредставленными независимо от принадлежности к CD8<sup>+</sup> или CD4<sup>+</sup> субпопуляции Т-лимфоцитов. До 25% Т-клеток периферической крови через 2 года после ТГСК были представлены клонотипами первоначального репертуара.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** анкилозирующий спондилит, аутологичная ТГСК, репертуар TCR, NGS.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** АС – анкилозирующий спондилит; ЗД – здоровые доноры; РС – рассеянный склероз; ТГСК – трансплантация гемопоэтических стволовых клеток крови; TCR – Т-клеточный рецептор (T-cell receptor); RepSeq – секвенирование репертуаров иммунорецепторов (repertoire sequencing); TNF $\alpha$  – фактор некроза опухоли альфа (tumor necrosis factor alpha).

## ВВЕДЕНИЕ

Анкилозирующий спондилит (АС, или болезнь Бехтерева) – хроническое заболевание суставов осевого скелета аутоиммунной природы. Сильная ассоциация риска развития АС с аллелем HLA-B\*27,

а также с аллелями других генов, вовлеченных в презентацию антигена Т-лимфоцитам, позволяет предполагать активное участие Т-клеток в патогенезе заболевания. На сегодняшний день для терапии АС применяют нестероидные противовоспалительные

препараты, а также их комбинацию с препаратами моноклональных антител, чаще всего против TNF $\alpha$ . Однако такая терапия оказывается неэффективной для 40% пациентов [1]. В последние два десятилетия при тяжелых аутоиммунных заболеваниях начинают применять аутологичную трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток крови (ТГСК), показавшую высокую эффективность у пациентов с рассеянным склерозом (РС), системной красной волчанкой, ювенильным идиопатическим артритом, системной склеродермией [2–5]. Полученные к настоящему времени сведения указывают, что клинический эффект такой терапии основан на существенной реформе репертуара Т- и В-лимфоцитов в результате глубокой иммуносупрессии и последующего формирования нового репертуара лимфоцитов. Решающая роль Т-клеток в нормальном функционировании и регуляции иммунной системы, а также их участие в аутоиммунных процессах подчеркивают важность изучения реформирования Т-клеточного репертуара в ходе ТГСК. Исследование клонального репертуара гипервариабельных рецепторов лимфоцитов с помощью массивированного параллельного секвенирования (RepSeq) является наиболее современным и информативным подходом к мониторингу динамики пула Т-клеток на уровне отдельных клонов. К настоящему времени опубликованы результаты лишь нескольких исследований процесса восстановления иммунной системы после аутологичной ТГСК с помощью анализа состояния Т-клеточного репертуара [4, 6], включая две работы, в которых анализировали репертуар пациента с АС после аутологичной ТГСК [7, 8]. В настоящей работе мы провели более длительное и подробное исследование реформы репертуара Т-клеток у пациентов с АС после аутологичной ТГСК, впервые проследив клональную динамику Т-лимфоцитов на протяжении 2 лет после трансплантации. Применение технологии молекулярного баркодирования позволило более корректно, чем в предыдущих исследованиях, оценить разнообразие клонального репертуара образцов за счет выравнивания глубины анализа и элиминирования большинства ошибочных последовательностей, возникающих в ходе ПЦР и секвенирования.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Пациенты

Образцы периферической крови получены от двух пациентов с АС в нескольких временных точках: до ТГСК (точка 0), 4, 12 и 24 мес. после ТГСК. Диагноз АС устанавливали на основе модифицированного нью-йоркского критерия [9]. Все пациенты дали письменное согласие на участие в исследовании, ра-

бота проведена с соблюдением действующих этических и правовых норм.

Пациент ash-110: мужчина, 26 лет, HLA-B\*27+. До ТГСК: длительность болезни более 3 лет, терапия включала метотрексат (7.5 мг/неделя, внутримышечно) и нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП). На момент ТГСК состояние пациента характеризовалось как вторая степень активности АС и вторая степень функциональной недостаточности. Через месяц после ТГСК состояние пациента охарактеризовано как «улучшение», пациент выписан на амбулаторное лечение. Через год после ТГСК зафиксировано первое обострение (точка 12), после которого пациент находится на постоянной терапии адалимумабом (Хумира). Через 2 года после ТГСК зафиксировано еще одно обострение (точка 24).

Пациент ash-111: женщина, 28 лет, HLA-B\*27+. До ТГСК: длительность болезни более 10 лет, терапия включала инфликсимаб (Ремикейд). На момент ТГСК состояние характеризовалось как 2–3-я степень активности АС и вторая степень функциональной недостаточности. Через месяц после ТГСК состояние пациентки охарактеризовано как «улучшение», и она была выписана на амбулаторное лечение. Через год после ТГСК зафиксировано обострение болезни (точка 12), после которого пациентка находится на постоянной терапии этанерцептом (Энбрел).

### ТГСК

Аутологичную ТГСК проводили в соответствии со следующим протоколом: иммуносупрессивная химиотерапия циклофосфамидом (200 мг/кг в течение 4-х дней) с последующим введением ранее полученного аутологичного изолята гемопоэтических стволовых клеток крови ( $2.4 \times 10^6$  стволовых клеток крови на 1 кг массы тела). Аутологичный трансплантат стволовых клеток крови мобилизован с использованием гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (Г-КСФ, 10 мг/кг массы тела), обогащение трансплантата по популяции CD34+ не проводили. Для *in vivo* Т-клеточной деплеции при введении трансплантата одновременно вводили антигемоцитарный глобулин.

### Выделение лимфоцитарной фракции клеток и сортировка клеток

Образцы периферической крови (8 мл) собирали в вакуумные пробирки с K<sub>3</sub>EDTA (Vacutainer, BD Biosciences) в точках: 0 (до ТГСК и химиотерапии), 4, 9 (ash-111) или 12 (ash-110) и 24 мес. после ТГСК. Мононуклеарную фракцию выделяли стандартным методом центрифугирования в градиенте плотности фиколла (1.077 г/см<sup>3</sup>, «ПанЭко», Россия). Для анализа

воспроизводимости в точке «24 мес.» у обоих пациентов отбирали по два образца периферической крови одинакового объема (R1 и R2). В этот же период (24 мес. после ТГСК) одновременно с образцами R1 и R2 с помощью наборов реактивов Dynabeads для иммуномагнитной селекции (Invitrogen, США) получали отдельные фракции CD4+ и CD8+ Т-клеток.

### Подготовка библиотек кДНК TCRβ и секвенирование

РНК выделяли с использованием реагента TRIzol (Invitrogen, США) в соответствии с инструкцией производителя. Библиотеки кДНК подготавливали по ранее описанной технологии [10] с модификациями: после синтеза кДНК проводили предварительную амплификацию кДНК бета-цепей TCR с праймерами BCuni2R TGCTTCTGATGGCTCAAACAC и M1S AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT (94°C, 20 с; 60°C, 15 с; 72°C, 60 с – 18 циклов). Каждая реакционная смесь содержала по 5 пмоль олигонуклеотидов BCuni2R и M1S, 1× буфер Tersus, 0.1 мМ каждого dNTP и 0.2 мкл полимеразы Tersus («Евроген», Россия), объем смеси 15 мкл. Продукт амплификации очищали с помощью набора реактивов QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, США) согласно инструкции производителя. В последующую реакцию амплификации брали весь объем очищенного ПЦР-продукта.

Секвенирование проводили на Illumina HiSeq 2000/2500 2 × 100 нт.

### Обработка результатов секвенирования

Предварительная обработка результатов секвенирования включала коррекцию ошибок секвенирования и подсчет числа молекулярных событий (UMI) в библиотеке с помощью программного обеспечения MiGEC [11]. Для определения V-, D- и J-сегментов, последовательностей CDR3, подсчета численности клонотипов и формирования листа клонотипов для каждого образца использовали программное обеспечение MiTCR [12]. При восстановлении клононального репертуара образца использовали последовательности кДНК TCR, прочитанные минимум дважды по результатам анализа UMI, что позволяло устранить большую часть ошибочных последовательностей [11, 13]. Статистика секвенирования приведена в *таблице*. Дальнейшую биоинформатическую и статистическую обработку результатов проводили с помощью языка программирования R и пакета tcR [14, 15].

Определение принадлежности клонотипа к популяции CD4 или CD8, а также поиск отдельных клонотипов в индивидуальных репертуарах разных временных точек проводили по совпадению нуклеотидной последовательности участка CDR3 и V-сегмента TCR в восстановленных репертуарах.

### Статистика секвенирования

Пациент	Точка / Субпопуляция Т-клеток	Количество прочтений	Количество UMI <sup>§, #</sup>	Суммарное количество клонотипов <sup>#</sup>	Количество клонотипов на 90 000 UMI <sup>#</sup>
ash-110	0/F*	10671513	301277	226383	77160
	4/F	13657155	90985	47119	46803
	12/F	1011932	125640	72925	55413
	24/R1**	7366741	964274	519425	69397
	24/R2**	7533711	1263464	625152	69244
	24/CD4+	2776546	587713	329331	71870
	24/CD8+	2964049	653168	183735	42679
ash-111	0/F	11194792	308159	222555	74115
	4/F	17725492	138299	68398	48533
	12/F	23807978	225397	134596	61615
	24/R1	7366741	957406	414203	63755
	24/R2	4597521	367849	210597	64547
	24/CD4+	3144715	435297	218230	64026
	24/CD8+	2850176	552005	163602	43519

\*F – фракция мононуклеарных клеток периферической крови.

\*\*R1, R2 – фракции мононуклеарных клеток периферической крови из двух параллельных образцов крови.

§ UMI (unique molecular identifier) – уникальный молекулярный баркод.

# Каждый UMI прочитан минимум 2 раза.

Для расчета клонального разнообразия, оценки нижней границы представленности стабильно попадающих в выборку клонотипов и степени обновления репертуара глубину анализа репертуара сравниваемых образцов выравнивали с помощью случайного отбора 90000 UMI из массива данных секвенирования каждого образца.

Клональное разнообразие Т-клеточного репертуара оценивали с использованием индекса видового разнообразия Chao1 [16].

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Динамика восстановления клонального репертуара Т-лимфоцитов

При исследовании изменений репертуара Т-лимфоцитов с помощью массивированного параллельного секвенирования важным аспектом является максимальное снижение искусственного разнообразия последовательностей, возникающего в результате ошибок секвенирования, а также сопоставимость глубины анализа репертуара у сравниваемых образцов [17]. В данной работе для высокопроизводительного секвенирования клональных репертуаров Т-лимфоцитов периферической крови двух пациентов с анкилозирующим спондилитом до и после аутологичной ТГСК использована технология подготовки библиотек кДНК TCR с применением баркодирования молекул кДНК [18, 19]. Использование уникальных молекулярных баркодов (UMI) при обработке результатов секвенирования позволяет элиминировать большинство ошибок ПЦР и секвенирования, снижая искусственное разнообразие, и количественно оценивать представленность клонотипов Т-клеток в образце [11, 13]. Получены пять образцов периферической крови каждого пациента в четырех временных точках: за неделю до ТГСК (точка 0) и спустя 4, 12 и 24 (пара параллельных образцов) мес. после ТГСК. В результате секвенирования для каждого образца получено от  $1 \times 10^6$  до  $23 \times 10^6$  последовательностей, соответствующих по меньшей мере  $9 \times 10^4$  уникальных молекул кДНК бета-цепей TCR при минимальном пороге два прочтения на каждую молекулу кДНК TCR (таблица). Выбранный порог позволяет исключить из дальнейшего анализа большинство ошибочных последовательностей кДНК, возникающих в ходе ПЦР и секвенирования [20].

В качестве меры разнообразия клонального репертуара в нашей работе применен индекс Chao1, основанный на оценке количества малопредставленных видов в выборке и, таким образом, учитывающий богатство образца клонотипами наивных Т-лимфоцитов, составляющих основу разнообразия Т-клеточного репертуара [16, 21]. Учитывая чувстви-

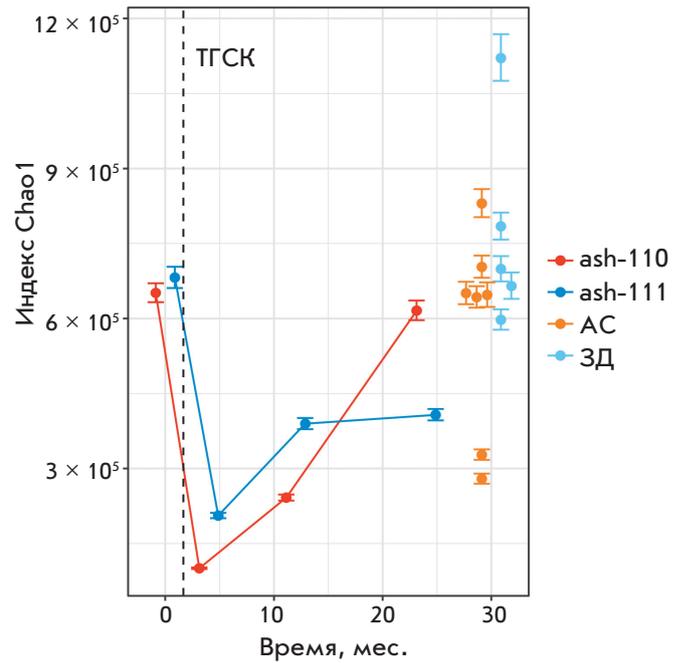
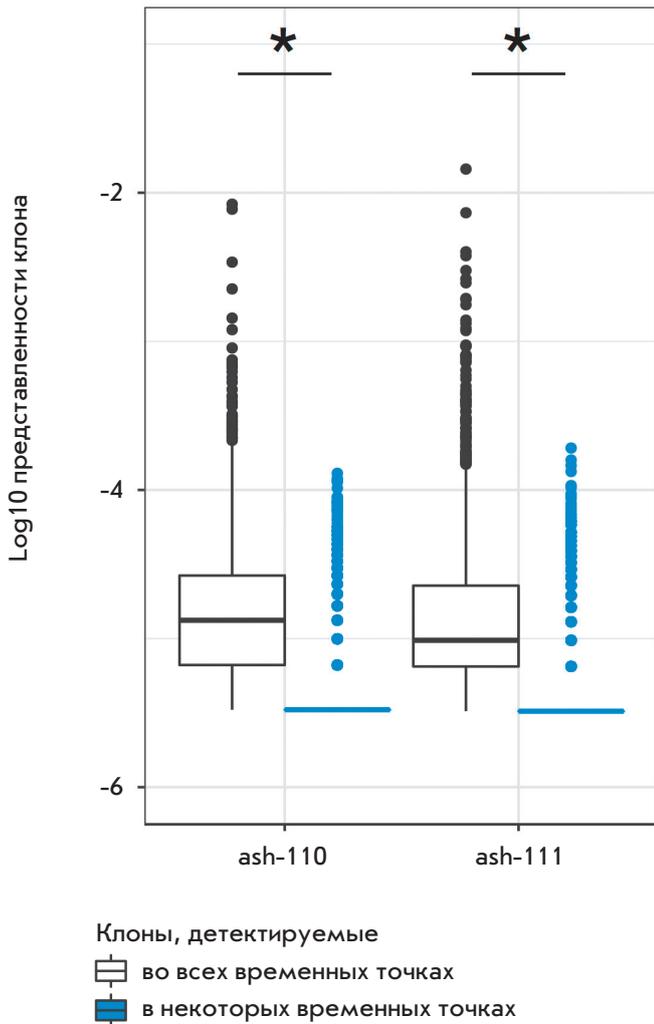


Рис. 1. Динамика клонального разнообразия репертуара Т-лимфоцитов в течение 2 лет после ТГСК. Оценка нижней границы клонального разнообразия TCR $\beta$  с использованием индекса Chao1 [16]. Голубые точки соответствуют здоровым донорам ( $n = 6$ , возраст 22–34 г.; данные из [21]), оранжевые — пациентам с AC ( $n = 5$ , возраст 22–34 г.; данные из [22]). Вертикальная пунктирная линия отражает момент проведения ТГСК. Для каждого значения отмечен 95% доверительный интервал

тельность данной метрики к глубине анализа, при исследовании динамики клонального разнообразия из массива данных для каждого образца случайным образом отбирали по 90000 последовательностей кДНК TCR с уникальными молекулярными баркодами. Исходя из проведенной ранее оценки эффективности примененной в работе технологии реконструкции Т-клеточных репертуаров, отобранное число приблизительно соответствует анализу 90000 клеток Т-лимфоцитов [13, 21].

Через 4 мес. после ТГСК индекс разнообразия был существенно снижен ( $p < 2.2 \times 10^{-16}$ , U-критерий Манна–Уитни) относительно исходного значения у обоих пациентов (рис. 1). Общее количество идентифицированных клонотипов TCR $\beta$  было более чем в 2 раза ниже, чем до ТГСК (77391 и 46797, 73880 и 48505 клонотипов в образцах 0 и 4 мес. у пациентов ash-110 и ash-111 соответственно). В течение года восстановительного периода разнообразие клонального репертуара не достигло первоначального уровня у обо-



**Рис. 2.** Распределение представленности клонотипов в первоначальном репертуаре Т-лимфоцитов в зависимости от их обнаружения в образцах пациентов после ТГСК. Белый цвет – распределение численности клонотипов, обнаруженных во всех проанализированных образцах, включая образцы до ТГСК; синий – распределение для клонотипов, присутствовавших в точке 0, но не найденных в каком-либо из образцов после ТГСК (точки 4, 12 или 24). \*  $p < 2.2 \times 10^{-16}$  (U-критерий Манна–Уитни)

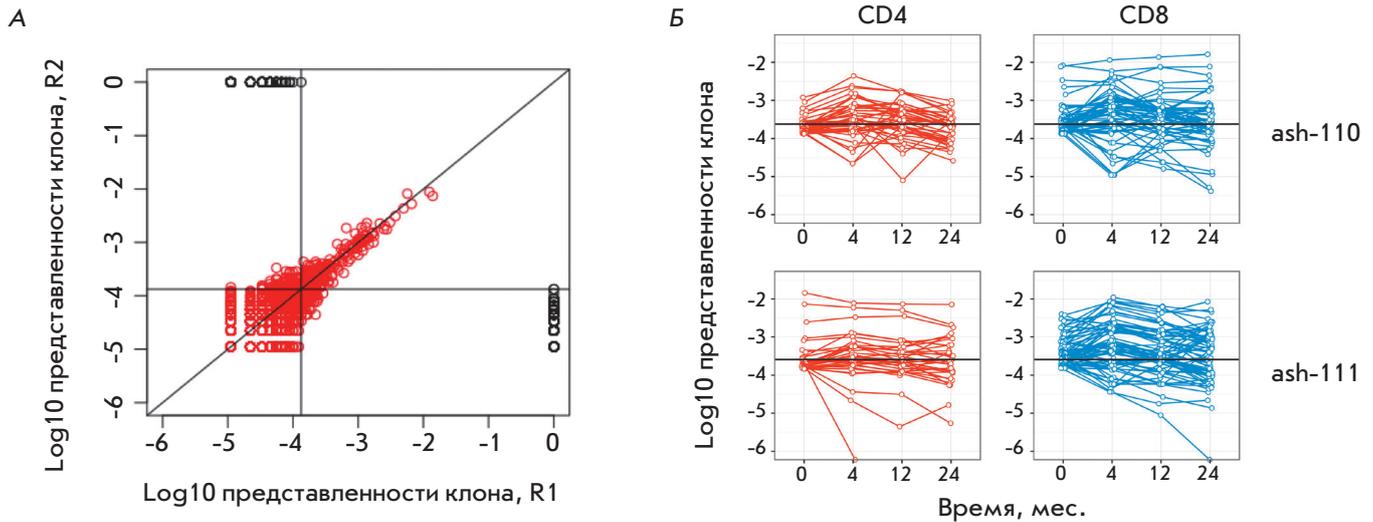
их пациентов. Скорость восстановления клонального разнообразия у пациентов различалась. Через 2 года после ТГСК клональное разнообразие репертуара у пациента ash-110 достигло исходного уровня и соответствовало разнообразию у здоровых доноров того же возраста (рис. 1). У пациента ash-111 через год после ТГСК клональное разнообразие составляло лишь половину от первоначального и не измени-

лось существенно в течение второго года восстановительного периода, так и не достигнув нормального значения. Стоит отметить, что, в отличие от других аутоиммунных заболеваний, где разнообразие клонального репертуара Т-клеток до ТГСК существенно снижено [2, 4], исходное разнообразие клональных репертуаров у обоих пациентов в данном исследовании было таким же, как у здоровых доноров и пациентов с АС соответствующего возраста ( $p = 0.284$  и  $p = 0.06$  соответственно, U-критерий Манна–Уитни).

### Влияние ТГСК на клонотипы первоначального репертуара Т-лимфоцитов

При изучении динамики исходного репертуара в течение 2 лет после ТГСК мы проследили встречаемость клонотипов из репертуара точки 0 во всех последующих образцах, т.е. через 4, 12 и 24 мес. после ТГСК. По результатам такого анализа клонотипы первоначального репертуара были условно разделены на две группы: постоянно присутствующие во всех точках после ТГСК и обнаруживаемые лишь в некоторых временных точках. В первую группу вошли 3188 клонотипов у ash-110 и 6126 клонотипов у ash-111 (1.4 и 3.0% от общего разнообразия соответственно) и занимали около 10% (ash-110) или 15% (ash-111) от Т-клеток периферической крови до ТГСК (рис. 2). Клонотипы второй группы, т.е. не детектируемые или наблюдающиеся только в некоторых временных точках после ТГСК, составляли большую часть Т-клеток периферической крови до ТГСК (порядка 90%). Исходная представленность этих групп существенно различалась: в первой группе оказалось большинство высокопредставленных клонотипов репертуара (медиана частоты клонотипа в репертуаре 0.001%, интерквартильный размах 0.0007–0.003% для каждого пациента), а во второй – в среднем малочисленные клонотипы (медиана частоты 0.0003%, интерквартильный размах 0.0003–0.0003%). Интересно, что некоторая часть исходно малочисленных клонотипов тем не менее вошла в состав первой группы, т.е. присутствует во всех репертуарах после ТГСК, а среди высокопредставленных в первоначальном репертуаре есть исчезнувшие после ТГСК клонотипы.

При исследовании динамики отдельных клонотипов на протяжении длительного периода времени необходимо учитывать, что вероятность детекции клонотипа в образце определяется численностью клеток данного клонотипа в репертуаре: клонотипы, представленные большим количеством клеток, т.е. так называемые высокопредставленные клонотипы, имеют большую вероятность быть обнаруженными в нескольких независимо отобранных образцах крови, в отличие от клонотипов с низкой численностью.



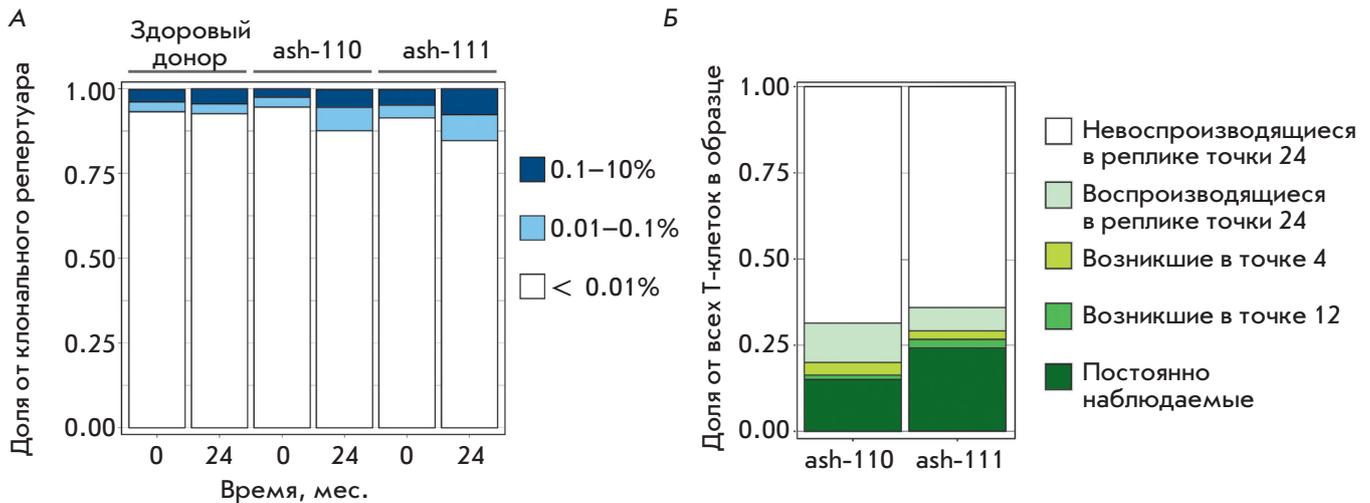
**Рис. 3.** Динамика клонотипов первоначального репертуара Т-лимфоцитов. А – воспроизводимость численности клонотипов, обнаруженных в двух одновременно взятых образцах крови одного пациента. Точками отмечены отдельные клонотипы TCRβ. Черные точки отображают клонотипы, не воспроизводимые в реплике. Б – динамика «топ 100» клонотипов первоначального репертуара. Красным – CD4+ клонотипы, синим – CD8+ клонотипы. Черная горизонтальная линия отражает минимальную представленность клонотипа из «топ 100» точки 24

Для определения границы численности клонотипов, которые стабильно попадают в анализируемый образец и обнаруживаются в данных секвенирования, мы провели сравнительный анализ клональных репертуаров параллельных образцов крови, взятых в один момент времени. Чтобы устранить влияние различий по глубине анализа репертуара образцов, из каждого массива данных секвенирования были случайно отобраны 90000 последовательностей кДНК TCR. У обоих пациентов при одинаковой глубине анализа в каждой из реплик наблюдались только клонотипы с представленностью > 0.01%, составляющие 100–150 наиболее высокопредставленных клонотипов репертуара (рис. 3А). Основываясь на данной оценке воспроизводимости, для характеристики степени обновления первоначального репертуара мы проследили 100 наиболее высокопредставленных клонотипов («топ 100») из точки 0 во всех точках после ТГСК у каждого пациента, предполагая, что отсутствие или присутствие этих клонотипов в образце после ТГСК будет отражать изменения численности клеток данного клонотипа. В полном соответствии с их высокой представленностью все клонотипы из «топ 100», за исключением двух у пациента ash-111, относятся к группе клонотипов, постоянно присутствующих в течение восстановительного периода. При этом около половины клонотипов из «топ 100» у каждого пациента (45 у ash-110 и 52 у ash-111) сохранили высокую численность и остались среди

100 наиболее высокопредставленных через 2 года после ТГСК. Аналогичным образом мы проследили динамику 100 наиболее высокопредставленных клонотипов у трех здоровых доноров соответствующего возраста на протяжении 2 лет. У здоровых доноров в отсутствие ТГСК из исходных 100 наиболее высокопредставленных клонотипов от 85 до 95 клонотипов сохраняются в «топ 100» через 2 года.

С помощью анализа клональных репертуаров отдельных фракций Т-клеток была определена принадлежность каждого клонотипа из «топ 100» к субпопуляциям CD8+ цитотоксических или CD4+ хелперных Т-лимфоцитов. Выраженных различий сохранения клонотипов в «топ 100» спустя 2 года после ТГСК в зависимости от принадлежности к цитотоксической или хелперной субпопуляциям не выявлено (рис. 3Б).

Полученные результаты позволяют заключить, что у исследованных пациентов аутологичная ТГСК не привела к полному обновлению состава высокопредставленных клонотипов, более половины из которых остались в репертуаре и сохранили высокую численность. Однако перегруппировка высокопредставленных клонотипов в результате проведенной ТГСК оказалась более существенной, чем динамика этой части репертуара здоровых доноров за такой же период времени. Детектируемость клонотипов первоначального репертуара после трансплантации в основном зависела от представленности клонотипа



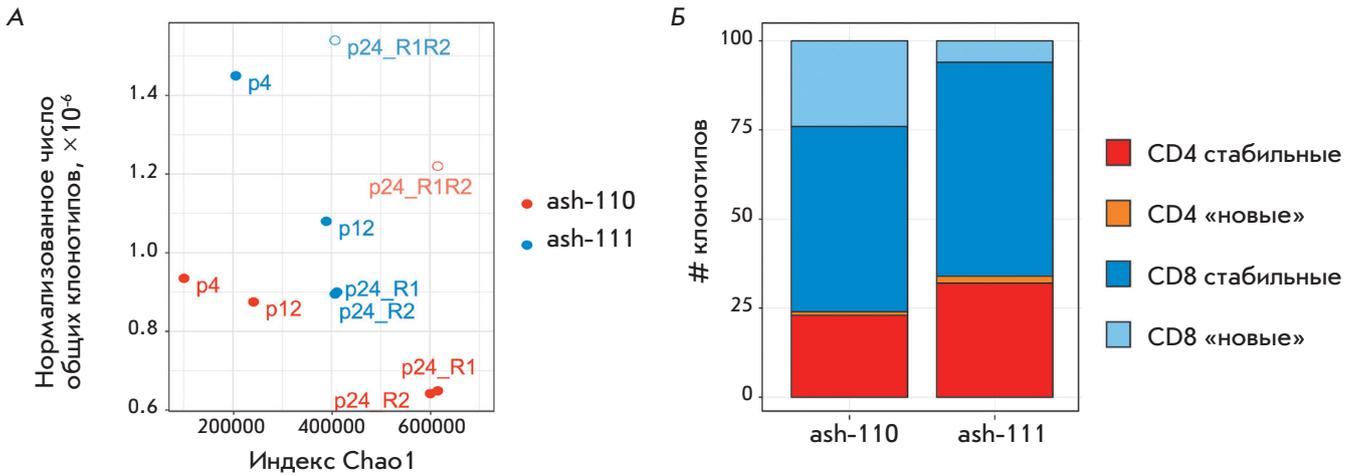
**Рис. 4.** Структура репертуара Т-лимфоцитов через 2 года после ТГСК. А – доля клонотипов, принадлежащих к разным группам по численности, от общего числа клонотипов образца: высокопредставленные (0.1–10%), со средней численностью (0.01–0.1%) и с низкой численностью (0.001–0.01%). Приведены структуры репертуаров Т-клеток у двух пациентов до и через 2 года после ТГСК (точки 0 и 24), а также у одного здорового донора. Б – все клонотипы в точке 24 разбиты на группы в зависимости от того, в какой временной точке они были впервые детектированы. По оси Y отложена суммарная доля клонотипов каждой группы от всех Т-клеток в образце через 2 года после ТГСК

в исходном репертуаре. Вместе с тем, часть клонотипов с низкой численностью до ТГСК обнаруживается в репертуаре у обследованных пациентов и через 2 года после терапии, что предполагает влияние других факторов, помимо исходной численности, на судьбу клонов Т-лимфоцитов после ТГСК.

### Структура клонального репертуара спустя 2 года после ТГСК

Одним из предполагаемых следствий проведения ТГСК, влияющих на терапевтическую эффективность процедуры, является обновление клонального состава репертуара Т-лимфоцитов. Чтобы оценить изменения, произошедшие в структуре репертуара через 2 года после ТГСК, мы проанализировали клональный состав репертуара в точках 0 и 24 у обоих пациентов. Для сравнения аналогичным образом исследовали структуры репертуаров здоровых доноров соответствующего возраста ( $n = 3$ ) (рис. 4А, слева приведены структуры репертуаров одного репрезентативного донора). Через 2 года после ТГСК структура клонального репертуара пациентов практически не отличалась от нормальной: малая часть (до 10%) репертуара образована высокопредставленными и среднечисленными клонотипами, а остальную часть (около 90%) занимают малочисленные клонотипы. В то же время репертуары пациентов после трансплантации являются более олигоклональными, чем до ТГСК (рис. 4А).

Для оценки степени обновления репертуаров мы проанализировали клональный состав репертуара через 2 года после ТГСК во всех предыдущих точках. 15 и 24% (ash-110 и ash-111 соответственно) клеток от репертуара занимают клонотипы, которые присутствовали в репертуаре до ТГСК, а также прослеживались во всех точках после трансплантации (рис. 4Б). Источником происхождения клеток таких клонотипов в равной степени может быть пул Т-клеток, оставшихся в организме пациента после подготовительной химиотерапии, и Т-клетки трансплантата, представлявшего собой практически исходный репертуар пациента до ТГСК, поскольку специфической деплеции зрелых Т-клеток не проводилось. Высокая представленность данных клонотипов после ТГСК обусловлена интенсивной пролиферацией клеток данных клонотипов, что позволило им преодолеть существенное снижение численности в результате предтрансплантационной химиотерапии. В то же время у обоих доноров, наряду с ростом разнообразия в течение 2 лет после ТГСК, доля клонотипов, пришедших из исходного репертуара, снижается (рис. 5А). При этом количество общих клонотипов между репликами точки 24 (p24\_R1R2 на рис. 5А), в которых клональное разнообразие сопоставимо с точкой 0, существенно больше, чем между точками 0 и 24, что может объясняться появлением новых клонов Т-лимфоцитов в ходе восстановительного периода.



**Рис. 5.** Степень обновления клонального репертуара Т-лимфоцитов после ТГСК. А – зависимость нормализованного числа общих клонотипов между репертуаром точки 0 и репертуарами точек 4 (p4), 12 (p12), а также репертуарами реплик образцов крови в точке 24 (p24\_R1 и p24\_R2), от разнообразия образца сравнения. Точки p24\_R1R2 представляют собой результат сравнения репертуаров параллельных образцов точки 24 между собой. Б – состав ста наиболее высокопредставленных клонотипов Т-лимфоцитов в репертуаре точки 24. Синим и голубым отображены клонотипы цитотоксических Т-лимфоцитов (CD8+), красным и оранжевым – клонотипы Т-хелперов (CD4+)

С целью анализа степени обновления репертуара высокочисленных клонов мы проследили присутствие 100 наиболее высокопредставленных клонотипов репертуара точки 24 в репертуарах всех предыдущих точек. В репертуаре до ТГСК у пациентов ash-110 и ash-111 из 100 клонотипов найдены 75 и 92 соответственно (рис. 5Б). Новые, недетектируемые до ТГСК, клонотипы среди «топ 100» составили 24 CD8+ и один CD4+ у пациента ash-110 и шесть CD8+ и два CD4+ у ash-111.

Таким образом, спустя 2 года после ТГСК в клональном репертуаре Т-лимфоцитов пациентов увеличилась доля средне- и высокопредставленных клонотипов и произошло существенное обновление клонального состава низкопредставленных клонотипов Т-клеток. Вместе с тем, основная часть наиболее высокопредставленных клонотипов происходит из исходного репертуара Т-лимфоцитов.

**ОБСУЖДЕНИЕ**

Анкилозирующий спондилит, или болезнь Бехтерева, – хроническое системное аутоиммунное заболевание с периодическими стадиями ремиссии и обострения. Специфической терапии АС не существует, а базисная терапия заключается в применении неспецифических нестероидных противовоспалительных препаратов. В последнее время стандартный метод терапии комбинируют с применением моноклональных антител про-

тив TNF $\alpha$  – инфликсимаб (Ремикейд), адалимумаб (Хумира). Однако до 40% пациентов оказываются невосприимчивыми или перестают отвечать на терапию антителами [23]. В случае неэффективности базисной терапии одним из перспективных методов лечения пациентов с прогрессирующим АС может стать аутологичная трансплантация гемопоэтических клеток крови. Вместе с тем, вопросы подбора эффективного протокола ТГСК и общей эффективности такого способа терапии АС остаются открытыми.

Продолжая наши работы [7, 24], мы исследовали динамику клонального репертуара Т-лимфоцитов периферической крови в течение 2 лет после аутологичной ТГСК у двух пациентов с АС. На протяжении всего периода восстановления из тимуса выходят новые наивные Т-лимфоциты, что увеличивает разнообразие репертуара ТCR: после существенного снижения на ранних сроках после ТГСК у обоих пациентов к концу первого года разнообразие репертуара ТCR достигло половины от начального уровня и продолжало возрастать в течение второго года (рис. 1). Сходную динамику восстановления репертуаров у взрослых пациентов с иными аутоиммунными заболеваниями наблюдали и другие авторы [2, 25]. По нашим наблюдениям скорость восстановления клонального разнообразия у двух пациентов заметно отличалась: спустя 2 года пациент ash-110 обладал практически исходным количеством клонотипов,

в то время как у ash-111 количество клонотипов достигло лишь половины начального уровня.

Молекулярные механизмы, обуславливающие эффективность ТГСК для терапии аутоиммунных заболеваний, на данный момент остаются невыясненными. В нескольких исследованиях показано, что, несмотря на химиотерапию, некоторая часть Т-клеток оставалась в репертуаре после ТГСК, но не оказывала влияния на развитие устойчивой ремиссии основного заболевания в течение 2–5 лет после ТГСК [4–7]. У пациентов, описанных в нашей работе, пережившие ТГСК клоны составили до 25% Т-клеток в репертуаре через 2 года после ТГСК. Большинство переживших ТГСК клонотипов относились к высокопредставленным клонотипам исходного репертуара со средней численностью  $> 0.001\%$  (рис. 2). Эти клонотипы могли остаться в организме после курса химиотерапии или произойти из клеток трансплантата, в ходе подготовки которого не проводилось Т-клеточной деплеции. Интересно, что небольшая фракция исходно малочисленных клонотипов также выявлена во всех репертуарах после ТГСК, а некоторые высокопредставленные клонотипы полностью исчезли после трансплантации, т.е. «выживание» клонотипа зависит не только от его численности, но и от функционального состояния Т-клеток. Kanakry и соавт. показали, что регуляторные CD4+CD25+FoxP3+ Т-лимфоциты устойчивы к средним дозам (50–100 мг/кг) циклофосфамида *in vitro* за счет повышенной экспрессии альдегиддегидрогеназы, которая нейтрализует токсическое действие циклофосфамида [26]. Можно предположить, что малочисленные клонотипы, детектируемые после ТГСК в нашем исследовании, представляют субпопуляцию регуляторных Т-лимфоцитов.

Сконцентрировавшись на клонотипах, стабильно попадающих в образцы, мы оценили степень обновления репертуара Т-лимфоцитов в результате ТГСК. В нашей работе около половины клонотипов из «топ 100» первоначального репертуара остались в «топ 100» через 2 года после ТГСК. При этом эффект не зависел от принадлежности клонотипа к CD4+ или CD8+ субпопуляции. Спустя 2 года у обоих пациентов среди «топ 100» обнаружены новые клонотипы, не найденные до ТГСК и представленные по большей части CD8+ Т-лимфоцитами. Еще у одного пациента с АС более старшего возраста (45 лет), которому ТГСК проводили по идентичному протоколу и наблюдали длительную ремиссию (более 5 лет), более трети высокопредставленных до ТГСК клонотипов сохранились среди «топ 100» через 2 года после трансплантации (данные из [7]). Таким образом, у пациентов, репертуары Т-лимфоцитов которых исследованы в настоящей работе, не произошло

глубокой реаранжировки высокопредставленных клонотипов Т-клеток. Восстановление исходной клонональной структуры репертуара может быть связано с выбранным протоколом ТГСК, в рамках которого при подготовке трансплантата не проводилось деплеции зрелых Т-лимфоцитов и обогащения по CD34+ клеткам. Вместе с тем, идентичный протокол ТГСК позволил достичь длительной ремиссии у пациента более старшего возраста. Сходная степень обновления высокопредставленных клонотипов описана у пациентов с рассеянным склерозом (возраст 27–53 года) при использовании другого протокола аутологичной ТГСК с обогащением трансплантата по CD34+ клеткам (около 40% клонотипов Т-лимфоцитов из «топ 1000» CD4+ и CD8+ субпопуляций остались в «топ 1000» соответствующих фракций спустя год после трансплантации) вне зависимости от достижения ремиссии [4]. Таким образом, можно предполагать существенную роль иных факторов в терапевтической эффективности ТГСК.

Одной из субпопуляций Т-лимфоцитов, важная роль которой показана в патогенезе многих аутоиммунных заболеваний (обобщено в [27, 28]), является субпопуляция регуляторных Т-клеток ( $T_{reg}$ ). В частности, значимость ее обновления для терапевтической эффективности ТГСК недавно была показана при ювенильном идиопатическом артрите и дерматомиозите: длительную ремиссию наблюдали исключительно у тех пациентов, у которых разнообразие клононального репертуара  $T_{reg}$  существенно увеличилось после ТГСК [29]. Можно предположить, что отсутствие длительного терапевтического эффекта ТГСК у двух пациентов с АС, наблюдавшихся в нашей работе, связано со слабой реформой репертуара субпопуляции регуляторных Т-лимфоцитов. Дальнейшие исследования, направленные на изучение динамики клононального состава различных субпопуляций Т-лимфоцитов в сочетании с различными протоколами ТГСК, проведенные на репрезентативной выборке больных АС, позволят уточнить эффективность аутологичной ТГСК как метода терапии тяжелых форм АС.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

ТГСК все чаще применяется для лечения пациентов с тяжелым течением аутоиммунных заболеваний, не отвечающих на стандартную терапию. С помощью широкомасштабного секвенирования с использованием молекулярного баркодирования мы смогли определить количественную представленность клонотипов Т-клеток периферической крови и впервые проследить динамику восстановления клононального репертуара Т-лимфоцитов на протяжении 2 лет по-

сле аутологичной ТГСК у двух пациентов с анкилозирующим спондилитом. Восстановление разнообразия репертуара Т-клеток у пациентов с АС заняло больше года, что согласуется с динамикой восстановления репертуара у взрослых пациентов, описываемой другими авторами. При этом спустя 2 года после ТГСК до 25% клеток в репертуаре обследованных пациентов оказались представлены клонотипами из репертуара до трансплантации. Нам удалось показать, что практически все высокопредставленные и небольшая фракция низкопредставленных клонотипов первоначального репертуара пережили ТГСК.

Результаты нашей работы существенно расширяют данные о функционировании иммунной системы при ТГСК и могут быть использованы для оптимизации и разработки новых эффективных протоколов аутологичной ТГСК, применяемой для терапии тяжелых форм АС. ●

*Работа поддержана РФФИ  
(гранты № 16-04-01881 и 17-04-01568)  
и стипендией Президента РФ для Е.А. Комеч  
(№ СП-1264.2016.4).*

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Sieper J., Poddubnyy D. // *Nat. Rev. Rheumatol.* 2016. V. 12. № 5. P. 282–295.
- Farge D., Arruda L.C.M., Brigant F., Clave E., Douay C., Marjanovic Z., Deligny C., Maki G., Gluckman E., Toubert A., et al. // *J. Hematol. Oncol.* 2017. V. 10. № 1. P. 21.
- Leone A., Radin M., Almarzoqi A.M., Al-Saleh J., Roccatello D., Sciascia S., Khamashta M. // *Autoimmun. Rev.* 2017. V. 16. № 5. P. 469–477.
- Muraro P.A., Robins H., Malhotra S., Howell M., Phippard D., Desmarais C., de Paula Alves Sousa A., Griffith L.M., Lim N., Nash R.A., et al. // *J. Clin. Inv.* 2014. V. 124. № 3. P. 1168–1172.
- Wu Q., Pesenacker A.M., Stansfield A., King D., Barge D., Foster H.E., Abinun M., Wedderburn L.R. // *Immunology.* 2014. V. 142. № 2. P. 227–236.
- van Heijst J.W.J., Ceberio I., Lipuma L.B., Samilo D.W., Wasilewski G.D., Gonzales A.M.R., Nieves J.L., van den Brink M.R.M., Perales M.A., Pamer E.G., et al. // *Nat. Med.* 2013. V. 19. № 3. P. 372–377.
- Britanova O.V., Bochkova A.G., Staroverov D.B., Fedorenko D.A., Bolotin D.A., Mamedov I.Z., Turchaninova M.A., Putintseva E.V., Kotlobay A.A., Lukyanov S.A., et al. // *Bone Marrow Transplant.* 2012. P. 1–3.
- Mamedov I.Z., Britanova O.V., Chkalina A.V., Staroverov D.B., Amosova A.L., Mishin A.S., Kurnikova M.A., Zvyagin I.V., Mutovina Z.Y., Gordeev A.V., et al. // *Autoimmunity.* 2009. V. 42. № 6. P. 525–536.
- van der Linden S., Valkenburg H.A., Cats A. // *Arthritis Rheum.* 1984. V. 27. № 4. P. 361–368.
- Zvyagin I.V., Mamedov I.Z., Tatarinova O.V., Komech E.A., Kurnikova E.E., Boyakova E.V., Brilliantova V., Shelikhova L.N., Balashov D.N., Shugay M., et al. // *Leukemia.* 2017. V. 31. № 5. P. 1145–1153.
- Shugay M., Britanova O.V., Merzlyak E.M., Turchaninova M.A., Mamedov I.Z., Tuganbaev T.R., Bolotin D.A., Staroverov D.B., Putintseva E.V., Plevova K., et al. // *Nat. Methods.* 2014. V. 11. № 6. P. 653–655.
- Bolotin D.A., Shugay M., Mamedov I.Z., Putintseva E.V., Turchaninova M.A., Zvyagin I.V., Britanova O.V., Chudakov D.M. // *Nat. Methods.* 2013. V. 10. № 9. P. 813–814.
- Egorov E.S., Merzlyak E.M., Shelenkov A.A., Britanova O.V., Sharonov G.V., Staroverov D.B., Bolotin D.A., Davydov A.N., Barsova E., Lebedev Y.B., et al. // *J. Immunol.* 2015. V. 194. № 12. P. 6155–6163.
- R Core Team // *R Foundation for Statistical Computing.* Vienna, Austria. 2015.
- Nazarov V.I., Pogorelyy M.V., Komech E.A., Zvyagin I.V., Bolotin D.A., Shugay M., Chudakov D.M., Lebedev Y.B., Mamedov I.Z. // *BMC Bioinformatics.* 2015. V. 16. № 1. P. 175.
- Hughes J.B., Hellmann J.J., Ricketts T.H., Bohannon B.J. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2001. V. 67. № 10. P. 4399–4406.
- Hou X.-L., Wang L., Ding Y.-L., Xie Q., Diao H.-Y. // *Genes Immun.* 2016. V. 17. № 3. P. 153–164.
- Kivioja T., Vähärautio A., Karlsson K., Bonke M., Enge M., Linnarsson S., Taipale J. // *Nat. Methods.* 2011. V. 9. № 1. P. 72–74.
- Mamedov I.Z., Britanova O.V., Zvyagin I.V., Turchaninova M.A., Bolotin D.A., Putintseva E.V., Lebedev Y.B., Chudakov D.M. // *Front. Immunol.* 2013. V. 4. P. 456.
- Britanova O.V., Shugay M., Merzlyak E.M., Staroverov D.B., Putintseva E.V., Turchaninova M.A., Mamedov I.Z., Pogorelyy M.V., Bolotin D.A., Izraelson M., et al. // *J. Immunol.* 2016. V. 196. № 12. P. 5005–5013.
- Britanova O.V., Putintseva E.V., Shugay M., Merzlyak E.M., Turchaninova M.A., Staroverov D.B., Bolotin D.A., Lukyanov S., Bogdanova E.A., Mamedov I.Z., et al. // *J. Immunol.* 2014. V. 192. № 6. P. 2689–2698.
- Komech E.A., Pogorelyy M.V., Egorov E.S., Britanova O.V., Rebrikov D.V., Bochkova A.G., Schmidt E.I., Shostak N.A., Shugay M., Lukyanov S., et al. // *Rheumatology (Oxford).* 2018. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kex517>
- Deodhar A., Yu D. // *Semin. Arthritis Rheum.* 2017. V. 47. № 3. P. 343–350.
- Mamedov I.Z., Britanova O.V., Bolotin D.A., Chkalina A.V., Staroverov D.B., Zvyagin I. V., Kotlobay A.A., Turchaninova M.A., Fedorenko D.A., Novik A.A., et al. // *EMBO Mol. Med.* 2011. V. 3. № 4. P. 201–207.
- Swart J.F., Delemarre E.M., van Wijk F., Boelens J.-J., Kuball J., van Laar J.M., Wulfraat N.M. // *Nat. Rev. Rheumatol.* 2017. V. 13. № 4. P. 244–256.
- Kanakry C.G., Ganguly S., Luznik L. // *Oncoimmunology.* 2015. V. 4. № 3. P. e974393.
- van Wijk F., Roord S.T., Vastert B., de Kleer I., Wulfraat N., Prakken B.J. // *Autoimmunity.* 2008. V. 41. № 8. P. 585–591.
- Grant C.R., Liberal R., Mieli-Vergani G., Vergani D., Longhi M.S. // *Autoimmun. Rev.* 2015. V. 14. № 2. P. 105–116.
- Delemarre E.M., van den Broek T., Mijnheer G., Meerding J., Wehrens E.J., Olek S., Boes M., van Herwijnen M.J.C., Broere F., van Royen A., et al. // *Blood.* 2016. V. 127. № 1. P. 91–101.