

СУБПОПУЛЯЦИОННАЯ СТРУКТУРА ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ДОНОРОВ

А.А. Борунова, Т.Н. Заботина, Э.К. Шоуа, Г.З. Чкадуа, А.И. Черткова, Д.В. Табаков, Е.Н. Захарова, Е.В. Огородникова, З.Г. Кадагидзе

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Анна Анатольевна Борунова Vorunova-a@yandex.ru

Введение. Длительный мониторинг показателей иммунной системы у онкологических больных в ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, а также отсутствие алгоритма иммунологического исследования и спектра значимых маркеров послужили основой проведения данного исследования.

Цель исследования — представить референсные значения и определить границы нормы для субпопуляций лимфоцитов системного иммунитета.

Материалы и методы. Исследован фенотип лимфоцитов периферической крови 186 здоровых доноров (86 мужчин и 100 женщин), средний возраст $41,9 \pm 12,5$ года. Для оценки многопараметрового фенотипа методом проточной цитометрии применяли моноклональные антитела к CD45, CD3, CD4, CD8, CD16, CD56, CD19, CD25, CD28, CD11b, CD127, HLA-Dr, TCR- γ/δ , Perforin и Granzyme B, меченные различными флуорохромами.

Результаты. Разработана панель маркеров иммунокомпетентных клеток системного иммунитета как основа оценки состояния иммунной системы онкологических больных. Даны референсные значения и границы нормы для характеристики линейной принадлежности клеток с детализацией фенотипической и функциональной неоднородности популяции CD8⁺-лимфоцитов, маркеров активации и пула наивных клеток; характеристики различных типов регуляторных клеток, функциональной активности клеток эффекторного звена иммунитета. Проведен сравнительный анализ иммунорегуляторных индексов и доказана уязвимость формулы CD3⁺CD4⁺/CD3⁺CD8⁺ перед CD4⁺/CD8⁺ индексом.

Заключение. Спектр предложенных показателей является продуктом многолетних исследований, проводимых в лаборатории клинической иммунологии НИИ КО им. Н.Н. Трапезникова ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России с целью поиска значимых критериев для оценки состояния иммунной системы при онкологических заболеваниях.

Ключевые слова: Т-регуляторные клетки, эффекторные лимфоциты, системный иммунитет, границы нормы

Для цитирования: Борунова А.А., Заботина Т.Н., Шоуа Э.К. и др. Субпопуляционная структура лимфоцитов периферической крови доноров. Российский биотерапевтический журнал 2020;19(4):54–64.

DOI: 10.17650/1726-9784-2020-19-4-54-64



SUBPOPULATION STRUCTURE OF PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES OF DONORS

A.A. Borunova, T.N. Zabolina, E.K. Shoua, G.Z. Chkadua, A.I. Chertkova, D.V. Tabakov, E.N. Zakharova, E.V. Ogorodnikova, Z.G. Kadagidze

N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of the Russian Federation; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia

Introduction. Long-term monitoring of immune system parameters in cancer patient in FSBI “N.N. Blokhin Medical Research Center of Oncology” of the Ministry of Health of Russia, as well as the absence of an immunological research algorithm and a spectrum of significant markers, served as the basis for this study.

Purpose. To present reference values and determine the normal range for subpopulations of systemic immunity lymphocytes.

Materials and methods. The phenotype of peripheral blood lymphocytes was studied in 186 healthy donors (86 men and 100 women), mean age $41,9 \pm 12,5$ years. To assess the multivariate phenotype by flow cytometry, monoclonal antibodies to CD45, CD3, CD4, CD8, CD16, CD56, CD19, CD25, CD28, CD11b, CD127, HLA-Dr, TCR- γ/δ , Perforin and Granzyme B labeled various fluorochromes.

Results. A panel of markers of immunocompetent cells of systemic immunity was developed as a basis for assessing the state of the immune system of cancer patients. Reference values and normal boundaries are given for characterizing the linearity of cells with detailing of the phenotypic and functional heterogeneity of the population of CD8⁺-lymphocytes, activation markers and the pool of naive cells; characteristics of various types of regulatory cells, functional activity of cells of the effector link of immunity. A comparative analysis of immunoregulatory indices was carried out and the vulnerability of the formula CD3⁺CD4⁺/CD3⁺CD8⁺ to the CD4⁺/CD8⁺ index was proved.

Conclusion. The spectrum of the proposed indicators is the product of many years of research carried out in the laboratory of clinical immunology of the Federal State Budgetary Institution “N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology” of the Ministry of Health of the Russian Federation, in order to search for significant criteria for assessing the state of the immune system in cancer.

Key words: T-regulatory cells, effector lymphocytes, systemic immunity, limits of the norm

For citation: Borunova A.A., Zabolina T.N., Shoua E.K. et al. Subpopulation structure of peripheral blood lymphocytes of donors. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2020;19(4):54–64. (In Russ.).

Введение

Нарушения иммунной системы могут привести к патологии — от аутоиммунных заболеваний (при повышенной активности) до опухолевого процесса (при ее снижении). Возможность диагностики этих нарушений ограничена не только нашим пониманием происходящих в иммунной системе процессов, но и имеющимися средствами их оценки, визуализации. Фенотипирование субпопуляций лимфоцитов, циркулирующих в периферической крови, — один из основных методов оценки состояния системного иммунитета. Современный спектр маркеров и их комбинаций раскрывает сложносоставные субпопуляции с уникальными свойствами. Но публикации, посвященные норме, носят мозаичный характер и либо отражают специфику активированных клеток, либо посвящены субпопуляциям регуляторных лимфоцитов, либо только линейным субпопуляциям клеток [1–3].

Длительный мониторинг показателей иммунной системы у онкологических больных, а также отсутствие алгоритма иммунологического исследования и спектра значимых маркеров послужили основой проведения данной работы. Исследуемая панель маркеров была обогащена показателями, характеризующими эффекторное и регуляторное звенья иммунитета. Особое внимание было уделено гетерогенности популяции CD8⁺ клеток и, как следствие, иммунорегуляторным индексам CD4⁺/CD8⁺ и CD3⁺CD4⁺/CD3⁺CD8⁺. Проведен анализ изменения показателей в зависимости от возраста.

Цель исследования — представить референсные значения и определить границы нормы для субпопуляций лимфоцитов.

Материалы и методы

В работе для анализа была использована периферическая кровь, полученная от здоровых доноров (отделение переливания крови ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России), а также практически здоровых лиц — сотрудников центра, в рамках ежегодного профилактического осмотра в период с 2005 по 2020 г.

Проведена статистическая обработка показателей иммунной системы в группе практически здоровых людей ($n = 213$), выявлены выбросы по каждому по-

казателю ($n = 27$), которые были исключены из группы. Таким образом, в исследовании принимало участие 186 человек (86 мужчин и 100 женщин), что соответствует требованиям Международной федерации клинической химии (International Federation of Clinical Chemistry, IFCC), которая рекомендует для расчета референсных интервалов использовать выборку $n \geq 120$.

Исследование субпопуляций клеточного иммунитета проводили методом проточной цитометрии с использованием цитометра FACSCalibur (BD, США). Фенотипирование лимфоцитов включало в себя 3–4-цветное окрашивание поверхностных и внутриклеточных структур с использованием различных стратегий каскадного гейтирования клеток. Обработку данных проводили с помощью программного обеспечения CELLQuest, количество событий в гейте $\geq 10\,000$. Для оценки фенотипа применяли моноклональные антитела к CD45, CD3, CD4, CD8, CD16, CD56, CD19, CD25, CD28, CD11b, CD127, HLA-Dr, TCR γ/δ , Perforin и Granzyme B, меченные различными флуорохромами (Beckman Coulter, США). Сумма Т-, В-лимфоцитов и NK-клеток составляла $100 \pm 5\%$, что соответствует требованиям системы внешней оценки качества лабораторных исследований, как отечественной (ФСВОК), так и зарубежной (CEQUAL).

Описательная статистика показателей системного иммунитета включала в себя расчет среднего значения, стандартного отклонения, 95 % доверительного интервала, минимального и максимального значения, медианы и квартилей. Для определения нижней и верхней границ показателей использовали референтные пределы 2,5 и 97,5 % для каждого показателя в соответствии с рекомендациями IFCC и ГОСТ Р 53022.3–2008.

Описательная статистика представлена для всей выборки, деление на группы по возрасту проведено в соответствии с градацией Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) (молодой: 18–44 года; средний: 45–59 лет; пожилой: 60–74 года). К молодому возрасту относилась половина выборки — 53,8 % (100/186), к среднему — 36,6 % (68/186), и менее 10 % — к пожилому (18/186). Средний возраст составил 41,9 года. Соотношение мужчин и женщин во всех возрастных группах было одинаковым (45 и 55 % соответственно).

Статистическую значимость различий показателей у мужчин и женщин оценивали с использованием *t*-критерия Стьюдента, при нормальном распределении в 2 группах, или критерия Манна–Уитни, если нормального распределения не было хотя бы в 1 из групп. Для оценки возрастных особенностей популяций применяли критерий Краскела–Уоллиса с последующей попарной оценкой критерия Манна–Уитни и анализ парной корреляции по Спирмену, так как в данной выборке не было нормального распределения по возрасту ($K-S = 1,525$; $p = 0,019$). Для выявления взаимосвязи между показателями применяли анализ парной корреляции по Пирсону (при нормальном распределении признаков) или по Спирмену (при отсутствии нормального распределения). Уровень статистической значимости был определен как $p < 0,05$. Статистическую обработку проводили с помощью пакета статистических программ SPSS 17.0.

Результаты

Описательная статистика показателей субпопуляций лимфоцитов донорской группы приведена в табл. 1

Популяция CD8⁺-лимфоцитов, в отличие от CD4⁺-клеток, неоднородна. В ней были выявлены субпо-

пуляции с высокой и низкой плотностью экспрессии CD8-антигена (CD8^{hi}- и CD8^{low}-клетки). Одновременный анализ экспрессии CD3- и CD8-антигенов показал, что субпопуляция CD8^{hi}-клеток всегда является CD3-позитивной. Субпопуляция CD8^{low}-лимфоцитов может полностью отсутствовать, а ее максимальное значение не превышает 10 %. На большей части CD8^{low}-клеток отмечается отсутствие Т-клеточного антигена CD3 и наличие белков NK-клеток – CD3⁻CD16⁺CD56⁺ (рис. 1).

Анализ парной корреляции популяций CD4⁺- и CD8⁺-лимфоцитов выявил обратную зависимость этих показателей ($r = -0,453$; $p < 0,000$), при этом статистически значимой была обратная связь CD4⁺- и CD3⁻CD8⁺-клеток ($r = -0,376$; $p < 0,000$), тогда как корреляция между CD4⁺- и CD3⁺CD8⁺-лимфоцитами была выражена слабее ($r = -0,242$; $p < 0,001$).

Сравнение 2 иммунорегуляторных индексов показало, что у соотношения CD4⁺/CD8⁺ более сильная прямая связь с показателем CD3⁺CD4⁺ ($r = 0,843$; $p < 0,000$), чем у CD3⁺CD4⁺/CD3⁺CD8⁺ ($r = 0,733$; $p < 0,000$). Обратная зависимость CD4⁺/CD8⁺ и CD8⁺-клеток была так же более выражена ($r = -0,804$; $p < 0,000$), чем у соотношения CD3⁺CD4⁺/CD3⁺CD8⁺ и CD3⁺CD8⁺-лимфоцитов ($r = -0,790$; $p < 0,000$).

Таблица 1. Описательная статистика показателей субпопуляций лимфоцитов донорской группы ($n = 186$)

Table 1. Descriptive statistics of donor group lymphocyte subpopulation indicators ($n = 186$)

Фенотип клеток Cells phenotype	\bar{X}	(S)	95 % ДИ 95 % CI		Min	Max	Процентили Percentiles				
			н/г l/b	в/г u/b			2,5	25	50	75	97,5
Характеристика линейной принадлежности клеток Characterization of linear cell accessory											
CD3 ⁺	72,7	5,7	71,7	73,6	57,0	84,4	59,3	68,8	72,9	76,7	81,1
CD3 ⁺ CD4 ⁺	43,1	5,8	42,3	44,3	28,9	52,6	30,3	39,1	42,9	48,4	50,6
CD3 ⁺ CD8 ⁺	26,0	4,6	25,3	26,7	17,2	35,9	17,4	22,1	26,6	28,6	30,7
CD3 ⁺ CD8 ⁺	7,7	2,7	7,2	8,1	1,2	12,9	2,9	5,5	7,9	8,8	10,6
CD8 ⁺	33,7	4,7	32,9	34,5	20,0	43,9	25,4	30,3	33,4	38,0	41,4
CD4 ⁺ CD8 ⁺	1,7	1,0	1,7	2,0	0,1	4,8	0,1	0,9	1,9	2,3	3,7
Индекс CD4 ⁺ /CD8 ⁺ Index CD4 ⁺ /CD8 ⁺	1,3	0,3	1,2	1,3	0,7	2,0	0,8	1,1	1,3	1,5	2,0
Индекс CD3 ⁺ CD4 ⁺ /CD3 ⁺ CD8 ⁺ Index CD3 ⁺ CD4 ⁺ /CD3 ⁺ CD8 ⁺	1,7	0,5	1,6	1,8	0,8	3,3	0,9	1,3	1,6	2,1	2,8
CD3 ⁺ TCRγ/δ ⁺	3,8	1,2	3,4	4,3	0,9	7,6	1,0	2,6	3,5	5,2	7,0
CD3—CD16 ⁺ CD56 ⁺	16,1	4,7	14,9	16,5	4,8	25,0	6,4	12,6	15,6	19,0	22,8
CD8 ⁺ CD16 ⁺	7,3	3,4	6,7	7,8	0,7	16,1	1,5	5,2	6,8	9,1	12,9
CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺	6,2	2,8	5,8	6,8	1,0	12,8	1,4	4,2	5,8	8,2	10,1
CD3—CD19 ⁺	9,8	3,4	8,9	10,0	3,9	22,0	4,9	6,9	9,5	12,2	17,5

Окончание табл. 1

End of table 1

Фенотип клеток Cells phenotype	\bar{X}	(S)	95 % ДИ 95 % CI		Min	Max	Процентили Percentiles				
			н/г l/b	в/г u/b			2,5	25	50	75	97,5
Функциональная и активационная характеристика клеток Functional and activation characteristics of cells											
HLA ⁺ DR ⁺	16,4	4,7	15,5	17,2	6,6	27,0	7,0	13,5	16,4	19,8	25,0
CD3 ⁺ HLA ⁻ DR ⁺	7,3	3,4	7,0	8,2	1,7	17,7	1,9	4,3	6,9	9,9	15,2
CD25 ⁺	12,9	5,0	13,3	15,5	1,8	22,6	3,0	9,3	13,2	16,2	22,2
CD4 ⁺ CD25 ⁺	8,8	5,2	9,0	11,4	1,7	18,6	2,1	5,9	7,6	11,1	15,4
CD25 ⁺ CD127 ^{-*}	4,7	1,9	4,5	5,2	1,0	12,4	1,5	3,4	4,6	5,7	9,2
CD28 ⁺	61,3	10,2	59,9	63,1	29,6	85,9	36,9	56,1	61,6	67,1	82,3
CD4 ⁺ CD28 ⁺	42,6	5,7	41,0	44,5	28,2	52,5	30,1	38,3	43,7	47,5	50,7
CD4 ⁺ CD28 ⁻	3,4	1,2	2,9	3,8	0,5	6,2	0,5	2,1	3,3	4,8	6,1
CD4 ⁺ CD28 ^{-*}	7,5	1,2	6,5	8,5	1,1	10,1	1,5	4,4	7,7	8,6	10,1
CD8 ⁺ CD28 ⁺	17,1	5,6	16,3	17,8	5,6	29,1	6,8	14,9	17,3	20,	26,6
CD8 ⁺ CD28 ⁺	16,3	4,7	15,3	17,6	4,5	28,1	5,8	11,8	15,5	20,6	25,4
Индекс CD8 ⁺ CD28 ⁺ /CD8 ⁺ CD28 ⁻ Index CD8 ⁺ CD28 ⁺ /CD8 ⁺ CD28 ⁻	1,7	0,9	1,4	1,9	0,2	4,1	0,4	0,9	1,5	2,4	3,5
CD11b ⁺	37,7	10,9	35,1	39,1	16,9	82,2	18,3	30,0	36,9	42,9	65,7
CD8 ⁺ CD11b ⁺	19,0	6,9	17,6	20,2	6,3	45,4	7,6	14,1	18,4	22,7	41,2
CD8 ⁺ CD11b ⁻	14,6	5,6	13,1	15,3	1,4	29,0	1,5	11,2	14,1	18,9	25,9
CD11b ⁺ CD28 ^{-**}	45,0	13,8	42,1	47,0	20,0	79,0	20,7	35,1	43,5	54,1	69,1
CD11b ⁺ CD28 ^{***}	9,1	6,1	7,1	9,2	1,7	35,0	1,9	4,6	7,1	13,0	26,4
CD11b ⁻ CD28 ^{-**}	5,5	4,1	5,0	7,1	0,3	19,1	0,4	2,2	5,0	8,1	15,6
CD11b ⁻ CD28 ^{***}	40,5	13,3	38,3	43,3	15,3	66,5	21,2	31,1	42,0	49,5	63,8
Оценка эффекторных клеток Evaluation of effector cells											
CD16 ⁺ Perforin ⁺	17,9	5,7	16,7	18,6	5,6	28,7	8,3	12,9	18,0	22,2	25,2
active CD16	87,2	11,7	86,4	90,2	58,4	99,6	68,0	83,3	90,5	96,0	99,6
CD8 ⁺ Perforin ⁺	12,4	3,7	11,9	13,3	2,1	20,0	4,2	9,9	12,9	15,0	18,7
active CD8	38,3	8,3	37,3	41,0	8,4	57,8	14,3	30,8	36,0	44,9	48,4
CD4 ⁺ Gr ⁺	3,2	1,1	2,7	3,7	0,1	6,9	0,1	2,0	3,1	5,0	6,7
active CD4	7,0	2,7	5,9	8,2	0,2	10,1	0,2	4,3	6,6	8,8	10,1

Примечание. Min, Max, \bar{X} – минимальное, максимальное, среднее значения относительного количества лимфоцитов; (S) – стандартное отклонение; 95 % ДИ: н/г и в/г – нижняя и верхняя граница 95 % доверительного интервала среднего значения; active – доля клеток, содержащих цитолитические гранулы перфорины или гранзима в структуре CD16⁺-, CD8⁺-, CD4⁺-лимфоцитов; *доля CD25⁺CD127⁻-, Gr⁺-, CD28⁻-клеток в структуре CD4⁺-лимфоцитов; **доля клеток в структуре CD8⁺-лимфоцитов.

Note. Min, Max, \bar{X} – minimum, maximum, average value of the relative number of lymphocytes; (S) – standard deviation; 95 % CI l/b and u/b the lower and upper boundary of the 95 % confidence interval of the average value; active – proportion of cells containing cytolytic granules of perforin or granzyme in the structure of CD16⁺-, CD8⁺-, CD4⁺-lymphocytes; *the proportion of CD25⁺CD127⁻-, Gr⁺-, CD28⁻-cells in the structure of CD4⁺-lymphocytes; **the proportion of cells in the structure of CD8⁺-lymphocytes.

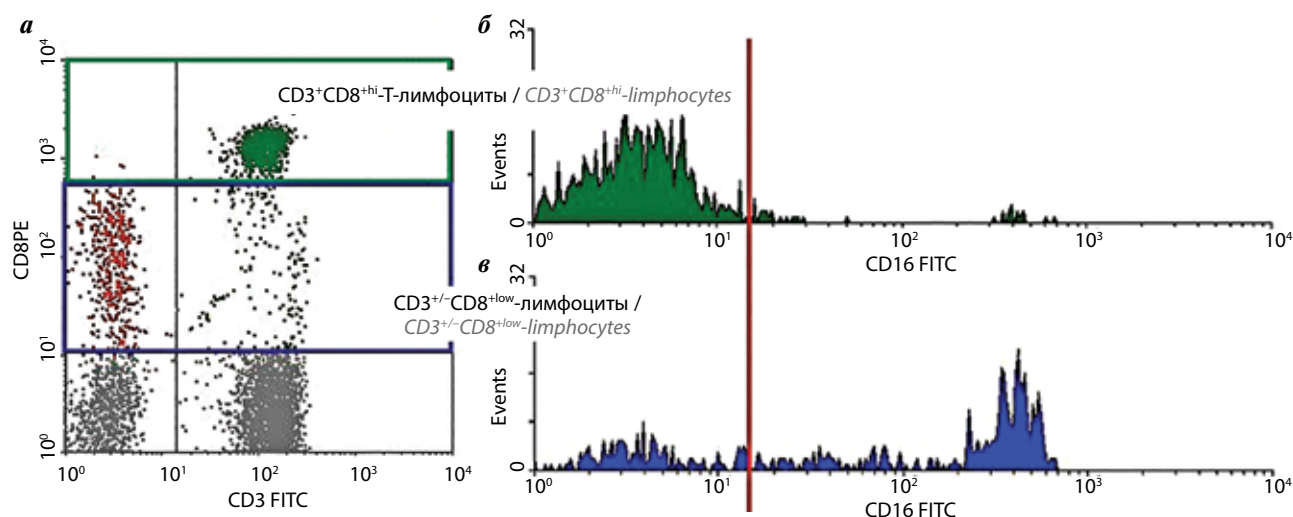


Рис. 1. Гетерогенность $CD8^+$ -лимфоцитов. На цитограмме (а) приведен DotPlot CD3 vs CD8, где красным цветом выделена популяция $CD8^{+low}$ -клеток, не несущих на своей поверхности CD3-антиген; зеленым цветом — $CD3^{+}$ -лимфоциты с высокой и низкой плотностью CD8-антигена. На гистограмме (б) показано отсутствие экспрессии CD16-антигена на поверхности $CD8^{+hi}$ -клеток; на гистограмме (в) — положительная экспрессия CD16-антигена на поверхности $CD8^{+low}$ -клеток

Fig. 1. Heterogeneity of $CD8^+$ -lymphocytes. Cytogram (a) shows DotPlot CD3 vs CD8, where the population of $CD8^{+low}$ -cells that do not expression the CD3-antigen on their surface is highlighted in red; highlighted in green are $CD3^{+}$ -lymphocytes with high and low density of CD8-antigen. The histogram (б) shows the absence of expression of the CD16-antigen on the surface of $CD8^{+hi}$ -cells; histogram (в) shows positive expression of the CD16 antigen on the surface of $CD8^{+low}$ -cells

Отмечена фенотипическая особенность Т-клеток, несущих на своей поверхности TCR- γ/δ , — высокая плотность экспрессии CD3-антигена (рис. 2). Эта популяция эффекторных лимфоцитов имеет обратную слабую связь с NK-клетками, как с $CD3^{-}CD16^{+}CD56^{+}$ ($r = -0,218$; $p < 0,045$), так и с $CD3^{-}CD8^{+}$ ($r = -0,216$; $p < 0,047$) лимфоцитами, а также с популяцией $CD8^{+}$ ($r = -0,242$; $p < 0,026$), но не с $CD3^{+}$ -клетками (в том числе $CD3^{+}CD4^{+}$, $CD3^{+}CD8^{+}$).

При анализе $CD8^{+}$ -лимфоцитов отмечено, что половина популяции имеет на своей поверхности CD28-антиген и для этих клеток характерна высокая плотность экспрессии CD8-антигена, а в $CD8^{+}CD28^{-}$ -лимфоцитах выявлялись клетки и с высокой, и с низкой плотностью. Обратная картина наблюдалась в отношении CD11b-антигена: для $CD8^{+}CD11b^{+}$ -клеток была характерна гетерогенность по плотности экспрессии CD8-антигена, тогда как клетки, лишенные CD11b-белка, были исключительно $CD8^{+hi}$ (см. рис. 2). Для определения регуляторных и эффекторных клеток в структуре $CD8^{+}$ -клеток использован многоцветный анализ с каскадным гейтированием. Одновременное исследование экспрессии CD28 и CD11b-антигенов на поверхности $CD8^{+}$ -клеток позволило оценить количество эффекторных ($CD28^{-}CD11b^{+}$), регуляторных ($CD28^{-}CD11b^{-}$), наивных ($CD28^{+}CD11b^{-}$) $CD8^{+}$ -лимфоцитов и пул эффекторных клеток ранней активации и памяти ($CD28^{+}CD11b^{+}$). Эффекторные $CD8^{+}CD28^{-}CD11b^{+}$ -лимфоциты имеют обратную слабую связь с $CD4^{+}$ -лимфоцитами ($r = -0,278$; $p < 0,000$). А субпопуляции наивных клеток и ранней активации/памя-

ти, наоборот, были прямо зависимы от Т-хелперных клеток ($r = 0,186$; $p < 0,020$ и $r = 0,177$; $p < 0,027$ соответственно).

Практически вся популяция НК-клеток у здоровых доноров содержит перфорин. А в популяции $CD8^{+}$ -лимфоцитов цитотоксическим потенциалом обладает около 40 % клеток, и между ними и количеством $CD28^{-}CD11b^{+}$ -активированных лимфоцитов отмечается заметная прямая достоверная корреляционная зависимость ($r = 0,5698$; $p < 0,000$). Обращает на себя внимание то, что перфорин содержится преимущественно в субпопуляции клеток с низкой плотностью экспрессии CD8-антигена.

Субпопуляции регуляторных $CD4^{+}$ -Т-клеток имели обратную слабую или умеренную связь с основной популяцией $CD3^{+}CD4^{+}$ -клеток: $CD4^{+}CD25^{+}CD127^{-}$ ($r = -0,241$; $p < 0,001$), $CD4^{+}CD28^{-}$ ($r = -0,399$; $p < 0,006$), active CD4 ($r = -0,309$; $p < 0,037$). Между субпопуляциями $CD45^{+}CD4^{+}CD28^{-}$ и $CD45^{+}CD4^{+}Gr^{+}$ регуляторных клеток существует прямая высокая достоверная зависимость ($r = 0,887$; $p < 0,000$). Для субпопуляции $CD4^{+}CD25^{+}CD127^{-}$ -лимфоцитов была характерна прямая слабая связь с эффекторными клетками ($CD16^{+}Perforin^{+}$: $r = 0,165$; $p < 0,027$; active CD8: $r = 0,168$; $p < 0,025$) и обратная — с наивными лимфоцитами ($CD8^{+}CD28^{+}CD11b^{+}$: $r = -0,251$; $p < 0,002$).

Сравнительный анализ субпопуляций лимфоцитов у мужчин и женщин не выявил статистически значимых различий.

Чтобы изучить изменение количества субпопуляций лимфоцитов в зависимости от возраста,

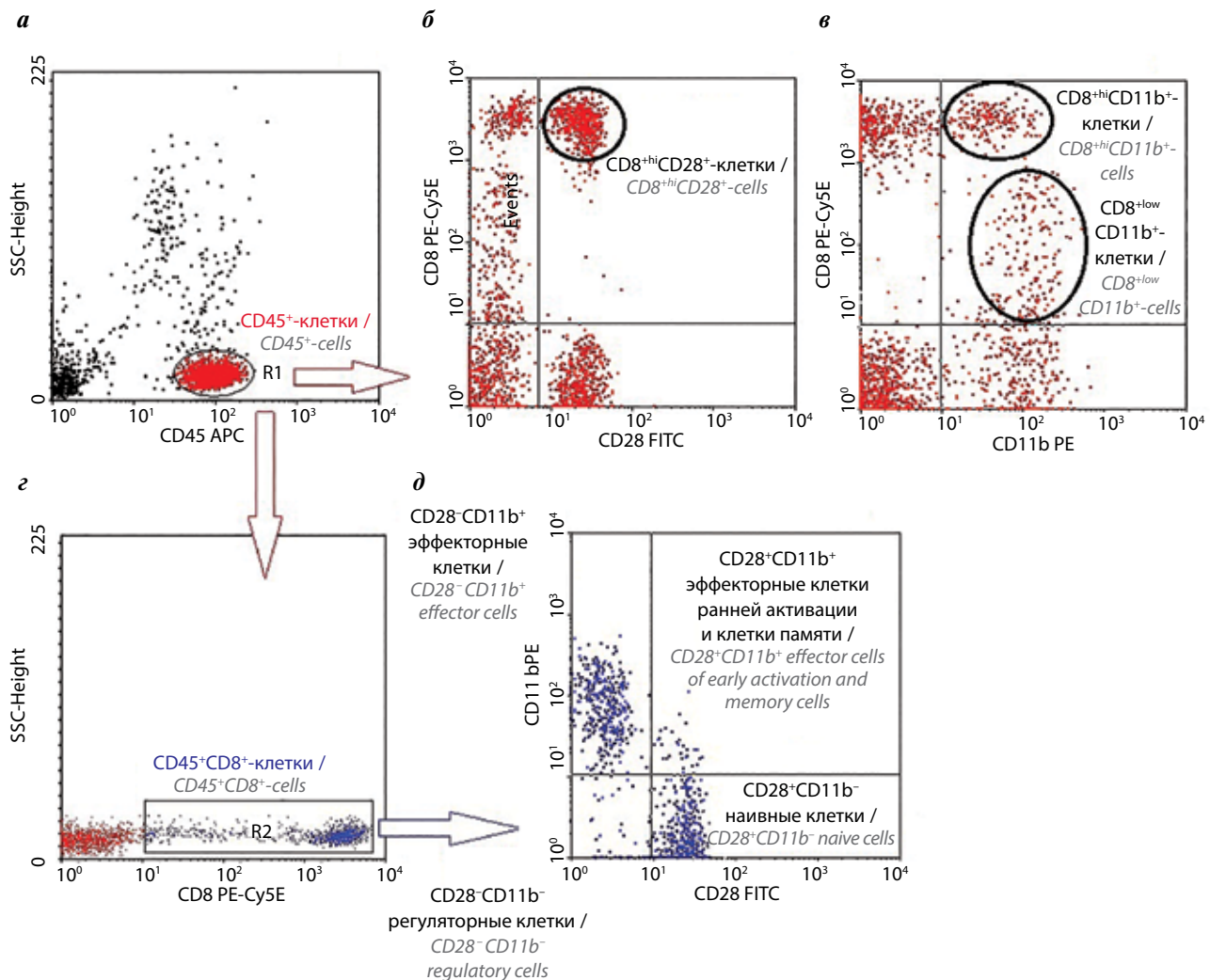


Рис. 2. Экспрессия CD28- и CD11b-антигенов на поверхности CD8⁺-клеток. На цитограмме (а) приведен пример гейтирования лимфоцитов (CD45⁺-клеток) для последующего анализа; б – в DotPlot CD28 FITC vs CD8 PE-Cy5 определяются CD8⁺CD28⁺ только с высокой экспрессией CD8-антигена; в – в DotPlot CD11b PE vs CD8 PE-Cy5 показана гетерогенность CD8⁺CD11b⁺ популяции по экспрессии CD8-антигена; г – гейтирование CD8⁺-лимфоцитов в структуре CD45⁺-клеток для последующего анализа в DotPlot CD28 FITC vs CD11b PE (д) с целью выделения субпопуляций эффекторных лимфоцитов, наивных клеток, эффекторных клеток ранней активации/клеток памяти и регуляторных лимфоцитов

Fig. 2. Expression of CD28- and CD11b-antigens on the surface of CD8⁺-cells. Cytogram (a) shows an example of gating lymphocytes (CD45⁺-cells) for subsequent analysis; б – in DotPlot CD28 FITC vs CD8 PE-Cy5, CD8⁺CD28⁺ are detected only with high expression of the CD8-antigen; в – DotPlot CD11b PE vs CD8 PE-Cy5 shows the heterogeneity of the CD8⁺CD11b⁺ population in heterogeneity of the expression of the CD8 antigen; г – gating of CD8⁺-lymphocytes in the structure of CD45⁺-cells for subsequent analysis in DotPlot CD28 FITC vs CD11b PE (д) in order to isolate subpopulations of effector lymphocytes, naive cells, early activation effector cells/memory cells and regulatory lymphocytes

здоровые доноры были разделены на 3 группы в соответствии с градацией, регламентированной ВОЗ. Между группами были выявлены статистически значимые различия в субпопуляциях, преимущественно характеризующих функциональную активность клеток иммунной системы (табл. 2). Анализ показателей линейной принадлежности клеток не выявил достоверных различий между группами. Эти наблюдения были дополнительно подтверждены методом корреляционного анализа с использованием коэффициента Спирмена.

Обсуждение

Современная иммунологическая лаборатория, осуществляющая оценку фенотипа лимфоцитов, ведет анализ своих норм – исследование практически здоровых лиц с учетом региональных особенностей населения и климатических, а где-то и экологических, аспектов. Цель нашей работы заключалась в определении референсных значений и границ нормы для субпопуляций лимфоцитов на основе разработанной в лаборатории клинической иммунологии панели маркеров иммунокомпетентных клеток

Таблица 2. Сравнительная характеристика показателей субпопуляций лимфоцитов периферической крови доноров в зависимости от возраста ($n = 186$)Table 2. Comparative characteristics of peripheral blood lymphocyte subpopulation indices of donors according to age ($n = 186$)

Фенотип клеткок Cells phenotype	Молодой возраст (18–44 года) <i>n</i> = 100 Young age (18–44 years) <i>n</i> = 100			Средний возраст (45–59 лет) <i>n</i> = 68 Middle age (45–59 years) <i>n</i> = 68			Пожилый возраст (60–74 года) <i>n</i> = 18 Elderly age (60–74 years) <i>n</i> = 18			H	U			<i>r</i>	<i>p</i>
	Me	Q1	Q3	Me	Q1	Q3	Me	Q1	Q3		Молодой / средний возраст Young/middle age	Молодой / пожил возраст Young/elderly age	Средний / пожил возраст Middle/elderly age		
CD4 ⁺ CD8 ⁺	1,4	0,9	2,3	2,2	2,1	2,6	3,2	1,3	3,4	0,001	0,001	0,026	—	0,356	0,000
CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺	5,2	3,2	7,9	6,8	5,3	8,6	7,0	4,1	8,8	0,013	0,003	—	—	0,168	0,022
CD25 ⁺	12,8	9,8	15,3	15,0	12,2	16,8	16,9	13,5	20,7	0,001	0,003	0,003	—	0,269	0,000
CD4 ⁺ CD25 ⁺	7,3	5,0	9,9	8,8	7,0	11,9	12,2	6,8	17,0	0,000	0,005	0,00	0,019	0,268	0,000
CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 [–]	4,1	3,0	5,0	4,6	3,4	5,9	5,8	4,2	8,0	0,000	0,009	0,001	0,029	0,321	0,000
CD8 ⁺ CD28 ⁺	18,3	16,3	20,4	16,7	11,8	19,7	11,2	5,9	16,2	0,001	0,007	0,004	0,057	–0,212	0,008
CD8 ⁺ CD28 [–]	13,8	11,3	17,2	18,4	13,6	22,2	22,2	19,5	24,6	0,000	0,000	0,001	—	0,392	0,000
Индекс CD8 ⁺ CD28 ⁺ / CD8 ⁺ CD28 [–] Index CD8 ⁺ CD28 ⁺ / CD8 ⁺ CD28 [–]	1,1	0,7	1,6	0,7	0,5	1,1	0,6	0,4	0,9	0,002	0,004	0,000	—	–0,219	0,003
CD11b ⁺ CD28 [–]	37,5	32,5	44,7	45,9	36,5	56,0	60,3	52,4	69,7	0,000	0,000	0,000	0,009	0,364	0,000
CD11b [–] CD28 [–]	3,5	1,5	6,9	5,3	3,3	9,8	8,5	4,3	8,9	0,001	0,000	—	—	–0,291	0,000
CD11b [–] CD28 ⁺	45,3	39,4	55,5	40,4	29,8	48,78	25,4	16,8	35,9	0,030	0,024	—	—	–0,269	0,001
CD8 ⁺ Perforin ⁺	12,9	9,2	14,9	13,6	11,0	16,3	17,9	14,2	20,3	0,000	0,054	0,000	0,000	0,331	0,000
active CD8	37,9	30,3	44,9	42,7	36,4	47,9	55,1	44,4	61,3	0,000	0,014	0,000	0,000	0,364	0,000

Примечание. H — критерий Краскела–Уоллеса; U — критерий Манна–Уитни; r — коэффициент корреляции Спирмена; p — статистическая значимость коэффициента корреляции Спирмена; n — количество наблюдений в группе; Me — медиана; Q1 — значение 25 перцентиля или квартиль 1; Q3 — значение 75 перцентиля или квартиль 3; active — доля клеток, содержащих цитолитические гранулы перфорина в популяции CD8⁺-лимфоцитов.

Note. H — Kruskal–Wallace test; U — Mann–Whitney criterion; r — Spearman correlation coefficient; p — statistical significance of Spearman's correlation coefficient; n — number of observations in the group; Me — median; Q1 — the value of the 25 percentile or quartile 1; Q3 — the value of the 75 percentile or quartile 3; active — proportion of cells containing cytolytic granules of CD8⁺-lymphocytes subpopulation.

системного иммунитета как основы оценки состояния иммунной системы онкологических больных.

Границы нормальных показателей для лимфоцитов в линейных популяциях (Т-клеток, в том числе $CD3^+CD4^+$ - и $CD3^+CD8^+$ -лимфоцитов, В- и NK-клеток), полученные в нашем исследовании, были сопоставимы с данными исследований как российских авторов, так и зарубежных [4–7]. Однако такие субпопуляции клеток, как NKT- или $CD3^-CD8^+$ -лимфоциты, отсутствуют в сравнительной характеристике линейных популяций у этих авторов. Следует отметить, что перераспределение в структуре линейных популяций лимфоцитов, характеризующееся снижением количества Т-клеток и увеличением NK-клеток, встречается в норме у практически здоровых лиц, проживающих в экстремальных условиях — в высокогорье или за полярным кругом [8–10]. Это может объяснять значительные отличия показателей нормы в работах китайских авторов [11].

Одной из задач нашего исследования было показать неоднородность популяции $CD8^+$ -клеток, подразделяющихся: по экспрессии CD8-антигена — на клетки с высокой и низкой плотностью; по экспрессии CD3-антигена — на $CD3^+CD8^+$ -Т-лимфоциты и $CD3^-CD8^+$ -NK-клетки. В большинстве отечественных публикаций под популяцией $CD8^+$ -лимфоцитов подразумевают исключительно $CD3^+CD8^+$ -клетки. И даже иммунорегуляторный индекс $CD4^+/CD8^+$ претерпел изменения, став соотношением $CD3^+CD4^+$ и $CD3^+CD8^+$ -Т-лимфоцитов [12, 13]. На наш взгляд, это 2 разных критерия. Индекс $CD3^+CD4^+/CD3^+CD8^+$ характеризует состояние Т-клеток, а $CD4^+/CD8^+$ отражает баланс системного иммунитета. Как показало наше исследование, иммунорегуляторный индекс системный обладает большей силой связи с формирующими его популяциями, чем индекс Т-клеток. Разница между этими критериями состоит в наличии или отсутствии при расчете субпопуляции $CD3^-CD8^+$ -лимфоцитов. И хотя в норме эта субпопуляция может вообще не определяться, обратная зависимость между $CD3^-CD8^+$ -клетками и $CD4^+$ -лимфоцитами сильнее выражена, чем между $CD3^+CD8^+$ - и $CD4^+$ -клетками. Учитывая, что субпопуляция $CD8^+$ -NK-клеток при онкологических заболеваниях может увеличиваться до 20–30 %, приоритетным в онкоиммунологии становится $CD4^+/CD8^+$ индекс [14].

Продолжая тему гетерогенности $CD8^+$ -клеток, следует внести ясность и в вопрос выделения в их структуре субпопуляции регуляторных лимфоцитов. Существует подход, основанный на оценке экспрессии костимуляторной молекулы CD28 на их поверхности. Клетки с фенотипом $CD8^+CD28^+$ являются наивными, наличие этого белка позволяет $CD8^+$ -лимфоцитам взаимодействовать с антиген-презентирующими клетками и приобретать свою

антигенспецифичную активацию. Все $CD8^+CD28^-$ -лимфоциты принято считать регуляторными, и для упрощения даже введен индекс $CD8^+CD28^+/CD8^+CD28^-$ для оценки степени иммуносупрессии [15, 16]. На наш взгляд, это некорректно, так как в этой формуле не учитываются цитотоксические Т-лимфоциты, а все клетки, не являющиеся наивными, т. е. прошедшие антигенспецифическую активацию, приравниваются к регуляторным. Тем не менее этот индекс может быть критерием, отражающим соотношение пула наивных и активированных клеток. Его снижение, имеющее неблагоприятный прогноз при онкологических заболеваниях, отражает не степень иммуносупрессии, а иммунологическую истощенность, уменьшение резерва. В свою очередь, для разделения активированных $CD8^+CD28^-$ -клеток на цитотоксические и регуляторные лимфоциты мы предлагаем использовать CD11b-антиген (молекула адгезии, необходимая для функционирования эффекторных клеток) [17]. Соответственно, $CD28^-CD11b^+$ -фенотип характерен для цитотоксических лимфоцитов, а $CD28^-CD11b^-$ -фенотип характеризует активированные лимфоциты, не ставшие киллерами, т. е. регуляторные клетки. Помимо наивных $CD28^+CD11b^-$ -лимфоцитов, в структуре $CD28^+$ -клеток можно выделить переходную субпопуляцию ранней активации, когда на поверхности клеток появляется CD11b-антиген и еще сохраняется молекула CD28. Таким же фенотипом обладают клетки памяти, когда, в обратном порядке, на фоне экспрессии CD11b молекулы адгезии появляется CD28-антиген, необходимый для взаимодействия с иммунокомпетентными клетками. Таким образом, анализ одновременной экспрессии CD28- и CD11b-антигенов на поверхности $CD8^+$ -лимфоцитов позволяет оценить эффекторные клетки, резерв наивных лимфоцитов, степень активации эффекторных механизмов и непосредственно регуляторные клетки.

CD28-антиген конститутивно представлен на всех $CD4^+$ -лимфоцитах и обеспечивает их функционирование. Его потеря переводит Т-хелперы в разряд клеток с противоречивой физиологической ролью. С одной стороны, их описывают как провоспалительные клетки с цитотоксической активностью, содержащие цитолитические гранулы перфорин и гранзим, а с другой — называют регуляторными, способными инактивировать клетки эффекторного звена иммунитета. Отличительной чертой $CD4^+CD28^-$ -лимфоцитов является аутоагрессивность, будь то эндотелий сосудов при системной красной волчанке, или вирусинфицированные клетки, или опухолевые клетки, или же антигенспецифические эффекторные лимфоциты [18, 19]. Цитотоксические $CD4^+$ -клетки, содержащие гранзим, входят в структуру $CD4^+CD28^-$, но не все $CD4^+$ -клетки, лишенные костимуляторной

молекулы CD28, являются цитотоксическими и содержат гранзим. В рамках нашей работы эти субпопуляции рассматривались по-отдельности, однако была выявлена высокая зависимость показателей друг от друга. Правильнее было бы анализировать CD4, CD28 и Granzyme в сочетании, так как эти субпопуляции не являются равными.

Регуляторные лимфоциты и эффекторныe клетки по своему действию противоположны и при патологических процессах, таких как онкологические или аутоиммунные заболевания, преобладание одних популяций сопровождается дефицитом других [20]. В нашем исследовании конкурентности обратной зависимости между регуляторными и эффекторными лимфоцитами не было выявлено. Даже наоборот, отмечалась прямая слабая связь $CD4^+CD25^+CD127^-$ -лимфоцитов с эффекторными клетками.

Основными критериями оценки функциональной активности эффекторных лимфоцитов стали: внутриклеточная экспрессия перфорина (порообразующего белка цитолитических гранул) в $CD8^+$ - и $CD16^+$ -клетках и показатель цитотоксического потенциала, вычисленный как доля перфорин-содержащих лимфоцитов в структуре $CD8^+$ - и $CD16^+$ -клеток. При онкологических заболеваниях часто встречается нормальное количество клеток эффекторов с выраженной функциональной анергией (уменьшением доли перфорин-позитивных клеток), что является неблагоприятным фактором [21, 22].

Следует обратить внимание на Т-регуляторные лимфоциты, в нашем исследовании это $CD8^+$ - или $CD4^+$ -клетки. Для их определения используется каскадное гейтирование с последующим анализом фенотипа, так значение количества $CD25^+CD127^-$ -клеток приводится из расчета на субпопуляцию $CD4^+$ -лимфоцитов, а не на весь пул $CD45^+$ -клеток периферической крови. Либо проводится выделение $CD8^+$ -лимфоцитов и в их структуре оценивается количество $CD28^-CD11b^-$ регуляторных клеток (или $CD28^+CD11b^-$, или $CD28^-CD11b^+$, или $CD28^+CD11b^+$). Однако для показателей $CD4^+CD28^-$ и $CD4^+Gr^+$ -клеток необходим дополнительный пересчет, как для оценки цитотоксического потенциала, т.е. определение доли гранзим-позитивных или $CD28^-$ -негативных клеток в структуре $CD4^+$ -лимфоцитов.

Перед нами не стояло задачи оценить зависимость иммунных показателей от возраста, поэтому изучаемая выборка доноров имеет асимметрию и представлена в основном людьми молодого и среднего возраста. Группа практически здоровых лиц пожилого возраста составляла менее 10 %. Это не по-

мешало провести исследование зависимости иммунных показателей от возраста, но отразилось на силе выявленных взаимосвязей (слабые или умеренные). Выявленные нами закономерности касались только функциональных характеристик и никак не отражались на линейных популяциях (Т-, В-, NK-клеток), что может быть следствием возрастной асимметрии исследуемой выборки. Статистически значимыми изменениями были: уменьшение с возрастом количества наивных $CD8^+$ -клеток и индекса $CD8^+CD28^+/CD8^+CD28^-$ и, наоборот, увеличение количества активированных клеток, регуляторных лимфоцитов, эффекторных клеток и их цитотоксической активности, что согласуется с данными других авторов [23].

Несмотря на уравновешенное деление исследуемой выборки по полу (в том числе в возрастных подгруппах), значимых различий между мужчинами и женщинами не выявлено.

Заключение

На основе разработанной в лаборатории клинической иммунологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России панели маркеров иммунокомпетентных клеток системного иммунитета были определены референсные значения и границы нормы субпопуляций для оценки состояния клеточного иммунитета. Использование этой панели позволит в пределах 3–4-цветного окрашивания дать комплексную характеристику субпопуляционной структуры лимфоцитов периферической крови, включая характеристики и оценку:

- линейной принадлежности клеток с детализацией неоднородности популяции $CD8^+$ -лимфоцитов;
- маркеров активации и пула наивных клеток;
- различных типов регуляторных клеток;
- функциональной неоднородности $CD8^+$ -лимфоцитов;
- функциональной активности клеток эффекторного звена иммунитета.

Был проведен сравнительный анализ иммунорегуляторных индексов и доказана уязвимость формулы $CD3^+CD4^+/CD3^+CD8^+$ перед $CD4^+/CD8^+$ индексом.

Спектр предложенных показателей является продуктом многолетних исследований, проводимых в лаборатории клинической иммунологии НИИ КО им. Н.Н. Трапезникова ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России с целью поиска значимых критериев для оценки состояния иммунной системы при онкологических заболеваниях.

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

1. Топтыгина А.П., Семикина Е.Л., Петричук С.В. и др. Изменение уровня субпопуляций Т-регуляторных клеток и Т-хелперов 17 в периферической крови здоровых людей в зависимости от возраста. Медицинская иммунология 2017;19(4):409–20. DOI: 10.15789/1563-0625-2017-4-409-420. [Toptygina A.P., Semikina E.L., Petrichuk S.V. et al. Age-dependent changes of T-regulatory and Th17 subset levels in peripheral blood from healthy humans. Meditsinskaya Immunologiya = Medical Immunology 2017;19(4):409–20. (In Russ.)].
2. Кудрявцев И.В., Борисов А.Г., Васильева Е.В. и др. Фенотипическая характеристика цитотоксических Т-лимфоцитов: регуляторные и эффекторные молекулы. Медицинская иммунология 2018;20(2):227–40. DOI: 10.15789/1563-0625-2018-2-227-240. [Kudryavtsev I.V., Borisov A.G., Vasilyeva E.V. et al. Phenotypic characterisation of peripheral blood cytotoxic T lymphocytes: regulatory and effectormolecules. Meditsinskaya Immunologiya = Medical Immunology 2018;20(2):227–40. (In Russ.)].
3. Селимова Л.М., Серебровская Л.В., Калнина Л.Б. и др. Показатели иммунного статуса периферической крови доноров. Клиническая лабораторная диагностика 2014;6:40–3. [Selimova L.M., Serebrovskaya L.V., Kalnina L.B. et al. The indicators of immune status of peripheral blood of donors. Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Russian clinical laboratory diagnostics 2014;6:40–3. (In Russ.)].
4. Савлевич Е.Л., Хайдуков С.В., Курбачева О.М. и др. Показатели клеточного иммунитета пациентов с хроническим полипозным риносинуситом. Медицинская иммунология 2017;19(6):731–8. DOI: 10.15789/1563-0625-2017-6-731-738. [Savlevich E.L., Khaidukov S.V., Kurbacheva O.M. et al. Characteristics of cellular immune status in the patients with chronic rhinosinusitis with nasal polyps. Meditsinskaya Immunologiya = Medical Immunology 2017;19(6):731–8. (In Russ.)].
5. Ветлугина Т.П., Лобачева О.А., Альперина Е.Л. и др. Клинико-экспериментальные исследования иммуномодулирующего эффекта амисульприда. Вестник РАМН 2012;12:13–7. [Vetlugina T.P., Lobacheva O.A., Alperina E.L. et al. Clinical and experimental research of immunomodulatory effect of amisulpride. Vestnik RAMN = Annals of the RAMS 2012;12:13–7. (In Russ.)].
6. Yi J.S., Rosa-Bray M., Staats J. et al. Establishment of normative ranges of the healthy human immune system with comprehensive polychromatic flow cytometry profiling. PLoS ONE 2019;14(12):1–18. DOI.org/10.1371/journal.pone.0225512.
7. Kokuina E., Breff-Fonseca M.C., Villegas-Valverde C.A., Mora-Díaz I. Normal Values of T, B and NK Lymphocyte Subpopulations in Peripheral Blood of Healthy Cuban Adults. MEDICC Review 2019; 21(2–3):16–21. PMID: 31373580.
8. Пашина Н.А., Романова Ю.В., Половодова Н.С. Иммунный статус коренного и пришлого населения ямало-ненецкого автономного округа. Экология человека 2007;8:19–23. [Pashina N.A., Romanova Yu.V., Polovodova N.S. Immune status of native and alien population in yamal-nenets autonomous area. Ekologiya cheloveka = Human ecology 2007;8:19–23. (In Russ.)].
9. Евсеева И.В. Показатели иммунного статуса в двух коренных этнических группах севера. Экология человека 2010;10:37–41. [Evseeva I.V. Indicator of two radical ethnic group immune status in the far north. Ekologiya cheloveka = Human ecology 2010;10:37–41. (In Russ.)].
10. Собуров К.А. Особенности иммунной реактивности у постоянных жителей горных регионов. Ульяновский медико-биологический журнал 2011;4:69–76e. [Soburov K.A. Peculiarities of immune reactivity of permanent residents of mountain regions. Ulyanovskiy mediko-biologicheskii zhurnal = Ulyanovsk medical and biological journal 2011;4:69–76e. (In Russ.)].
11. Zhang K., Wang F., Zhang M. et al. Reference Ranges of Lymphocyte Subsets Balanced for Age and Gender from a Population of Healthy Adults in Chongqing District of China. Cytometry Part B (Clinical Cytometry) 2016;90B:538–42. DOI: 10.1002/cyto.b.21323.
12. Маннанова И.В., Хохлова О.Н., Понезева Ж.Б. Клинико-иммунологические особенности хронического гепатита С в зависимости от степени фиброза печени. Практическая медицина 2018;16(9):180–2. DOI: 10.32000/2072-1757-2018-9-180-182. [Mannanova I.V., Khokhlova O.N., Ponezhova Zh.B. Clinical-immunological features of chronic hepatitis type C depending on the degree of liver fibrosis. Prakticheskaya Meditsina = Practical Medicine 2018;16(9):180–2. DOI: 10.32000/2072-1757-2018-9-180-182. (In Russ.)].
13. Саакян С.В., Балацкая Н.В., Катаргина Л.А. и др. Субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови при увеальной меланоме. Медицинская иммунология 2019;21(4):765–72. DOI: 10.15789/1563-0625-2019-4-765-772. [Saakyan S.V., Balatskaya N.V., Katargina L.A. et al. Subpopulation profile of peripheral blood lymphocytes in uveal melanoma. Meditsinskaya Immunologiya = Medical Immunology 2019;21(4):765–72. (In Russ.)].
14. Заботина Т.Н., Черткова А.И., Короткова О.В. и др. Связь основных показателей иммунитета с возрастом и экспрессией гормональных рецепторов у больных первично операбельным раком молочной железы. Онкогинекология 2018;4(28):21–30. [Zabotina T.N., Chertkova A.I., Korotkova O.V. et al. The relationship between immune parameters and age and expression of hormone receptors in patients with primary operable breast cancer. Onkoginekologiya = Gynecologic Oncology 2018;4(28):21–30. (In Russ.)].
15. Dai S.X., Zhang Q.F., Zheng Z.W. et al. Decreased CD8⁺CD28⁺/CD8⁺CD28[−] T cell ratio can sensitively predict poor outcome for patients with complicated Crohn disease. Medicine (Baltimore) 2017;96(26):e7247. DOI: 10.1097/md.00000000000007247.
16. Song Q., Ren J., Zhou X. et al. Circulating CD8⁺CD28[−] suppressor T cells tied to poorer prognosis among metastatic breast cancer patients receiving adoptive T-cell therapy: A cohort study. Clinical Immunotherapy 2018;20(1):126–33. PMID: 28988693. DOI: 10.1016/j.jcmt.2017.08.018.
17. Fiorentini S., Licenziati S., Alessandri G. et al. CD11b Expression Identifies CD8⁺CD28⁺ T Lymphocytes with Phenotype and Function of Both Naive/Memory and Effector Cells. The Journal of Immunology 2001;166(2):900–7. DOI: https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.2.900.
18. Duftner C., Dejaco C., Hengster P. et al. Apoptotic Effects of Antilymphocyte Globulins on Human Pro-inflammatory CD4⁺CD28[−] T-cells. PLoS ONE 2012;7(3):1–10. DOI: 10.1371/journal.pone.0033939.

19. Yadav A.K. and Jha V. CD4⁺CD28null cells are expanded and exhibit a cytolytic profile in end-stage renal disease patients on peritoneal dialysis. *Nephrol Dial Transplant* 2011;26:1689–94. DOI: 10.1093/ndt/gfr010.
20. Emoto T., Sasaki Na., Yamashita T. et al. Regulatory/Effector T-Cell Ratio Is Reduced in Coronary Artery Disease. *Circ J* 2014;78:2935–41. DOI: 10.1253/circj.CJ-14-0644.
21. Табаков Д.В., Заботина Т.Н., Захарова Е.Н. и др. Субпопуляционный баланс эффекторных клеток периферической крови онкологических больных. *Иммунология* 2019;40(3): 20–7. DOI: 10.24411/0206-4952-2019-13003. [Tabakov D.V., Zabolina T.N., Zakharova E.N. et al. The subpopulation balance of effector cells in the peripheral blood of cancer patients. *Immunologiya = Immunology* 2019;40(3):20–7. (In Russ.)].
22. Чертова А.И., Славина Е.Г., Шоуа Э.К. и др. Основные параметры клеточного иммунитета у больных раком молочной железы с тройным негативным фенотипом. Связь с эффективностью химиотерапии. *Медицинская иммунология* 2018;20(5): 667–80. DOI: 10.15789/1563-0625-2018-5-667-680. [Chertkova A.I., Slavina E.G., Shoua E.K. et al. The main parameters of cellular immunity in patients with triple-negative breast cancer. Relationship with efficiency of chemotherapy. *Meditsinskaya Immunologiya = Medical Immunology* 2018;20(5):667–80. (In Russ.)].
23. Qin L., Jing X., Qiu Z. et al. Aging of immune system: Immune signature from peripheral blood lymphocyte subsets in 1068 healthy adults. *AGING* 2016;8(5):848–59. DOI: 10.18632/aging.100894.

ORCID авторов/ ORCID of authors

A.A. Борунова / A.A. Borunova: <https://orcid.org/0000-0002-1854-3455>
 Т.Н. Заботина / T.N. Zabolina: <https://orcid.org/0000-0001-7631-5699>
 Э.К. Шоуа / E.K. Shoua: <https://orcid.org/0000-0003-3937-474X>
 Г.З. Чкадуа / G.Z. Chkadua: <https://orcid.org/0000-0002-1416-0545>
 А.И. Чертова / A.I. Chertkova: <https://orcid.org/0000-0001-9146-5986>
 Д.В. Табаков / D.V. Tabakov: <https://orcid.org/0000-0002-1509-2206>
 Е.Н. Захарова / E.N. Zakharova: <https://orcid.org/0000-0003-2790-6673>
 Е.В. Огородникова / E.V. Ogorodnikova: <https://orcid.org/0000-0003-0644-4537>
 З.Г. Кадагидзе / Z.G. Kadagidze: <https://orcid.org/0000-0002-0058-0987>

Вклад авторов

A.A. Борунова: разработка плана исследования, обзор публикаций по теме статьи, анализ и интерпретация данных, написание текста рукописи;
 Т.Н. Заботина: разработка плана исследования, обсуждение и научное редактирование рукописи;
 Э.К. Шоуа, Д.В. Табаков, Е.Н. Захарова: получение данных для анализа;
 Г.З. Чкадуа, А.И. Чертова: обзор публикаций по теме статьи;
 Е.В. Огородникова: предоставление материала для исследования;
 З.Г. Кадагидзе: обзор публикаций по теме статьи, обсуждение и научное редактирование рукописи.

Author's contributions

A.A. Borunova: developing the research design, reviewing of publications of the article's theme, data analysis and interpretation, article writing;
 T.N. Zabolina: developing the research design, manuscript discussing and assembling;
 E.K. Shoua, D.V. Tabakov, E.N. Zakharova: data collection and processing;
 G.Z. Chkadua, A.I. Chertkova: reviewing of publications of the article's theme;
 E.V. Ogorodnikova: provision of study materials;
 Z.G. Kadagidze: reviewing of publications of the article's theme, manuscript discussing and assembling.

Конфликт интересов. Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Исследование проведено при финансовой поддержке Минздрава России в рамках темы НИР № ААА-А-А19-119022090028-6.

Financing. The study was performed with the financial support of the Ministry of Health of Russia in the framework of research № ААА-А-А19-119022090028-6.

Статья поступила: 14.10.2020. Принята к публикации: 22.10.2020.

Article submitted: 14.10.2020. Accepted for publication: 22.10.2020.