DOI: 10.32364/2587-6821-2020-4-1-4-9

Сравнение экспрессии изоформ молекулы FOXP3 регуляторными Т-клетками периферической крови при аллергических и лимфопролиферативных заболеваниях

А.Д. Донецкова^{1,2}, М.М. Литвина¹, Д.С. Смирнов¹, О.М. Курбачева¹, Т.А. Митина³,
К.А. Белоусов³, А.Н. Митин¹

¹ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Москва, Россия

²ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, Москва, Россия

³ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского, Москва, Россия

РЕЗЮМЕ

Цель исследования: оценить уровень экспрессии изоформ молекулы FOXP3, отличающихся по наличию экзона 2, регуляторными Т-клетками (Трег) периферической крови при аллергических и лимфопролиферативных заболеваниях.

Материал и методы: в исследование вошли 76 человек: 19 — в возрасте от 18 до 64 лет с аллергическим ринитом (АР), 21 — от 49 до 76 лет с впервые диагностированной множественной миеломой (ММ) и 36 здоровых доноров от 25 до 77 лет (контрольная группа). Выделение мононуклеаров периферической крови (МНПК) проводили путем центрифугирования в градиенте плотности фикола-верографина. Полученные МНПК инкубировали с моноклональными антителами (МАТ) к поверхностным маркерам, пермеабилizировали и повторно инкубировали с МАТ против FOXP3, анализировали не менее 10^5 клеток в гейте лимфоцитов на лазерном проточном цитометре BD FACSCanto™ II (Becton Dickinson). Использовали комбинации МАТ: CD3-PE-Cy7 + CD25-PerCP-eFluor710 + CD4-FITC + FOXP3(PCH101)-APC (1-я проба) и CD3-PE-Cy7 + CD4-FITC + FOXP3 (150D/E4)-PE + FOXP3(PCH101)-APC (2-я проба). Статистическую обработку результатов проводили методами непараметрического анализа.

Результаты исследования: у больных АР было выявлено снижение общего числа Трег, в основном за счет уменьшения численности Трег, экспрессирующих молекулу FOXP3, лишённую экзона 2 (FOXP3Δ2): $11,7 \times 10^6$ клеток/л против $16,7 \times 10^6$ клеток/л у здоровых лиц ($p=0,004$), что мы расценили как возможное снижение функциональной активности Трег. У пациентов с ММ, напротив, отмечалось увеличение процента и абсолютного количества CD4⁺25⁺-Т-клеток, экспрессирующих FOXP3, причем основной вклад в увеличение этого процента вносили те же экспрессирующие FOXP3Δ2 клетки: их содержание составило $33,7 \times 10^6$ клеток/л против $16,7 \times 10^6$ клеток/л в группе контроля ($p=0,04$).

Заключение: в проведенном исследовании было показано, что экспрессия изоформ молекулы FOXP3 CD4⁺ Т-лимфоцитами играет важную роль в патогенезе аллергических (АР) и лимфопролиферативных (ММ) заболеваний.

Ключевые слова: изоформы FOXP3, регуляторные Т-клетки человека, аллергический ринит, множественная миелома, проточная цитометрия.

Для цитирования: Донецкова А.Д., Литвина М.М., Смирнов Д.С. и др. Сравнение экспрессии изоформ молекулы FOXP регуляторными Т-клетками периферической крови при аллергических и лимфопролиферативных заболеваниях. РМЖ. Медицинское обозрение. 2020;4(1):4–9. DOI: 10.32364/2587-6821-2020-4-1-4-9.

Expression of FOXP3 isoforms by peripheral blood regulatory T cells in allergic and lymphoproliferative disorders

A.D. Donetskova^{1,2}, M.M. Litvina¹, D.S. Smirnov¹, O.M. Kurbacheva¹, T.A. Mitina³, K.A. Belousov³,
A.N. Mitin¹

¹NRC Institute of Immunology, Moscow, Russian Federation

²Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation

³M.F. Vladimirovskiy Moscow Regional Research and Clinical Institute, Moscow, Russian Federation

ABSTRACT

Aim: to evaluate the expression of FOXP3 isoforms differing in the presence/lack of exon 2 expressed by peripheral blood regulatory T cells (Treg) in allergic and lymphoproliferative disorders.

Patients and Methods: 76 patients were enrolled, i.e., 19 patients aged 18–64 years with allergic rhinitis (AR), 21 patients aged 49–76 years with multiple myeloma (MM) diagnosed for the first time, and 36 healthy controls aged 25–77 years. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated by Ficoll-verographine density gradient centrifugation. Then, PBMCs were incubated with monoclonal antibodies (mAbs) against surface markers, permeabilized, and again incubated with mAbs against FOXP3. At least 10^5 cells within lymphocyte gate were analyzed using laser flow cytometer BD FACSCanto™ II (Becton Dickinson). mAbs against CD3-PE-Cy7 + CD25-PerCP-eFluor710 + CD4-FITC + FOXP3(PCH101)-APC (sample 1) and CD3-PE-Cy7 + CD4-FITC + FOXP3(150D/E4)-PE + FOXP3(PCH101)-APC (sample 2) were used. Statistical analysis was performed using nonparametric methods.

Results: in AR patients, reduced Treg count (as a result of reduced count of Treg which express FOXP3 lacking exon 2/FOXP3 Δ 2, i.e., 11.7×10^6 cells/l as compared with 16.7×10^6 cells/l in healthy individuals, $p=0.004$) was revealed. This can be interpreted as reduced functional activity of Treg. In contrast, increased percentage and count of CD4 $^{+}$ 25 $^{+}$ T cells expressing FOXP3 (as a result of increased count of T cells expressing FOXP3 Δ 2, i.e., 33.7×10^6 cells/l as compared with 16.7×10^6 cells in healthy individuals, $p=0.04$) was revealed in MM patients.

Conclusions: our findings demonstrate that expression of FOXP3 isoforms by CD4 $^{+}$ T cells has an important pathogenic role both in allergic and lymphoproliferative disorders.

Keywords: FOXP3 isoforms, human regulatory T cells, allergic rhinitis, multiple myeloma, flow cytometry.

For citation: Donetskova A.D., Litvina M.M., Smirnov D.S. et al. Expression of FOXP isoforms by peripheral blood regulatory T cells in allergic and lymphoproliferative disorders. Russian Medical Review. 2020;4(1):4–9. DOI: 10.32364/2587-6821-2020-4-1-4-9.

ВВЕДЕНИЕ

Основным транскрипционным фактором, определяющим дифференцировку и функционирование регуляторных Т-клеток (Трег), является FOXP3 [1]. Мутации гена FOXP3 у человека, вызывающие дефицит Трег, приводят к развитию IPEX-синдрома — летального Х-сцепленного синдрома иммунной дисрегуляции, полиэндокринопатии, энтеропатии с вовлечением различных органов и тканей, развитием тяжелого иммунодефицита, кахексии, экземы, лимфопролиферации [2].

При изучении молекулярной структуры фактора FOXP3 установлено, что у мышей он представлен в единственной форме, а у человека на данный момент описаны несколько изоформ молекулы FOXP3; причем одна из молекул является полной (без делеции экзонов), а три другие образуются при альтернативном сплайсинге с удалением определенных экзонов (рис. 1) [3–5]:

- 1) полномасштабная молекула — FOXP3-FL (FL — full length);
- 2) молекула с одновременным отсутствием доменов, кодируемых экзонами 2 и 7, — FOXP3 Δ 2 Δ 7;
- 3) с отсутствием домена, кодируемого экзон 2, — FOXP3 Δ 2;

- 4) с отсутствием домена, кодируемого экзон 7, — FOXP3 Δ 7.

В проведенных исследованиях показано, что экзон 2 кодирует область молекулы FOXP3, которая отвечает за связывание транскрипционных факторов семейства ROR (α и γ). Одна из функций факторов ROR α и ROR γ — индукция дифференцировки провоспалительных Т-хелперов Th17-клеток, с которыми Трег связаны похожими условиями развития, дифференцировки, а также возможностью взаимных превращений [6, 7]. Экзон 7, в свою очередь, кодирует последовательность нуклеотидов, которые ответственны за димеризацию молекулы FOXP3; отсутствие димеризации приводит к нарушению супрессорной функции Трег [5]. В отличие от полной молекулы FOXP3-FL, формы молекул FOXP3 с отсутствием продуктов экзонов 2 и/или 7 располагаются преимущественно в ядре клетки, поскольку они утрачивают одну из двух последовательностей в областях, соответственно кодируемых экзонами 1/2 и 6/7 (nuclear export sequences — NESs), что приводит к нарушению экспорта из ядра [8]. Для полноценного функционирования FOXP3 в качестве транскрипционного активатора и реализации его супрессорной функции считается очень важным его нахождение в ядре Трег [9].

Рис. 1. Схема структуры молекулы FOXP3 человека

Fig. 1. Schematic representation of human FOXP3 molecule

В настоящее время предполагается, что у человека именно молекула FOXP3Δ2, которая располагается главным образом в ядре и обладает супрессорной функцией, является главной изоформой, определяющей функционирование Трег [9].

Поскольку Трег играют важную роль в ограничении воспаления и иммунного ответа, а их функциональная активность связана с изоформами экспрессируемых молекул FOXP3, а также учитывая противоречивые данные относительно содержания Трег и уровня экспрессии FOXP3, полученные в предыдущих исследованиях, нами была поставлена **цель** оценить, помимо доли и численности Трег в периферической крови, уровень экспрессии изоформ молекулы FOXP3, отличающихся по наличию экзона 2, с помощью проточной цитометрии при двух формах иммунопатологии: аллергии и лимфопролиферативных процессах. Так как аллергический ринит (АР) является одним из наиболее изученных классических аллергических заболеваний, а множественная миелома (ММ) — ярким примером злокачественного В-клеточного лимфопролиферативного заболевания, нами было проведено сравнение Трег и особенностей экспрессии транскрипционного фактора FOXP3 и его изоформ, лишенных продуктов экзона 2, при этих двух формах патологии.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В данное исследование были включены 76 человек, из них 19 — в возрасте от 18 до 64 лет (медиана возраста — 33 года) с АР, 21 — от 49 до 76 лет (медиана — 60 лет) с впервые диагностированной ММ и 36 здоровых доноров от 25 до 77 лет (медиана — 50 лет) в качестве контрольной группы. Статистически значимые различия по возрасту между группами пациентов и здоровыми лицами отсутствовали ($p > 0,05$). Все участники перед началом исследования дали информированное согласие.

У пациентов с АР отмечалась пыльцевая сенсibilизация в течение как минимум двух последних лет, подтвержденная анамнезом и положительными прик-тестами; исследование осуществлялось вне сезона пыления. Среди больных ММ в исследование были отобраны первичные пациенты с III стадией по критериям оценки противоопухолевого ответа Durei [10]. Забор крови у всех пациентов проводили до начала лечения.

Исследование Трег проводили в периферической крови, забор которой осуществляли в пробирки с антикоагулянтом (K_2 EDTA). Количество клеток крови подсчитывали с помощью гемоанализатора по общепринятой методике. Все процедуры выполняли в течение 6 ч после получения крови.

Выделение мононуклеаров периферической крови (МНПК) проводили путем центрифугирования в одноступенчатом градиенте плотности фиколла-верографина (плотность 1,077 г/см³). Полученные МНПК суспензировали в натрий-фосфатном буфере (PBS) с добавлением 1% бычьего сывороточного альбумина (BSA) и 0,01% азида натрия, далее в том же буфере проводили инкубацию при 4 °C 30 мин с моноклональными антителами (МАТ) к поверхностным маркерам, затем клетки отмывали от несвязавшихся антител и пермеабилizировали буфером «Foxp3 Fixation/Permeabilization Buffer» (eBioscience, США) в течение 40 мин согласно инструкции фирмы-производителя. После пермеабилизации проводили отмывку клеток

и инкубировали их в темноте при 4 °C 30 мин с МАТ против FOXP3. После инкубации клетки отмывали от несвязавшихся антител против FOXP3 и сразу проводили анализ на лазерном проточном цитометре BD FACSCanto™ II (Becton Dickinson, США) в стандартном режиме (без фиксации). Поскольку Трег представляют собой минорную фракцию клеток, для уменьшения ошибки проводили анализ более 10⁵ клеток в гейте лимфоцитов. Анализ полученных данных проводили посредством программного обеспечения FlowJo.

В работе использовали МАТ фирмы eBioscience, меченные следующими флуорохромами: PE (фикоэритрин), FITC (флуоресцеин изотиоцианат), PerCP-eFluor710 (перидин-хлорофилл-протеин-eFluor710), APC (аллофикоцианин) и PE-Cy7 (фикоэритрин-цианин 7), для изотипических контролей применяли препараты той же фирмы. Использовали комбинации МАТ: CD3-PE-Cy7 + CD25-PerCP-eFluor710 + CD4-FITC + FOXP3(PCN101)-APC (1-я проба) и CD3-PE-Cy7 + CD4-FITC + FOXP3(150D/E4)-PE + FOXP3(PCN101)-APC (2-я проба).

Антитела клона PCN101 распознают все изоформы молекулы (эпитоп молекулы FOXP3, кодируемый экзоном 1), а антитела клона 150D/E4 — только молекулы FOXP3-FL и FOXP3Δ2 (эпитоп, кодируемый экзоном 2). Следовательно, одновременное связывание с клеткой обоих МАТ свидетельствует об экспрессии в клетке полномасштабной молекулы FOXP3, а связывание МАТ только клона PCN101 — о наличии в клетке исключительно изоформ с отсутствием продукта экзона 2.

Ранее нами был предложен алгоритм гейтирования для оценки содержания Трег, экспрессирующих различные варианты молекулы FOXP3 (рис. 2 а, е–g), который мы использовали и в настоящем исследовании [11]. При выставлении гейтов для FOXP3⁺-клеток в качестве отрицательного контроля мы брали CD3⁺-Т-клетки, которые не экспрессируют молекулу FOXP3 (рис. 2 а–d).

Статистическую обработку результатов работы проводили методами непараметрического анализа. Исследованные количественные показатели представляли как Me (LQ-UQ), где Me — медиана, LQ — нижний квартиль, UQ — верхний квартиль. Для сопоставления двух групп по количественным признакам использован U-критерий Манна — Уитни. Различия между группами полагали статистически значимым при $p < 0,05$. Обработку осуществляли в программном пакете StatSoft Statistica 12.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Проведено исследование периферической крови больных АР, ММ и здоровых лиц (контрольная группа). Исследование образцов крови начали с подсчета числа клеток. У всех пациентов с АР и ММ не было выявлено статистически значимых отличий по количеству белых клеток крови, лимфоцитов и Т-хелперов в сравнении с показателями группы контроля (табл. 1).

При цитометрическом исследовании доли Трег (CD25⁺FOXP3⁺-клеток) среди Т-хелперов в периферической крови пациентов с АР было выявлено их статистически значимое снижение в 1,6 раза относительно уровня у здоровых лиц: 2,4% против 3,9% соответственно ($p = 0,0006$). При определении Трег по экспрессии FOXP3 и CD25 среди Т-хелперов у пациентов с первичной ММ было обнару-

Рис. 2. Алгоритм цитометрической оценки Трег периферической крови здорового донора [11]: *a* – гейт лимфоцитов среди МНПК; *b–d* – FOXP3⁺ гейты, выставленные по CD3⁺-Т-клеткам, которые не экспрессируют молекулу FOXP3: *b* – гейт CD3⁺-Т-клеток среди лимфоцитов, *c* – FOXP3(PCH101)⁺ гейт по CD3⁺-Т-клеткам, *d* – FOXP3(150D/E4)⁺ гейт по CD3⁺-Т-клеткам; *e–g* – Трег, экспрессирующие различные варианты молекулы FOXP3: *e* – CD3⁺CD4⁺-Т-клетки среди лимфоцитов, *f* – CD25⁺FOXP3(PCH101)⁺ – все Трег среди CD4⁺-Т-клеток, *g* – FOXP3(150D/E4)⁺ – FOXP3-FL Трег среди всех Трег. Сплошные стрелки показывают очередность гейтирования, прерывистые стрелки — соответствие выставленных гейтов для CD3⁺-Т-клеток и CD3⁺CD4⁺-Т-клеток

Fig. 2. The algorithm of regulatory T cells gating by flow cytometry in PBMCs (peripheral blood mononuclear cells) of healthy donor [11]: *a* – lymphocytes among peripheral blood MNPCs; *b–d* – establishing FOXP3⁺ gate using CD3⁺ cells known not to express FOXP3: *b* – CD3⁺ cells among lymphocytes, *c* – establishing FOXP3(PCH101)⁺ gate using CD3⁺ cells, *d* – establishing FOXP3(150D/E4)⁺ gate using CD3⁺ cells; *e–g* – detection of Treg: *e* – CD3⁺CD4⁺-T cells among lymphocytes; *f* – CD25⁺FOXP3(PCH101)⁺ – Treg among CD4⁺ T cells, *g* – CD25⁺FOXP3(150D/E4)⁺ – FOXP3-FL Treg among Treg.

The solid arrows show the gating algorithm. The dashed bidirectional arrows show the alignment of the established gates for CD3⁺ and CD3⁺CD4⁺ cells

Таблица 1. Абсолютное содержание клеточных популяций ($\times 10^9$ клеток/л) и доля Трег среди Т-хелперов (%) периферической крови пациентов с АР, ММ и здоровых лиц

Table 1. The count of cell populations ($\times 10^9$ cells/l) and Treg percentage in peripheral blood T helper pool (%) in AR and MM patients and healthy controls

Группа Patients	Лейкоциты Leukocytes	Лимфоциты Lymphocytes	CD4 ⁺ -Т-клетки CD4 ⁺ -T cells	Доля Трег среди CD4 ⁺ -Т-клеток Treg percentage in CD4 ⁺ -T cells
АР / AR	6,3 (5,4–7,3)	2,1 (1,7–2,5)	0,9 (0,6–1,1)	2,4 (1,8–3,1)*
ММ / MM	6,7 (5,1–8,0)	2,0 (1,4–2,7)	0,7 (0,5–1,1)	6,5 (5,2–9,6)*
Контрольная / Controls	5,8 (5,4–7,5)	1,9 (1,5–2,5)	0,8 (0,6–1,0)	3,9 (3,1–4,3)

* $p < 0,001$ при сравнении с показателями контрольной группы.

* $p < 0,01$ as compared with controls.

жено их достоверное увеличение в 1,7 раза по сравнению с группой контроля: 6,5% против 3,9% у здоровых доноров ($p = 0,000001$) (см. табл. 1).

На следующем этапе нами была оценена экспрессия изоформ FOXP3 (FOXP3-FL и FOXP3Δ2) CD4⁺-Т-лимфоцитами. Как оказалось, снижение относительного количества Трег при АР было обусловлено уменьшением численности Трег, которые экспрессируют только изоформу FOXP3 с делецией продукта экзона 2 (FOXP3Δ2 Трег). Этот показатель был в 1,4 раза ниже, чем в контрольной группе ($p = 0,004$). В то же время абсолютное содержание Трег, экспрессирующих полномасштабную молекулу FOXP3 (FOXP3-FL), при АР было статистически значимо выше, чем у здоровых лиц ($p = 0,002$) (табл. 2). Следовательно, для АР характерно уменьшение содержания Трег в периферической крови за счет FOXP3Δ2 Трег.

У пациентов с первичной ММ наблюдалась обратная картина: статистически достоверное увеличение

Таблица 2. Абсолютное содержание Трег ($\times 10^6$ клеток/л) и изоформ FOXP3 в крови пациентов с АР, ММ и здоровых лиц

Table 2. Treg count ($\times 10^6$ cells/l) and FOXP3 isoforms in the blood of AR and MM patients and healthy controls

Группа Patients	Трег Treg	FOXP3-FL Трег FOXP3-FL Treg	FOXP3Δ2 Трег FOXP3Δ2 Treg
АР / AR	20,8 (15,4–31,2)	8,6 (6,5–11,8)*	11,7 (9,5–17,6)*
ММ / MM	50,9 (34,7–85,0)*	13,5 (8,9–27,6)**	33,7 (18,2–40,8)*
Контрольная Controls	25,6 (21,3–39,5)	7,7 (5,6–13,7)	16,7 (13,9–24,30)

* $p < 0,01$; ** $p < 0,05$.

абсолютного содержания Трег в сравнении со здоровыми лицами за счет клеток, экспрессирующих оба варианта молекулы FOXP3: CD3⁺CD4⁺FL-FOXP3⁺-клеток — в 1,8 раза,

CD3⁺4⁺FOXP3Δ2⁺-клеток — в 2 раза (см. табл. 2). Следовательно, при ММ было выявлено повышение как абсолютного, так и относительного содержания в периферической крови Трег (p=0,002). Таким образом, нами было показано, что для ММ характерно повышение Трег за счет их обеих изоформ: FOXP3Δ2 Трег и FOXP3-FL Трег, наибольший вклад в увеличение Трег вносят клетки, которые экспрессируют короткую изоформу FOXP3 — FOXP3Δ2.

На рисунке 3 представлены изменения содержания Трег и их изоформ в группах АР, ММ и у здоровых лиц.

Рис. 3. Содержание Трег и экспрессия изоформ FOXP3 у пациентов с АР, ММ и в контрольной группе

Fig. 3. Treg percentage and expression of FOXP3 isoforms in AR and MM patients and healthy controls

Итак, в нашем исследовании показана важность экспрессии изоформ молекулы FOXP3 CD4⁺-Т-лимфоцитами в патогенезе АР и ММ. Выявлено, что пациенты с АР характеризуются снижением в периферической крови доли Трег за счет FOXP3Δ2 Трег, что, по-видимому, обуславливает снижение их супрессорной функциональной активности. У первичных пациентов с ММ наблюдается обратная картина: увеличение процента и абсолютного содержания Трег, экспрессирующих как полную, так и короткую изоформы FOXP3, причем основной вклад в это увеличение вносят клетки, экспрессирующие изоформу FOXP3Δ2, т. е. при ММ отмечается активация Трег.

Гипотезу о молекуле FOXP3Δ2 как функционально более активной в качестве супрессорного фактора подтверждают также ранее проведенные нами и другими авторами работы по исследованию экспрессии изоформ молекул FOXP3 при дифференцировке тимоцитов [12] и при различных заболеваниях человека [11, 13]. В данных исследованиях уровень экспрессии вариантов молекулы FOXP3 определяли аналогичным образом методом лазерной проточной цитометрии с использованием МАТ, распознающих участки FOXP3, кодируемые экзонами 1 или 2. Так, в нашей предыдущей работе мы установили, что доля тимоцитов в тимусе, экспрессирующих пол-

ную молекулу FOXP3, снижалась с 65% на стадии двойных положительных CD4⁺CD8⁺CD25⁺FOXP3⁺-timoцитов до 33% на стадии более зрелых одинарно положительных CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺-timoцитов [12], т. е. при функциональном созревании Трег в тимусе происходило накопление их FOXP3Δ2 вариантов.

При исследовании миелодиспластического синдрома (МДС) в предыдущем исследовании нами было выявлено, что для всех пациентов с МДС характерно снижение доли и количества Трег в периферической крови в основном за счет FOXP3Δ2 Трег аналогично снижению при АР [11]. При исследовании мезентериальных лимфатических узлов у пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника (неспецифическим язвенным колитом и болезнью Крона) было выявлено, что при общем увеличении содержания Трег все они экспрессировали обе исследованные авторами изоформы молекулы FOXP3 или, по принятой в настоящей статье терминологии, у больных отсутствовали FOXP3Δ2 Трег [13]. Причем изначально авторы предполагали, что при хронических воспалительных заболеваниях кишечника возможно накопление FOXP3Δ2 Трег ввиду их неспособности связывать RORγt (Th17-поляризация иммунного ответа). Однако, как оказалось, способность молекулы FOXP3Δ2 накапливаться в ядре играет более важную роль при супрессии иммунного ответа, чем неспособность ограничивать экспрессию провоспалительного интерлейкина 17.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В рамках проведенной работы мы показали, что экспрессия изоформ молекулы FOXP3 CD4⁺-Т-лимфоцитами важна в развитии некоторых заболеваний человека. В частности, обнаружено, что при АР — классическом аллергическом заболевании — снижено количество и, по-видимому, функциональная активность Трег (за счет FOXP3Δ2 Трег). В то же время при ММ, представляющей лимфопролиферативные заболевания, напротив, мы обнаружили накопление Трег, и в частности FOXP3Δ2 Трег, доля которых статистически значимо превышала уровень в контрольной группе, что также указывает на важную патогенетическую роль этого варианта FOXP3 при ММ.

Литература/References

1. Sakaguchi S., Yamaguchi T., Nomura T. et al. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell*. 2008;133(5):775–787. DOI: 10.1016/j.cell.2008.05.009.
2. Bennett C.L., Christie J., Ramsdell F. et al. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat. Genet.* 2001;27(1):20–21. DOI: 10.1038/83713.
3. Allan S.E., Passerini L., Bacchetta R. et al. The role of 2 FOXP3 isoforms in the generation of human CD4⁺ Tregs. *J. Clin. Invest.* 2005;115(11):3276–3284. DOI: 10.1172/JCI24685.
4. Kaur G., Goodall J.C., Jarvis L.B., Gaston J.S.H. Characterisation of Foxp3 splice variants in human CD4⁺ and CD8⁺ T cells — Identification of Foxp3delta7 in human regulatory T cells. *Molecular Immunology*. 2010;48(1–3):321–332. DOI: 10.1016/j.molimm.2010.07.008.
5. Mailer R.K.W., Falk K., Rotzschke O. Absence of leucine zipper in the natural FOXP3D2D7 isoform does not affect dimerization but abrogates suppressive capacity. *PLoS ONE*. 2009;4(7):e6104. DOI: 10.1371/journal.pone.0006104.
6. Du J., Huang C., Zhou B., Ziegler S.F. Isoform-Specific Inhibition of RORα-Mediated Transcriptional Activation by Human FOXP3. *J. Immunol.* 2008;180(7):4785–4792. DOI: 10.4049/jimmunol.180.7.4785.
7. Ichiyama K., Yoshida H., Wakabayashi Y. et al. Foxp3 inhibits RORγt-mediated IL-17A mRNA transcription through direct interaction with RORγt. *J. Biol. Chem.* 2008;283(25):17003–17008. DOI: 10.1074/jbc.M801286200.
8. Magg T., Mannert J., Ellwart J.W. et al. Subcellular localization of FOXP3 in human regulatory and nonregulatory T cells. *Eur J Immunol.* 2012;42(6):1627–1638. DOI: 10.1002/eji.201141838.

9. Zheng Y., Josefowicz S.Z., Kas A. et al. Genome-wide analysis of Foxp3 target genes in developing and mature regulatory T cells. *Nature*. 2007;445(7130):936–940. DOI: 10.1038/nature05563.
10. Durie B.G., Harousseau J.L., Miguel J.S. et al. International uniform response criteria for multiple myeloma. *Leukemia*. 2006;20(9):1467–1473. DOI: 10.1038/sj.leu.2404284.
11. Дудина Г.А., Донецкова А.Д., Литвина М.М., Митин А.Н. Анализ экспрессии изоформ молекулы FOXP3 регуляторными Т-клетками периферической крови при миелодиспластическом синдроме. *Иммунология*. 2018;39(2–3):123–128. [Dudina G.A., Donetskova A.D., Litvina M.M., Mitin A.N. Analysis of FOXP3 isoforms

- expression by regulatory T cells from peripheral blood in myelodysplastic syndromes. *Immunologiya*. 2018;39(2–3):123–128 (in Russ.).
12. Митин А.Н., Литвина М.М., Шарова Н.И. и др. Экспрессия фактора FOXP3 и соотношение его изоформ в Т-клетках на разных стадиях дифференцировки. *Иммунология*. 2012;33(4):172–176. [Mitin A.N., Litvina M.M., Sharova N.I. et al. FOXP3 expression and its isoform ratio during T cells differentiation. *Immunologiya*. 2012;33(4):172–176 (in Russ.).]
13. Lord J.D., Valliant-Saunders K., Hahn H. et al. Paradoxically increased FOXP3⁺ T cells in IBD do not preferentially express the isoform of FOXP3 lacking exon 2. *Dis. Sci.* 2012;57(11):2846–2855. DOI: 10.1007/s10620-012-2292-3.

Сведения об авторах:

^{1,2}Донецкова Альмира Дмитриевна — д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории дифференцировки лимфоцитов, профессор кафедры иммунологии, ORCID ID 0000-0003-2465-2444;

¹Литвина Марина Михайловна — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории дифференцировки лимфоцитов, ORCID ID 0000-0003-3766-9843;

¹Смирнов Дмитрий Сергеевич — научный сотрудник отделения бронхиальной астмы, ORCID ID 0000-0002-4785-7074;

¹Курбачева Оксана Михайловна — д.м.н., профессор, заведующая отделением бронхиальной астмы, ORCID ID 0000-0003-3250-0694;

³Митина Татьяна Алексеевна — д.м.н., руководитель отделения клинической гематологии и иммунотерапии, ORCID ID 0000-0001-7493-0030;

³Белузов Кирилл Александрович — научный сотрудник отделения клинической гематологии и иммунотерапии, ORCID ID 0000-0001-9028-7671;

¹Митин Александр Николаевич — к.м.н., заведующий лабораторией дифференцировки лимфоцитов, ORCID ID 0000-0003-1333-0757.

¹ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России. 115522, Россия, г. Москва, Каширское шоссе, д. 24.

²ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России. 117997, Россия, г. Москва, ул. Островитянова, д. 1.

³ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского. 129110, Россия, г. Москва, ул. Щепкина, д. 61/2.

Контактная информация: Донецкова Альмира Дмитриевна, e-mail: almira_donetskova@yahoo.com. **Прозрачность финансовой деятельности:** никто из авторов не имеет финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах. **Конфликт интересов отсутствует.** Статья поступила 03.02.2020.

About the authors:

^{1,2}Al'mira D. Donetskova — MD, PhD, Leading Researcher of the Laboratory of Lymphocyte Differentiation, Professor of the Department of Immunology, ORCID ID 0000-0003-2465-2444;

¹Marina M. Litvina — PhD (biology), Senior Researcher of the Laboratory of Lymphocyte Differentiation, ORCID ID 0000-0003-3766-9843;

¹Dmitriy S. Smirnov — MD, Researcher of the Department of Asthma, ORCID ID 0000-0002-4785-7074;

¹Oksana M. Kurbacheva — MD, PhD, Professor, Head of the Department of Asthma, ORCID ID 0000-0003-3250-0694;

³Tat'yana A. Mitina — MD, PhD, Head of the Department of Clinical Hematology and Immunotherapy, ORCID ID 0000-0001-7493-0030;

³Kirill A. Belousov — MD, Researcher of the Department of Clinical Hematology and Immunotherapy, ORCID ID 0000-0001-9028-7671;

¹Aleksandr N. Mitin — MD, PhD, Head of the Laboratory of Lymphocyte Differentiation, ORCID ID 0000-0003-1333-0757.

¹NRC Institute of Immunology. 24, Kashirskoe road, Moscow, 115478, Russian Federation.

²Pirogov Russian National Research Medical University. 1, Ostrovityanov str., Moscow, 117437, Russian Federation.

³M.F. Vladimirovskiy Moscow Regional Research and Clinical Institute. 61/2, Shchepkin str., Moscow, 129110, Russian Federation.

Contact information: Al'mira D. Donetskova, e-mail: almira_donetskova@yahoo.com. **Financial Disclosure:** no authors have a financial or property interest in any material or method mentioned. **There is no conflict of interests.** Received 03.02.2020.