

ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр гематологии
Министерства здравоохранения Российской Федерации
На правах рукописи

Васильева Вера Алексеевна

«Циркулирующие эндотелиальные клетки и популяция Т-хелперов 17-го типа
на ранних сроках после трансплантации аллогенных гемопоэтических
стволовых клеток»

14.01.21 - Гематология и переливание крови

диссертация на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
Д.м.н. Паровичникова Е.Н.

Москва, 2018

Оглавление

Введение	4
Актуальность проблемы	4
Цель исследования	6
Задачи исследования	6
Научная новизна	7
Практическая ценность	7
Глава 1: Обзор литературы	9
1.1 Общие сведения о трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК)	9
1.2 Эндотелий и эндотелиальные клетки	10
1.2.1 Общие понятия об эндотелии, историческая справка	10
1.2.2 Клинико-лабораторная характеристика эндотелиальных клеток	12
1.2.3 Исследования популяций эндотелиальных клеток при негематологических заболеваниях	15
1.2.4 Исследования популяций эндотелиальных клеток при гематологических и онкологических заболеваниях	17
1.2.5 Исследования популяций эндотелиальных клеток при трансплантации гемопоэтических стволовых клеток	17
1.3 Т-хелперы 17-го типа	21
1.3.1 Общие сведения	21
1.3.2 Методы детекции Т-хелперов 17-го типа	24
1.3.3 Определение Т-хелперов 17-го типа в норме и патологии	25
1.3.3.1 Негематологические заболевания	25
1.3.3.2 Онкологические и гематологические заболевания	26
1.3.3.3 Аллогенная трансплантация гемопоэтических клеток крови и Т-хелперы 17-го типа	28
1.3.4 Общие понятия о CD 146	29
1.3.4.1 Взаимодействие Т-хелперов 17-го типа и эндотелиальных клеток	31
Глава 2. Материалы и методы	34
2.1. Клиническая характеристика больных	34
2.2 Объем исследования и временной регламент	39
2.3 Методы исследования	41
2.3.1 Метод определения циркулирующих эндотелиальных клеток, клеток-предшественников эндотелия и CD34-позитивных предшественников	42
2.3.2 Метод определения Т-хелперов 17-го типа	45
2.3.3 Статистическая обработка полученных результатов	47
Глава 3. Результаты исследования и обсуждения	49
3.1 Клинические результаты	49

3.2 Количество ЦЭК, ПЭК, доля Т-хелперов 17-го типа в популяции CD4+ и интенсивность экспрессии МСАМ на Th17, процентное содержание CD34-позитивных предшественников в ПК у больных до алло-ТГСК и доноров.....	58
3.3 Динамика популяции ЦЭК	62
3.3.1 Динамика популяции ЦЭК в зависимости от развития ОРТПХ.....	62
3.3.2 Динамика популяции ЦЭК в зависимости от вида предтрансплантационного кондиционирования.....	64
3.3.3 Динамика популяции ЦЭК в зависимости от вида иммуносупрессивной терапии.....	65
3.4. Динамика популяции ПЭК	66
3.5. Динамика популяции Th17 клеток.....	67
3.5.1 Динамика популяции Th17 клеток в зависимости от развития ОРТПХ.....	67
3.5.2 Динамика Th17 популяции в зависимости от вида иммуносупрессивной терапии	70
3.5.3 Динамика Th17 популяции в зависимости от предтрансплантационного кондиционирования.....	71
3.6. Динамика популяции CD34-позитивных предшественников.....	73
3.6.1 Динамика популяции CD34-позитивных предшественников в зависимости от вида иммуносупрессивной терапии.....	73
3.6.2 Динамика популяции CD34-позитивных предшественников в зависимости от развития ОРТПХ.....	75
3.6.3 Динамика популяции CD34-позитивных предшественников в зависимости от вида предтрансплантационного кондиционирования	76
3.7 Взаимосвязь ЦЭК и ПЭК, ЦЭК и Th17, ПЭК и Th17.	76
Глава 4. Заключение.....	79
Глава 5. Выводы	86
Список используемых сокращений	88
Список литературы.....	90
Приложение.....	106

Введение

Актуальность проблемы

Ключевым условием для успешной реализации аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК) является освобождение гемопоэтических ниш хозяина и реконституция донорского гемопоэза на фоне индуцированной иммунологической толерантности к тканям и органам хозяина.

В результате цитостатического воздействия различной интенсивности происходит гибель гемопоэтических клеток хозяина и освобождение костномозговых ниш, которые представлены клетками миелоидной и лимфоидной линий, адипоцитами, остеобластами, ретикулоцитами, мезенхимными клетками, эндотелиальными клетками и сосудами системы микроциркуляции [141].

Тканевое повреждение является одним из самых важных звеньев развития такого патофизиологического процесса после алло-ТГСК, как острая реакция трансплантата против хозяина (РТПХ). Острая РТПХ (оРТПХ) является наиболее грозным осложнением алло-ТГСК, частота развития которого зависит от многих факторов: заболевание, при котором выполнена алло-ТГСК, возраст больного, пол донора и реципиента, режим кондиционирования, источник трансплантата, вариант иммуносупрессивной профилактики, и, конечно, совместимость пары донор и реципиент по генам главного комплекса гистосовместимости (HLA).

Патогенетическими этапами развития оРТПХ являются: массивное эпителиальное и эндотелиальное повреждение вследствие высокодозного циторедуктивного воздействия во время предтрансплантационной подготовки. Повреждение эндотелия после цитостатического воздействия было выявлено как с помощью определения косвенных маркеров (повышение содержания фактора

Виллебранда (ФВ), тромбомодулина, тканевого фактора, эндотелина-1 и других маркеров), так и прямых (значимое увеличение количества циркулирующих эндотелиальных клеток) [3, 5, 98, 128, 163, 169]. Все это приводит к значительной продукции воспалительных цитокинов и увеличению экспрессии молекул адгезии на Т-клетках, а в последующем – и на эндотелиальных клетках. Вследствие этого происходит активация антигенпрезентирующих клеток хозяина и пролиферация донорских Т-клеток (афферентная фаза) и, наконец, высвобождение провоспалительных цитокинов, таких как интерлейкин-1, фактор некроза опухоли (TNF), ведущих к некрозу тканей (эфферентная фаза) [59]. Наиболее значимыми участниками этого патологического процесса являются популяции Т-хелперов (Th): 1, 2, 17 и 22 типов. Субпопуляция Т-хелперов 17-го типа (Th17) стала изучаться сравнительно недавно, и роль этих клеток в инициации или контроле РТПХ еще не полностью определена [38, 42, 100, 114, 132]. Известно, что при аутоиммунных заболеваниях Th17 являются ключевыми участниками воспалительного процесса [18, 80, 90, 99, 106, 137, 149, 160, 161] и характеризуются высокой экспрессией молекулы адгезии CD146, причем число этих клеток коррелирует с тяжестью патологического процесса [46].

Взаимодействие Т-клеток донора и антигенов тканей хозяина происходит после их контакта с эндотелием. CD146, или МСАМ (молекула адгезии клеток меланомы), является одной из многих универсальных молекул адгезии и межклеточного взаимодействия [62], которая определяется на многих клетках организма (эндотелиальные клетки, клетки гладкой мускулатуры, шванновские клетки, клетки нервных ганглиев, миофибробласты, клетки коры мозжечка, клетки молочных протоков, клетки эпителия бронхов и паращитовидных желез, мезенхимные клетки костного мозга). МСАМ выявляется и на активированных натуральных киллерах (НК), моноцитах, части Т- и В-клеток-памяти и, на Th17 [48, 54, 72].

Исследование корреляций между объемом клеточного повреждения и реконституцией иммунной системы явилось целью данной работы.

Цель исследования

Изучить динамику количества циркулирующих эндотелиальных клеток и Т-хелперов 17-го типа у больных с заболеваниями системы крови на ранних этапах после аллогенной ТГСК (до +100 дня) в зависимости от режима кондиционирования, варианта иммуносупрессивной терапии и вероятности развития острой РТПХ.

Задачи исследования

1. Проанализировать влияние режима кондиционирования и варианта иммуносупрессивной терапии на динамику популяции циркулирующих эндотелиальных клеток (ЦЭК CD34+/CD45-/CD146+) в периферической крови больных на ранних сроках после алло-ТГСК (день 0, +10, день восстановления уровня гранулоцитов, дни +30, +60, +90);
2. Оценить степень воздействия режима кондиционирования, варианта иммуносупрессивной терапии на изменение доли Th17 клеток (CD4+/CD45RO+/CD146+) в популяции всех CD4+ клеток периферической крови, а также экспрессию молекулы MSAM на этих клетках у больных на ранних этапах после алло-ТГСК;
3. Выполнить мониторинг CD34-позитивных клеток-предшественниц на ранних этапах после алло-ТГСК и выявить изменение их процентного содержания в зависимости от режима кондиционирования, варианта иммуносупрессивной терапии;
4. Оценить изменение количества циркулирующих эндотелиальных клеток, доли Th17 клеток, CD34-позитивных клеток-предшественниц у больных

после аллогенной ТГСК (день 0, +10, день восстановления уровня гранулоцитов, дни +30, +60, +90) в зависимости от развития ОРТПХ.

5. Оценить эффективность трансплантации аллогенных стволовых кроветворных клеток у больных, включенных в исследование, вероятность развития ОРТПХ в зависимости от диагноза, режима кондиционирования, источника трансплантата, типа донора, варианта иммуносупрессивной терапии.

Научная новизна

Впервые было выполнено динамическое исследование с очень ранним – на +10 день - подсчетом фракции Т-хелперов 17-го типа (Th17) среди популяции CD4+ клеток с параллельной оценкой объема эндотелиального повреждения и количества CD34-позитивных предшественников у больных после алло-ТГСК. Именно исследования в самые ранние сроки позволили выявить неописанную ранее закономерность: у больных с развившейся впоследствии ОРТПХ на +10 день было отмечено достоверно более низкое количество циркулирующих эндотелиальных клеток, значимое увеличение количества CD34-позитивных предшественников и достоверно значимый постепенный прирост доли Т-хелперов 17-го типа с +30 к + 90 дню с существенным увеличением интенсивности экспрессии молекулы MSAM на них.

Практическая ценность

В ходе проведенного исследования была выявлена исключительно высокая частота развития ОРТПХ у больных, которым алло-ТГСК выполнена от частичносовместимых доноров на фоне стандартной иммуносупрессивной терапии. В связи с этим, с 2014 г. таким больным осуществляют введение циклофосфида (ЦФ) в дозе 50 мг/кг на +3, +4 дни после алло-ТГСК.

Определение ЦЭК на сверхранних этапах после алло-ТГСК (+10 день) может повлиять на изменение тактики иммуносупрессивной терапии.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Изменения в популяции ЦЭК зависят от варианта кондиционирования и факта развития оРТПХ. У больных после миелоаблативного режима кондиционирования отмечалось достоверное увеличение количества ЦЭК в день алло-ТГСК ($p=0,026$). У пациентов без оРТПХ на + 10 и + 30 дни определялось достоверно большее количество ЦЭК (+10 день – 124 кл/мл, + 30 день – 33,8кл/мл), чем у больных с оРТПХ (+10 день – 12,5кл/мл, + 30 день – 0,9кл/мл) ($p=0,037$, $p=0,017$, соответственно);

2. Повышение относительного содержания Th17 в популяции CD4+ клеток и высокий уровень экспрессии МСАМ на них наблюдался на всех сроках мониторинга у пациентов с оРТПХ по сравнению с таковым у пациентов без оРТПХ, при этом значимыми отличия стали к +90 дню ($p=0,0062$);

3. У пациентов с оРТПХ количество CD34-позитивных предшественников на + 10 день было значимо выше (2,03%) по сравнению с пациентами без оРТПХ (0,08%) ($p=0,037$).

Глава 1: Обзор литературы

1.1 Общие сведения о трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК)

Трансплантация аллогенных гемопоэтических стволовых клеток является одним из этапов программного лечения злокачественных и наследственных заболеваний у детей и взрослых [6, 8, 9, 173]. По данным EBMT за последние 10 лет отмечен 2-3 кратный прирост трансплантационной активности в 655 центрах из 48 стран мира [119]. Особенно, хотелось отметить, что и в России резко – в 4-6 раз – возросло количество алло-ТГСК, особенно от неродственных и гаплоидентичных доноров [7, 119]. Это связано не только с появлением Национального регистра доноров костного мозга, но и с совершенствованием технологии выполнения гаплоидентичных ТГСК [7]. Алло-ТГСК, несомненно, является эффективным методом терапии, однако она сопряжена с развитием тяжелых, порой, жизнеугрожающих осложнений, в частности острой РТПХ. Острая РТПХ является следствием взаимодействия Т-лимфоцитов донора с тканями реципиента [10, 83]. Частота развития оРТПХ составляет 10-40% в зависимости от различий в системе HLA, типа донора, возраста пациента и т.д. В целом, патогенез оРТПХ хорошо изучен, тем не менее, продолжают исследования по изучению более тонких механизмов реализации этого патофизиологического процесса, механизмов взаимодействия множества факторов, как инициирующих так, и осуществляющих эту реакцию, идут поиски и, так называемых, предикторов развития оРТПХ. Последнее представляется исключительно важным, поскольку выделение на самых ранних этапах после алло-ТГСК больных из группы крайне высокого риска развития оРТПХ позволит разработать программы превентивной терапии или профилактики этого грозного осложнения.

Выполненная нами работа посвящена «ключевым игрокам» в патогенезе ОРТПХ: 1) эндотелиальным клеткам, которые, подвергаясь цитостатическому или лучевому воздействию, отражают общее массивное повреждение тканей организма больного и, с другой стороны, являются плацдармом для реализации иммунного взаимодействия; 2) Th-17 – Т-хелперам 17-го типа, активным участникам иммунного ответа.

1.2 Эндотелий и эндотелиальные клетки

1.2.1 Общие понятия об эндотелии, историческая справка

Первое описание клеток, выстилающих кровеносные сосуды, относится к началу XIX века, когда von Recklinghausen F.D. установил, что стенки сосудов выстланы клетками, а не просто «туннели», проходящие через ткани, как считалось ранее. Starling E.H. и его закон об обмене жидкостями между кровью капилляров и интерстициальной жидкостью тканей, предложенный в 1896 г., укрепил представление о том, что эндотелий является главным селективным барьером. В середине XX века, в работах Palade G.E. с соавт. и Gowans J.L. с соавт., проводивших исследования методом электронной микроскопии, был описан механизм взаимодействия лимфоцитов с эндотелием, что послужило стимулом к дальнейшим исследованиям эндотелия, как динамичной, неоднородной, распространенной ткани, которая обладает барьерной, секреторной, синтетической, гемостатической, вазотонической, метаболической, иммунологической функцией и способностью к ремодуляции сосудистой стенки [4, 40].

Являясь барьером между кровотоком и тканями, эндотелий сосудов является динамичной популяцией клеток. Такое расположение определяет функции эндотелиальных клеток – реагирование на множество

патофизиологических стимулов [50]. В процессе жизнедеятельности под прямым воздействием нейтрофилов, цитокинов и протеаз, лекарственном влиянии (например, ингибиторов кальциневрина), вследствие нарушения молекул экстарцеллюлярного матрикса, механического повреждения эндотелия происходит слущивание эндотелиальных клеток в кровоток. Эти клетки получили название циркулирующих эндотелиальных клеток [162].

Наряду с ЦЭК, эндотелиальные клетки представлены в кровотоке еще одной популяцией: клетками-предшественниками (ПЭК), которые впервые были описаны Asahara T. в 1997г. [16]. Циркулирующие ПЭК являются тем пулом клеток, из которого образуется новый клеточный участок в месте повреждения эндотелия или осуществляется замена дисфункционального эндотелия [76]. ПЭК выходят в кровоток не из кровеносных сосудов, а из костного мозга, где образуются из общего предшественника как для гемопоэтических, так и эндотелиальных клеток – гемангиобласта [79]. Мобилизация ПЭК из костного мозга сложный процесс, регулируемый рядом факторов: стромально-клеточным производным фактором α (SDF-1 α), матриксной металлопротеиназой-9, фактором роста эндотелия сосудов (VEGF), фактором роста плаценты (PlGF), и гранулоцитарным колониестимулирующим фактором (G-CSF) [79, 125]. Под воздействием ряда цитокинов и факторов роста при выходе из костного мозга клетки, характеризующиеся экспрессией ранних специфических для предшественников (CD34, CD133) поверхностных маркеров теряют их, приобретая на своей поверхности маркеры зрелого эндотелия (VEGF-R2, ФВ) [5, 133]. ПЭК высвобождаются в кровеносное русло и мигрируют в зоны поврежденного слоя эндотелиальных клеток сосуда.

Впервые, ЦЭК были описаны Bouvier С.А. и Hladovec J. как клетки крови у кроликов, которым была выполнена инъекция эндотоксина *E. Coli* [66]. Ранее исследователи описывали, что эти клетки не имеют ядра [32, 77]. В настоящее время известно, что это клетки диаметром 20-50 μ М, появляющиеся в кровотоке после повреждающего воздействия на стенки сосудов. При этом ПЭК – это

клетки, производные гемангиобластов костного мозга, в диаметре составляют менее 20 μM и несут на себе маркеры «незрелых» клеток [30].

У человека ЦЭК были выявлены при различных состояниях, связанных с повреждением сосудов: при ангиохирургических операциях, при серповидно-клеточной анемии, риккетсиозной и цитомегаловирусной инфекциях, тромботической тромбоцитопенической пурпуре, остром коронарном синдроме, атеросклерозе, опухолевой пролиферации и связанным с ней неоангиогенезе, ряде аутоиммунных заболеваний, в том числе болезни Бехчета, системной красной волчанке, а так же при химиотерапевтическом воздействии [37, 68, 74, 95, 109, 115, 138].

1.2.2 Клинико-лабораторная характеристика эндотелиальных клеток

Эндотелиальные клетки редко встречаются у здорового человека и их количество не превышает 3-5 клеток в 1 мл крови [50, 66, 162]. Однако по данным других авторов у здоровых добровольцев детектируется еще меньшее количество эндотелиальных клеток – не более 0,4 кл/мл [28], что составляет 0,01% – 0,0001% от мононуклеарной фракции [88].

В 1970х гг. единственным методом изучения эндотелиальных клеток была световая микроскопия с использованием окрашивания по методу Giemsa G. [77]. Морфологически эндотелиальные клетки состоят из плеоморфного ядра с волнистой поверхностью, скудной цитоплазмой и неровной клеточной стенкой. Отмечено, что эндотелиальные клетки могут встречаться группами.

После появления метода проточной цитофлуориметрии, в конце 70-х начале 80-х годов, эндотелиальные клетки стали идентифицировать с использованием антител к эндотелиальным маркерам (например, к ФВ или тканевому активатору плазминогена). Однако метод не был специфичным, вследствие чего большинству исследователей приходилось в дополнении

использовать световую микроскопию [55]. Так продолжалось до тех пор, пока в 1987г. Johnson J.P. с соавт. не был открыт поверхностный антиген MUC18 на клетках меланомы, а окрашивание моноклональным антителом к MUC18 определялось так же на гладкомышечных клетках кровеносных сосудов и стенках волосяных фолликулов [96]. Позднее, этот антиген был охарактеризован как панэндотелиальный, и ему был присвоен порядковый номер кластера дифференцировки – CD146 [19]. Наличие поверхностного маркера CD146 позволило осуществить как иммуномагнитную изоляцию эндотелиальных клеток (MACS), так и отсортировать флуоресцентно-активированные клетки (FACS) [55].

В связи с крайне малым количеством эндотелиальных клеток в периферической крови (ПК), для их идентификации использовали различные методы: устранение эритроцитов и концентрирование путем центрифугирования; центрифугирование в градиенте плотности и захват иммуномагнитными бусами с CD146 [30]. Для уменьшения аутоагрегации ЦЭК метод с применением магнитных бус был модифицирован путем введения альбумина и этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) [138]. А для уменьшения неспецифического связывания с лейкоцитами использовали Fc-блокирующий агент [164, 166]. Так же при исследовании с использованием магнитных бус можно использовать двойную «метку», например, в дополнении к CD146 – CD34.

Учитывая высокую пролиферативную активность ПЭК, J.Hill с соавт. разработал метод колониеобразования ПЭК с последующим их ручным подсчетом [76].

В настоящее время для оценки и подсчета эндотелиальных клеток чаще всего используют иммунофенотипическое исследование, применяемое из-за доступности этого метода, так и надежности маркера для клеток эндотелиальной линии – CD146 [51].

Известно большое количество протоколов иммунофенотипирования эндотелиальных клеток. Del Para N. с соавт., а также и другие исследователи использовали метод проточной цитометрии для цельной венозной крови и определяли ЦЭК как события негативные по антигену CD45, но положительные по – CD34, CD146 и CD62E [91, 115, 123]. Существуют протоколы, в которых в дополнении к CD45 и CD146 используют маркер CD31 для определения ЦЭК [3, 104]. Противоречивые результаты были получены в отношении антигена CD36, который является маркером клеток сосудистого происхождения. Например, Swerlick R.A. и соавт. указывают на наличие его на эндотелиальных клетках при серповидноклеточной анемии [122, 144]. Однако, результаты других авторов показывают его отсутствие [109]. Некоторые исследователи разделяют ЦЭК на активированные и неактивированные популяции. Для определения активности эндотелиальных клеток используют маркеры CD54, CD62, а в ряде случаев CD106 [115, 152].

Для ПЭК характерна экспрессия антигенов CD34, CD133 (считается наиболее специфическим маркером для ПЭК), и рецепторов к фактору роста эндотелия сосудов-1, 2 (VEGFR-1,2) [30, 79, 110, 129]. Ряд авторов указывает на то, что ПЭК могут частично нести на себе панлейкоцитарный антиген, т.е. слабо экспрессировать CD45 dim [44, 129, 152]. В таблице № 1 представлены основные характеристики циркулирующих эндотелиальных клеток и их предшественников.

Таблица 1. Различия между ЦЭК и ПЭК.

	ЦЭК	ПЭК
Происхождение	Стенка кровеносных сосудов	Костный мозг
Морфология	Зрелые клетки, диаметром 20-50 μМ	Незрелые клетки, диаметром менее 20 μМ

Продолжение таблицы 1.

	ЦЭК	ПЭК
Имунофенотип		
CD45	–	dim
CD34	+	+
CD31	+	–
CD133	–	+
VEGFR-1	–	+
ФВ	+	+
CD 146	+	+
Маркеры активации:		
CD54	+	+
CD62	+	+
VEGFR-2	–	+
Возможность формирования колоний с высоким пролиферативным потенциалом	Нет	Да
Функция	отражает повреждение сосудистой стенки	неоваскулогенез

1.2.3 Исследования популяций эндотелиальных клеток при негематологических заболеваниях

Исследованию эндотелиальных клеток при кардиоваскулярных заболеваниях посвящено очень много работ. J.M. Hill с соавт. установил зависимость между пониженным уровнем ПЭК и повышенным уровнем сывороточного холестерина, а также с такими заболеваниями, как гипертензия и диабет, предположив, что эти факторы неблагоприятного прогноза сердечно-сосудистых заболеваний стимулируют повышенный оксидативный стресс, активность оксида азота и другие физиологически процессы, которые могут влиять на мобилизацию и жизнеспособность ПЭК. Помимо этого, постоянное повреждение эндотелия сосудов приводит к истощению пула ПЭК в костном

мозге, что на фоне наличия других атерогенных факторов, способствует развитию атеросклероза сосудов [76].

Важным диагностическим критерием является обнаружение эндотелиальных клеток у пациентов с аутоиммунными заболеваниями. Так, например, у больных с системной склеродермией отмечено повышенное содержание ЦЭК в ПК по сравнению со здоровыми донорами, а ПЭК было статистически больше у пациентов с ранними стадиями заболевания [115]. Woynowdt A. с соавт. предложил использовать ЦЭК как маркер ассоциированный с антинейтрофильными цитоплазматическими антителами васкулитов [74]. В связи с выявленной корреляцией количества ЦЭК и ПЭК со степенью активности аутоиммунного процесса, исследование эндотелиальных клеток может быть применено у пациентов с ОРТПХ – аллоиммунным осложнением алло-ТГСК.

Kas-Deelen A.M. с соавт. исследовал ЦЭК у 44 реципиентов аллогенной почки. В результате проведенного исследования было выявлено, что количество ЦЭК повышается при цитомегаловирусной (ЦМВ) инфекции, а ЦМВ-инфицированные ЦЭК определялись у больных при развернутых стадиях ЦМВ-болезни [86].

Исследование, проведенное у пациентов после трансплантации почки исследовательской группой во главе с Woynowdt A., показало, что у больных, получавших в качестве иммуносупрессивной терапии циклоспорин А (ЦСА), количество ЦЭК достоверно выше, чем у больных, получавших азатиоприн или глюкокортикостероиды в сочетании с мофетилмикофенолатом. Авторы предполагают, что эти изменения связаны с нежелательным влиянием ЦСА на функцию эндотелия. In vitro было показано, что циклоспорин А ингибирует деление эндотелиальных клеток [165].

1.2.4 Исследования популяций эндотелиальных клеток при гематологических и онкологических заболеваниях

Goon P.K.Y. с соавт. показали, что количество ЦЭК у больных раком молочной железы из группы плохого прогноза по шкале NPI (Nottingham Prognostic Index) статистически достоверно больше, чем у больных из групп умеренного или хорошего прогноза [71]. В отечественной и зарубежной литературе обсуждаются вопросы, посвященные мониторингу эндотелиальных клеток в процессе проведения химиотерапии пациентам с различными видами солидных опухолей. Так, Roodhart с соавт. выявил корреляцию у пациентов с высоким уровнем ЦЭК на 7 день после химиотерапии (ХТ) и низкими общей и бессобытийной выживаемостями [125]. Shaked Y. с соавт. сделал предположение о необходимости проведения ангиостатической терапии при раковых заболеваниях, основываясь на исследовании изменений уровня ПЭК во время ХТ, и проведение короткого курса ХТ после приема ангиостатических препаратов с целью токсического воздействия на мобилизованные из костного мозга ПЭК [133, 134]. В нашей клинике Червонцевой А.М. с соавт. показано, что у пациентов с острыми лейкозами сразу после проведения курса химиотерапии повышалось количество ЦЭК в периферической крови, а через 10-12 дней наблюдалось повышение уровня ПЭК [5].

1.2.5 Исследования популяций эндотелиальных клеток при трансплантации гемопоэтических стволовых клеток

Эндотелиальное повреждение играет важную роль в развитии осложнений, связанных с трансплантацией: веноокклюзионной болезни, микроангиопатии, РТПХ.

Участие эндотелия в событиях, происходящих после алло-ТГСК, условно можно разделить на следующие этапы: 1. Первоначальное эндотелиальное повреждение под воздействием препаратов, используемых в режимах кондиционирования; 2. Репарация поврежденных сосудов посредством донорских эндотелиальных клеток; 3. Повреждение эндотелия аллореактивными Т-клетками.

Woynodt A. с соавт. установили статистически достоверное более низкое количество ЦЭК у пациентов, после РКСИ, по сравнению с больными, которым проводили алло-ТГСК после миелоаблативного режима кондиционирования (МАК). При этом достоверных различий в содержании ЦЭК при использовании тотального облучения тела или цитостатического воздействия не обнаружено [163].

Несколько исследований показали, что при оРТПХ в органах-мишенях определяется высокая плотность сосудов. Так, например, у больных оРТПХ желудка сосудистая плотность в биоптатах желудка была больше, чем у пациентов с гастритом или у здоровых людей [105]. При гистологическом исследовании биоптатов кожи больных после алло-ТГСК, более плотная пролиферация сосудов визуализировалась значительно чаще при кожной форме острой РТПХ, чем без РТПХ [52]. Yan Z. с соавт. показал, что у лабораторных мышей во время констатации оРТПХ отмечается повышенный уровень ЦЭК [169].

Учитывая важность репарации поврежденного эндотелия в патогенезе РТПХ, не осталось незатронутой и возможность воздействия на этот механизм с помощью специфических ингибиторов ангиогенеза, например, антител к VE-кадгерину на ПЭК[121]. Penack O. с соавт. установил, что VEGF-антитела не могут быть использованы в качестве терапевтической опции при РТПХ, т.к. при использовании анти-VEGFR1 и анти-VEGFR2 после аллогенной ТГСК у мышей был обнаружен ингибирующий эффект на гемопоэз, что привело к ранней смерти реципиентов. Кроме того, авторами обнаружено, что VEGF не

экспрессируется во время РТПХ в тканях-мишенях. Полученные результаты свидетельствуют о том, что применение стратегии анти-VEGF для предотвращения РТПХ не является эффективной, а только может потенциально ингибировать восстановление гемопоэза [120].

Альтернативный подход в профилактике развития РТПХ основан на использовании ингибиторов протеасом. Так, например, введение бортезомиба, мощного ингибитора ангиогенеза, мышам-реципиентам стволовых клеток крови (СКК) снижает частоту развития оРТПХ [33, 142]. Однако механизм действия бортезомиба связан не только с ингибированием ангиогенеза, но и с тем фактом, что ингибиторы протеасом принимают участие в активации В- и Т-клеток, их пролиферации и апоптозе.

Повреждение эндотелия является основой патологического процесса при развитии осложнений после алло-ТГСК, например, веноокклюзионной болезни печени, тромботической микроангиопатии, идиопатического пневмонического синдрома и синдрома повышенной проницаемости капилляров. В диссертационной работе Моисеева И.С. выявлено отсутствие прогностической значимости количества ЦЭК до начала кондиционирования и в день 0 в отношении вероятности развития веноокклюзионной болезни. Однако у пациентов в день развития ВОБ выявлено достоверное повышение количества ЦЭК по сравнению с днем 0 и днем приживления трансплантата у пациентов без ВОБ. Примененный однофакторный анализ данных выявил, что уровень ЦЭК до начала кондиционирования (более 50 клеток/мл) ассоциирован с повышенной трансплантационной летальностью в течение первого года и низкими показателями бессобытийной и общей выживаемости. При многофакторном анализе высокий уровень ЦЭК до начала кондиционирования также являлся достоверным независимым фактором риска трансплантационной летальности. Среди выявленных факторов риска, ожидаемо, было отсутствие ремиссии на момент алло-ТГСК, а повреждение эндотелия отражало наличие опухоли кроветворной системы [3].

Прямое повреждение эндотелия реципиента после алло-ТГСК аллореактивными Т-лимфоцитами приводит к развитию РТПХ. Так, тяжелая степень кишечной формы оРТПХ в одном из исследований была связана с развитием геморрагического энтероколита вследствие поражения эндотелиального слоя микрососудов кишечника [57].

Salat С. с соавт. выявили достоверное увеличение содержания ФВ и тромбомодулина в крови у пациентов с тяжелой формой оРТПХ по сравнению с теми, у кого не наблюдалось развития, либо определялась I степень тяжести этого осложнения. Увеличение концентрации этих белков проходило, в частности, после завершения режима кондиционирования, что непосредственно было связано с цитостатическим повреждением эндотелия) и в момент приживления трансплантата [128].

Shimura К. с соавт. было показано, что количество ПЭК меньше у пациентов с склеродермной формой хронической РТПХ (хрРТПХ), чем у пациентов после алло-ТГСК без развития хрРТПХ или с хрРТПХ несклеродермной формой, а так же по сравнению со здоровыми лицами [136]. Авторы считают, что наблюдаемое изменение связано с истощением костного мозга на фоне склеродермной формы хрРТПХ (как наиболее тяжелой формы), похожие изменения были выявлены и при прогрессирующем системном склерозе [116]. Также авторы не исключают, что ПЭК при склеродермной форме хрРТПХ могут функционально изменяться, в меньшей степени реагируя на ангиогенные стимулы, что нашло подтверждение при обследовании пациентов с сахарным диабетом II типа [148].

Таким образом, повреждение эндотелия является неоспоримо важным звеном при развитии осложнений после аллогенной ТГСК. Однако маркеры этого повреждения и их взаимодействие с аллореактивными Т-клетками после алло-ТГСК все еще изучены недостаточно.

1.3 Т-хелперы 17-го типа

1.3.1 Общие сведения

До начала 2000-х годов, считалось, что существует только два подмножества CD4⁺ клеток: Th1 и Th2. В 1993г. был идентифицирован интерлейкин (IL)-17 [126], а в дальнейшем была показана его способность вызывать повреждение тканей суставов в моделях артритов у мышей [101]. В 2005 году было доказано, что - клетки, секретирующие IL-17, представляют особую популяцию CD4⁺ Т-лимфоцитов [73, 117].

К настоящему времени выполнено огромное количество работ по выяснению этапов дифференцировки Th17 из наивной Т-клетки. В результате идентифицирован внутриклеточный фактор транскрипции, вызывающий дифференцировку Th17 – ROR γ t (рецепторы, ассоциированные с рецепторами ретиноевой кислоты, или ретиновые orphan-рецепторы относятся к семейству ядерных рецепторов). Ядерные рецепторы локализуются в цитоплазме (тип I) или присутствуют в ядре (собственно ядерные рецепторы, тип II) и осуществляют в многоклеточных организмах регуляцию множества функций (рост, дифференцировку, активацию, апоптоз и пр.) путем прямого контроля экспрессии генов и ряда «негеномных» эффектов. Ivanov S., Littman D.R. и их коллеги первыми сообщили, что ROR γ t необходим для дифференциации наивных CD4⁺ Т-клеток в клетки Th17 [81]. Экспрессия ROR γ t индуцируется факторами дифференцировки: трансформирующим фактором роста-бета (TGF- β) плюс IL-6 или IL-21.

TGF- β является ключевым цитокином для дифференцировки Th17. Этот процесс потенцируется с помощью IL-1b и TNF. Ранее считалось, что решающую роль в дифференцировке Th17 имеет взаимодействие IL-23 с TGF- β , однако позднее, в результате экспериментальных исследований, была показана роль

собственно IL-23 в развитии и активации Th17 [29, 42, 156]. Отмечается, что IL-21 совместно с TGF- β способен индуцировать дифференцировку Th17 [2]. Функция TGF- β заключается еще и в контроле трансдифференцировки Th17 и T-регуляторных клеток (T-reg) [159].

IL-6 опосредует свое действие через активацию белка STAT3. STAT-3 – сигнальный белок и активатор транскрипции из семейства белков STAT [64], который индуцируют STAT3-зависимую экспрессию IL-21, IL-23 и ROR γ t.

ROR γ t индуцирует экспрессию IL-17A и IL-17F, способствует синтезу IL-23R, и опосредует продукцию IL-22 [2, 42, 64]. Так же Th17 характеризуются продукцией IL-21, IL-26 и TNF.

Существует ряд работ, в которых авторы ставят под сомнение необходимость взаимодействия TGF- β и IL-6 для индукции дифференцировки Th17. Однако предполагается, что TGF- β может быть как самостоятельным стимулирующим фактором, так и в сочетании с IL-21 [31, 170].

Дополнительными факторами регуляции транскрипции цитокинов Th17 являются рецептор к гидрокарбонату арила, интерферон регуляторный фактор 4 и активатор протеина 1 [2, 36, 155]. У человека важную роль в дифференцировке Th17 играет также IL-1 β , усиливающий действие IL-6 и IL-23 [11].

В качестве супрессоров дифференцировки Th17 рассматриваются: Th1-специфический транскрипционный фактор T-bet [12], интерферон- γ – продукт Th1, IL-4 – продукт Th2. IL-27, полученный из дендритных клеток, блокирует дифференцировку Th17 [23, 140]. IL-2 также ингибирует дифференцировку Th17 через STAT5-зависимый механизм [93]. Ингибирующим действием обладает и галофугинон (синтетический заменитель экстракта, получаемого из растения *Dichroa febrifuga*, одного из видов гортензиевых), применяется при лечении псориаза, склеродермы, РТПХ и аутоиммунного артрита [118, 143].

На Th17 определяются следующие рецепторы для хемокинов и цитокинов: CCR4, CCR6, IL-23R и CD161 [45]. Также Th17 продуцируют ряд хемокинов, таких как CXCL-8 и CXCL-13, которые активно привлекают нейтрофилы и В-

клетки в очаги воспаления, что является обязательным в патогенезе аутоиммунных заболеваний.

IL-17A является членом семейства IL-17 цитокинов (IL-17 A, B, C, D, E, F), которые структурно гомологичны друг другу. Th17 продуцируют лишь два представителя из семейства IL-17: IL-17A и IL-17F. IL-17A был описан в качестве продукта активированных CD4⁺ Т-клеток, клеток-памяти, но в настоящее время известно, что он определяется и в CD8⁺ Т-клетках памяти, эозинофилах, нейтрофилах и моноцитах [61, 126]. Тем не менее, основным источником IL-17A являются CD4⁺ Т-клетки памяти. Такие цитокины, как IL-2, IL-15, IL-18 и IL-21 могут также стимулировать выработку IL-17 активированными Т-клетками, в то время как IL-12 ее подавляет [78]. IL-17A способен связываться с рецептором IL-17RA, который экспрессируется на различных типах клеток, в том числе гематопоетических клетках, фибробластах, эндотелиальных и эпителиальных клетках [53]. В настоящее время о воспалительных эффектах IL-17F известно меньше, чем об IL-17A. Установлено, что IL-17F совместно с IL-17A вызывает продукцию хемокинов, а также действует синергично с TNF- α и IL-1 β .

Представители семейства IL-17 относятся к провоспалительным цитокинам и участвуют в патогенезе многих воспалительных заболеваний (ревматоидный артрит, астма, волчанка, реакция отторжения аллотрансплантата) путем активации таких транскрипционных факторов, как NF- κ B и JNK-киназы [131]. Выявлено, что белки семейства IL-17 стимулируют продукцию IL-6, окиси азота и простагландина E2, а взаимодействие с другими воспалительными цитокинами, такими как IL-1b, TNF, интерферон- γ приводит к развитию местного воспаления [12].

Таким образом, при всей противоречивости информации о функциях Th17, они являются одним из основных клеточных участников воспаления тканей, играют важную роль в защите организма от микробов, а также имеют значение в привлечении других лейкоцитов к участкам воспаления [149].

1.3.2 Методы детекции Т-хелперов 17-го типа

Наиболее распространенным методом идентификации Th17 является проточная цитофлуориметрия, как наиболее доступный и быстрый метод исследования. Th17 являются популяцией CD4⁺ клеток. Уровень Th17 в норме составляет в среднем 3,17% от общего количества CD4⁺ клеток и 1,18% от общего количества лимфоцитов [150]. В качестве основного метода детекции применяется внутриклеточное окрашивание с IL-17. Однако данный метод является трудоемким, так как рутинная пробоподготовка занимает у опытного исследователя более 12 часов. Проведенные исследования по поиску специфических поверхностных маркеров для Th17, показали, что на основе экспрессии IL-23R, Th17 идентифицированы как субпопуляция CD45RO⁺ Т-клеток в крови здоровых доноров [31]. На поверхности Th17 отмечается высокая экспрессия рецептора хемокина CCR6 (или CD196) и CXCR3 (CD182, CD183) [15]. С помощью микрочипов было выявлено, что Th17 экспрессируют на своей поверхности CD161 (подсемейство лектин-подобных рецепторов НК) [43].

Ряд исследователей подтвердили, что доказательным для идентификации Th17 является экспрессия CD146 [35, 46, 62, 92]. Dagur с соавт. показал, что в популяции клеток у здоровых доноров с иммунофенотипом CD4⁺/CD45RO⁺/CD146⁺ уровень м-РНК IL-17A, ROR γ t, IL-22, IL-26, IL-23R, CXCL-13, CCR-6, CD146 значительно выше, чем в MCAM негативной популяции [46]. Аналогичные результаты были предоставлены коллективом авторов во главе с Larochelle С.: CCR6⁺/CD161⁺/MCAM⁺ отсортированные клетки достоверно выше экспрессировали IL-17A, IL-22, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор, ROR γ t [92]. Это дает возможность нам рассматривать поверхностные маркеры CD146, CD161, CCR6 в качестве специфических, или, точнее, в высокой степени ассоциированных с популяцией Th17.

1.3.3 Определение Т-хелперов 17-го типа в норме и патологии

1.3.3.1 Негематологические заболевания

Роль Th17 в иммунной защите против патогенов характеризуется продукцией IL-17, направленной против важных внеклеточных бактерий (*Staphylococcus aureus*, *Citrobacter rodentium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Pneumocystis carinii*, *Pseudomonas aeruginosa*), грибов (*Candida albicans*) и вирусов (вирус простого герпеса, ротавирус, синцитиальный вирус) [82, 149].

Известно, что при аутоиммунных заболеваниях (рассеянный склероз, ревматоидный артрит, воспалительные заболевания кишечника и псориаз) Th17 являются ключевыми участниками воспалительного процесса и характеризуются высокой интенсивностью экспрессией молекулы адгезии CD146, причем число этих клеток коррелирует с тяжестью патологического процесса, а наличие экспрессии CD146, как панэндотелиального маркера, молекулы адгезии, на поверхности этих клеток, вероятно, способствует адгезии на поверхности эндотелия и миграции Th17 к местам воспаления [46].

Существует ряд доказательств, подтверждающих неотъемлемую роль IL-17 в патогенезе ревматоидного артрита: это – увеличенный уровень IL-17 в сыворотке, синовии и синовиальной жидкости у этих пациентов, так и спонтанная секреция IL-17 клетками синовиальной культур пациентов с ревматоидным артритом [80, 106]. Данный цитокин может активировать все механизмы повреждения тканей, повреждение межклеточного матрикса за счет стимуляции продукции матриксных металлопротеиназ и ингибирование синтеза протеогликанов и коллагена, как основных компонентов репарации [39, 84]. Внутрисуставное введение IL-17 в неизмененные суставы мышей вызывает аналогичные изменения, наблюдаемым при ревматоидном артрите. Все эти

изменения можно нивелировать применением IL-4, IL-13 или анти- IL-17 антител.

Роль IL-17 в патогенезе псориаза была подтверждена выявлением повышенной экспрессией ROR γ t, IL-6, IL-1 β и IL-23 в биоптатах вовлеченных областей кожи больных псориазом по сравнению со здоровыми участками или кожей здоровых людей [149].

Важное место IL-17 занимает в патогенезе заболеваний дыхательной системы. Исследователями в этой области было показано, что в образцах мокроты больных бронхиальной астмой находится повышенный уровень IL-17 по сравнению с контрольной группой людей, не страдающих этим заболеванием. Аналогичные изменения наблюдали и в плазме у пациентов с бронхиальной астмой. In vitro было показано, что человеческие бронхиальные фибробласты под воздействием IL-17 продуцируют IL-6, IL-8 и CXCL1. IL-8 и CXCL1 являются хемоаттрактантами для нейтрофилов, а IL-6 представляет собой активирующий нейтрофилы цитокин. Таким образом, увеличенная экспрессия IL-17 при астме может объяснить повышенное накопление и активацию нейтрофилов в легких, которые в свою очередь активируют эластазу, ключевой медиатор воспаления в патогенезе хронических заболеваний дыхательных путей [18, 99, 160].

Выявлена роль Th17 в этиологии и ряда других аутоиммунных заболеваний: склеродермии, системной красной волчанки, спондилоартрита, атопического дерматита, болезни Крона и язвенного колита [24, 90, 137, 149, 161].

1.3.3.2 Онкологические и гематологические заболевания

Учитывая функциональное значение Th17 и IL-17 в физиологических процессах, можно предположить их участие в патогенезе гематологических и

онкологических заболеваний [27, 113]. Повышенный уровень IL-17 обнаружен при раке яичников, кожи и предстательной железы [41, 87, 139]. Увеличение числа IL-17 положительных клеток было обнаружено у 25 из 52 больных немелкоклеточным раком легкого и было ассоциировано с неблагоприятным прогнозом [158].

Ряд исследовательских работ показал, что повышенные значения Th17 и IL-17 наблюдались в периферической крови у больных в дебюте острого миелобластного лейкоза (ОМЛ), по сравнению с пациентами, находящимися в ремиссии заболевания, или здоровыми людьми [167]. Однако, в другом исследовании различий в количестве циркулирующих Th17 у пациентов в дебюте ОМЛ и у здоровых людей не отмечено [56].

Известно, что при повышении концентрации IL-17 в крови происходит стимуляция ангиогенеза, посредством активации факторов ангиогенеза (CXCL1, CXCL5, CXCL6 и CXCL8), что в свою очередь способствует росту опухоли и увеличению ее инвазивных свойств [35].

Dhodarkar К.М. с соавт. в своем исследовании продемонстрировали, что доля Th17 в костном мозге у пациентов с множественной миеломой (ММ) значительно выше, чем у пациентов с моноклональной гаммапатией неясного генеза [49]. В работе американских авторов показано, что повышенное количество Th17 у больных ММ способствовало росту клеток миеломы и дисрегуляции иммунной функции как *in vitro*, так и *in vivo* [124].

1.3.3.3 Аллогенная трансплантация гемопоэтических клеток крови и Т-хелперы 17-го типа

Реализация РТПХ происходит через активацию донорских Т-клеток, и наиболее значимыми участниками этого патологического процесса являются популяции Т-клеток: цитотоксические лимфоциты, Т-хелперы (Th1, Th2, Th9, Th17, Th22), Т-рег. Субпопуляцию Th17 стали изучать сравнительно недавно, и роль этих клеток в инициации или контроле РТПХ еще не полностью ясна [42].

Дисбаланс субпопуляций клеток Th1, Th2, Th17 приводит к развитию тяжелой РТПХ. Экспериментальные данные свидетельствуют о том, что индукция преимущественно Th1-типа иммунного ответа после алло-ТГСК чаще приводит к поражению тканей печени и слизистой желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), Th2 – ассоциирована с хрРТПХ и РТПХ с поражением легких, а Th17 – легочной и кожной формой РТПХ. В последнее время отмечено участие Th17 в РТПХ с поражением ЖКТ [38, 42, 114, 132].

Так, в работе Liu Y. и соавт. было выявлено, что процентное содержание Th17 в ПК у пациентов с оРТПХ 3-4 степени достоверно выше (при этом уровень Т-рег значительно ниже), по сравнению с пациентами, с 1-2 степенью оРТПХ, пациентов без оРТПХ или у здоровых доноров. Так же эти исследователи показали, что относительное количество Th17 у пациентов с оРТПХ снижается после назначения иммуносупрессивной терапии (ИСТ) и регрессии РТПХ [100]. Bahr F. с соавт. при проведении исследования показал снижение абсолютного значения Th17 до 110 дня у пациентов после алло-ТГСК по сравнению с донорами, однако при исследовании относительного количества этих клеток (процент от CD3+/CD4+ клеток) достоверных различий не выявлено [17].

Bahr F. с соавт. обнаружили, что абсолютное количество Th1 и Th17 статистически выше, чем других субпопуляций Th, у пациентов после алло-ТГСК и реактивацией ЦМВ. Проведенным исследованием было выявлено снижение количества Th1 и Th17 у пациентов с бактериальной инфекцией в

ранние сроки после алло-ТГСК, однако статистически значимых отличий не зафиксировано [17].

Французскими учеными было найдено более высокое количество Th17 в биоптатах печени у пациентов с хрРТПХ печени, по сравнению с контрольной группой, которым биопсия печени проводилась из-за ожирения или других опухолей, не вовлекающих непосредственно ткань печени. При иммуногистохимическом исследовании выявлено скопление этих клеток в области портального пространства, что указывает на тесный контакт с эндотелиальными клетками и на повреждение печеночных протоков [103]. Dander с соавт. наблюдал статистически значимое повышение количества Th17 в ПК у пациентов с активной формой хрРТПХ с поражением кожи и печени по сравнению со здоровыми донорами [47].

1.3.4 Общие понятия о CD 146

Маркер CD146, известный, как молекула адгезии клеток меланомы (МСАМ или Mel-CAM, MUC18, S-Endo1, A32 антиген, HEC 19), является интегральным мембранным гликопротеином, массой 113 кД и принадлежит к суперсемейству иммуноглобулинов, участвует в процессе адгезии клеток посредством связывания с другими клетками или с внеклеточным матриксом. CD146 состоит из экстрацеллюлярного домена с характерной для иммуноглобулинов структурой (V-V-C2-C2-C2), трансмембранного домена и цитоплазматического региона. МСАМ способен преобразовывать сигналы и индуцирует фосфорилирование клеточных белков, таких как Puk2, FAK, CAS, и паксиллин [72, 135]. CD146 был открыт в 1987 г. [96]. И первоначально являлся маркером прогрессирования и метастазирования меланомы человека [72, 97]. В настоящее время определено, что CD146 присутствует на циркулирующих Т-, В-клетках и НК здоровых людей, клетках гладкой мускулатуры, шванновских

клетках, клетках нервных ганглиев, миофибробластах, клетках коры мозжечка, клетках молочных протоков, клетках эпителия бронхов и парацитовидных желез мезенхимных стромальных клетках и является обязательным антигеном клеток эндотелиальной линии [48, 54, 72]. Известно, что CD146 может быть представлен в виде двух изоформ в зависимости от наличия длинного или короткого цитоплазматического конца: МСАМ-1 и МСАМ-s [72]. Было показано, что МСАМ-1 индуцирует образование микроворсинок на лимфоцитах, увеличивает роллинг и адгезию лимфоцитов. Роллинг лимфоцитов поддерживается также и МСАМ-s. Было установлено, что для прочной адгезии требуется только МСАМ-1 [72].

Существует растворимая форма CD146 (sCD146), которая была идентифицирована в супернатанте эндотелиальных клеток и в человеческой плазме. Уровень sCD146 увеличивается при патологических состояниях, связанных с изменениями эндотелиальной функции [20, 65]. sCD146 образуется путем протеолитического отщепления мембранной формы CD146, этот процесс является Са-зависимым [65].

Vainio O. и соавт. выявили, что прочность адгезии CD146 слабее в сравнении с адгезивной активностью селектина, интегринов и других белков суперсемейства иммуноглобулинов, таких как ICAMs, VCAM-1 и PECAM-1 [154].

CD146 в настоящее время особенно привлекает внимание ученых, являясь универсальной молекулой детекции эндотелиальных клеток, а также, как следует из ряда исследований, может служить иммунофенотипическим маркером Th17 [35, 46, 62, 92].

1.3.4.1 Взаимодействие Т-хелперов 17-го типа и эндотелиальных клеток

Лейкоциты осуществляют адгезию к эндотелию в процессе иммунной реакции в ответ на повреждение ткани или инфекции. Взаимодействие лейкоцитов с эндотелием – многоэтапный процесс, состоящий из: (1) начального взаимодействия, как правило, обратимого; (2) активации клеток, участвующих во взаимодействии; (3) развития сильной, устойчивой адгезии; и (4) эмиграции. Проникновение лейкоцитов из сосуда в ткани происходит путем взаимодействия молекул адгезии лейкоцитов и эндотелиальных клеток. Молекулы адгезии участвуют в широком диапазоне физиологических процессов, в том числе межклеточном и клеточно-матриксном взаимодействиях, клеточной миграции, процессах клеточного цикла и передачи сигнала, а также формообразования во время развития и регенерации тканей. К данным молекулам адгезии относятся интегрины, селектины, кадгерины, хоминговые рецепторы лейкоцитов и адгезивные рецепторы суперсемейства иммуноглобулинов. К последним и относится белок CD146.

Первым описанным в литературе партнером для связывания CD146 является белок фактора роста нервов [145, 147], принадлежащий к семейству ламининов, адгезивных гликопротеинов, которые являются основным компонентами базальных мембран. Изучая проникновение лимфоцитов крови в мозг мышей, Flanagan К. и соавт. обнаружили, что ламинин-411 представляет собой лиганд CD146, и облегчает проникновение Т-клеток в центральную нервную систему *in vitro* [62]. Аналогичное связывание было найдено в клеточных линиях меланомы, но помимо ламинина-411, в связывании участвовал ламинин-421. Возможно не только гетерофильное связывание: CD146 – ламинин-411, но и гомофильное: CD146-CD146.

CD146 участвует также в перегруппировке актина цитоскелета. В этой связи, интересно, что на циркулирующих клетках МСАМ представлен в большей степени только на Т-клетках памяти CD45RO+. Т-клетки памяти имеют

уникальную способность мигрировать непосредственно в ткани посредством связывания с ламинином-411. Эти исследования свидетельствуют о важной роли CD146 в трансэндотелиальной миграции некоторых активированных подтипов Т-хелперов в участки воспаления. Отсюда следует вывод, что наличие экспрессии МСАМ обеспечивает уникальную способность Th17 к инфильтрации тканей [62].

Очевидно, что после аллогенной трансплантации взаимодействие Т-клеток донора и антигенов тканей хозяина происходит после их контакта с эндотелием. CD146, или МСАМ, является одной из многих универсальных молекул адгезии и межклеточного взаимодействия, которая определяется на многих клетках организма.

Анализируя вышесказанное, опираясь на патогенез острой РТПХ и литературные данные, представлялось интересным определить, а затем динамически исследовать содержание циркулирующих эндотелиальных клеток и Т-хелперов, экспрессирующих одну и ту же молекулу адгезии у больных после алло-ТГСК. Мы полагали, что вызванное предтрансплантационным кондиционированием массивное повреждение эндотелия будет способствовать экспансии Т-лимфоцитов донора (и в частности Th-17), что должно приводить к индукции острой РТПХ. Активированные Th-17 в дальнейшем будут способствовать повреждению эндотелиального слоя с нарушением межклеточного взаимодействия. Также мы предполагали, что повышенное количество Th-17 на ранних сроках после алло-ТГСК может явиться предиктором оРТПХ, а увеличение циркулирующих эндотелиальных клеток в этот момент – уже следствием этого процесса. Мы ожидали выявить и изменения в динамике ПЭК – в виде повышения этой клеточной популяции на 10-12 день после алло-ТГСК, учитывая функцию этих клеток – репарация поврежденного эндотелия. С учетом того, что ПЭК слабо экспрессируют, а и ЦЭК не экспрессируют антиген CD45, но обе популяции характеризуются наличием антигена CD34, свойственного кроветворным предшественникам, мы включили

в исследование и CD34+ клетки-предшественницы. Более того, мы не встретили в литературе результатов исследования реконституции этой популяции клеток на очень ранних сроках после алло-ТГСК.

Хотелось бы заранее отметить, что в ходе проведенной работы, мы получили совсем иные результаты.

Глава 2. Материалы и методы

2.1. Клиническая характеристика больных

В исследование включено 30 больных, которым была выполнена алло-ТГСК в отделе химиотерапии гемобластозов, депрессий кроветворения и трансплантации костного мозга ФГБУ «Национальном медицинском исследовательском центре гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Генеральный директор – академик РАН, профессор, д.м.н. Савченко В.Г., заведующая отделом – д.м.н. Паровичникова Е.Н., заведующая отделением высокодозной химиотерапии и трансплантации костного мозга – к.м.н. Кузьмина Л.А.) в 2013-2014 годах.

Кроме основной группы, в исследование была включена группа контроля (10 здоровых доноров) с целью определения референсных значений популяций клеток Th17, ЦЭК, ПЭК.

При поступлении всем включенным в исследование больным осуществляли комплексное предтрансплантационное обследование: морфологическое, (клиническая лаборатория, зав. лаб. к.м.н. Двирных В.Н.), гистологическое (патологоанатомическая лаборатория зав.лаб. проф. Ковригина А.М.) и цитогенетическое (лаборатория кариологии, зав. лаб. к.м.н. Обухова Т.Н.) исследования костного мозга. Статистическая обработка полученных результатов проводилась в информационно-аналитическом отделе под руководством к.т.н. Куликова С.М.

В исследование было включено 16 мужчин и 14 женщин с медианой возраста 36 лет (24 - 60). Наиболее частым диагнозом был острый лейкоз (ОЛ) – 24 (80%) больных (ОМЛ – 17; лимфоидный (ОЛЛ) – 7, из них 5 пациентов с Ph-положительным ОЛЛ), так же в исследование было включено 5 (17%) пациентов с хроническими миелопролиферативными заболеваниями (ХМПЗ) (Ph-

негативные – 2 больных, хронический миелолейкоз (ХМЛ) – 3 пациента, 1 (3%) пациент с миелодиспластическим синдромом (МДС) и 1 (3%) больному с множественной миеломой была проведена алло-ТГСК. Характеристика больных представлена в таблице 2.

Таблица 2. Характеристика больных, включенных в исследование.

Диагноз	n	м/ж	Возраст медиана, (разброс)	Ремиссия I/II (или Хроническая фаза ХМЛ)	Прогрессия (фаза акселерации для ХМЛ)	Стабилизация
ОМЛ	17	8/9	37, (25-60)	11/4	2	
ОЛЛ	7	4/3	35, (24-58)	5/1	1	
ХМЛ	3	1/2	51, (44-65)	2	1	
МДС	1	М	26			1
ХМПЗ	1	М	32		1	
ММ	1	М	42			1

В 53% случаев аллогенная трансплантация была выполнена от неродственного HLA-совместимого донора, 37% больным проведена родственная HLA-идентичная трансплантация, у 10% (3) больных донор был частичноссовместимый (2 пациента - неродственный донор, 1 – больной – родственный донор).

Всем больным, включенным в исследование, проводили предтрансплантационное кондиционирование по стандартным программам. В качестве миелоаблативных режимов кондиционирования использовались: циклофосфамид 120 мг/кг в сочетании с бусульфаном 16 мг/кг или тресульфаном 36 г/м²) [25, 153]. В режимах кондиционирования сниженной интенсивности использовали следующие схемы: «флударабин 180 мг/м² + бусульфан 8 мг/кг + АТГ 40 мг/кг» [71], «FLAMSA-RIC модифицированный протокол: флударабин 180 мг/м² + бусульфан 8 мг/кг + цитарабин 8 г/м² +

идарубицин 30 мг/м² +/- АТГ 40 мг/кг » [102] и «флударабин 150 мг/м² + мелфалан 140 мг/м² + кармустин 400 мг/м²».

После завершения кондиционирования всем пациентам была выполнена трансфузия гемопоэтических стволовых клеток. Среднее количество миелокариоцитов трансплантата составило $2,88 \cdot 10^8/\text{кг}$ ($1,2-3,85 \cdot 10^8/\text{кг}$). Среднее количество CD34-позитивных клеток в трансплантате составило $5,53 \cdot 10^6/\text{кг}$ ($3,5-12,6 \cdot 10^6/\text{кг}$). Одному больному была выполнена трансплантация как костномозговой взвеси, так и СКК от неродственного HLA-идентичного донора ($1,05 \cdot 10^8/\text{кг}$ и $1,6 \cdot 10^6/\text{кг}$, соответственно).

Характеристика исследуемых больных в зависимости от развития или отсутствия оРТПХ представлена в таблице 3.

Таблица 3. Развитие или отсутствие острой РТПХ.

Параметры		оРТПХ	без оРТПХ*
количество больных		10	20
Диагноз	ОМЛ	8	9
	ОЛЛ	1	6
	ХМЛ		3
	МДС		1
	ХМПЗ		1
	ММ	1	
Возраст медиана (диапазон), лет		37 (24 – 60)	34,5 (24 – 58)
Статус болезни	Ремиссия 1	5	13
	Ремиссия 2 и более	3	5
	Вне ремиссии	2	2
Родственная алло-ТГСК	HLA-совместимая	1	9
	HLA-частичносовместимая	1	0
Неродственная алло-ТГСК	HLA-совместимая	6	11
	HLA-частичносовместимая	2	0

Продолжение таблицы 3.

Параметры		ОРТПХ	без ОРТПХ*
Режим кондиционирования	Миелоаблативный	3	4
	Сниженной интенсивности	7	16
Источник трансплантата	Костный мозг	2	12
	СКК	8	7
	СКК + костный мозг	0	1
Иммуносупрессивная терапия	Стандартная	7	17
	ЦФ + ММСК	3	3

*В том числе 1 пациент с отторжением трансплантата и 1 пациент, погибший на ранних сроках после алло-ТГСК

24 больным профилактику острой реакции трансплантат против хозяина проводили по стандартным схемам. Шести пациентам проводили иммуносупрессивную терапию с использованием циклофосфамида на +3, +4 дни и введением мультипотентных мезенхимных стромальных клеток (ММСК) на момент восстановления [1]. Восемью больным со стандартными схемами ИСТ так же вводили ММСК с целью профилактики острой РТПХ. Основные режимы профилактики острой реакции трансплантат против хозяина представлены в таблице № 4.

Таблица 4. Схемы профилактики острой реакции трансплантат против хозяина (препараты, дозы, дни введения).

Схемы/ количество больных	Препараты	Доза	Дни введения	
Стандартные	«ЦСА+МТХ» (n=1)	Циклоспорин А	С -1 дня до 180 дня	
		Метотрексат (МТХ)	В +1 день	
		10 мг/м ²	В +3, +6, +11 дни	
	«АТГ+ЦСА+ММФ» (n=11)	Антитимоцитарный глобулин	10 мг/кг/сут	С -4 по -1 дни
		Циклоспорин А	3 мг/кг/сут	С -1 дня до 180 дня
Микофенолата мофетил		3 г/сут	С +1 дня до 60 дня	

Продолжение таблицы 4.

Схемы/ больных	количество	Препараты	Доза	Дни введения
Стандартные	«АТГ+ЦСА+ ММФ+МТХ» (n=10)	Антитимоцитарный глобулин	10 мг/кг/сут	С -4 по -1 дни
		Циклоспорин А	3 мг/кг/сут	С -1 дня до 180 дня
		Микофенолата мофетил	3 г/сут	С +1 дня до 60 дня
		Метотрексат	15 мг/м ²	В +1 день
		Метотрексат	10 мг/м ²	В +3, +6, +11 дни
	«АТГ + ЦСА+ ММФ + преднизолон» (n=2)	Антитимоцитарный глобулин	10 мг/кг/сут	С -4 по -1 дни
		Циклоспорин А	3 мг/кг/сут	С -1 дня до 180 дня
		Микофенолата мофетил	3 г/сут	С +1 дня до 60 дня
Преднизолон		0,5 мг/кг	С +14 дня с последующей отменой	
альтернативные	«АТГ+ЦФ» (n=5)	Антитимоцитарный глобулин	10 мг/кг/сут	С -4 по -1 дни
		Циклофосфамид	50 мг/кг/сут	В +3, +4 дни
	«ЦФ» (n=1)	Циклофосфамид	50 мг/кг/сут	В +3, +4 дни

Факт развития острой РТПХ устанавливали на основании клинической картины, результатов лабораторных исследований, морфологического исследования биоптатов пораженных органов, в течение первых 100 дней после алло-ТГСК. Тяжесть течения оРТПХ определяли в соответствии с критериями Н. Glucksberg [69]. Согласно этим критериям выделяют стадии (“stages”) и степени (“grades”). Критерии стадирования (“stages”) приведены в таблице 5.

Таблица 5. Стадии (“stages”) ОРТПХ:

Стадии (“stages”)	Кожа	Печень	Кишечник
1	Сыпь <25% тела	34,2-51,3 мкмоль/л	>500 мл/сут
2	25-50% тела	51,3-102 мкмоль/л	>1000 мл/сут
3	>50% тела	102-256 мкмоль/л	>1500 мл/сут
4	100%, эритродермия, везикулезное, буллезное поражение	>256 мкмоль/л	>1500 мл/сут, интенсивные боли в животе

Различают 4 степени тяжести ОРТПХ в зависимости от числа вовлеченных органов и степени их поражения (таблица 6) .

Таблица 6. Степени (“grades”) ОРТПХ:

Степени (“grades”)	Кожа	Печень	Кишечник
I	1-2	-	-
II	3	1	1
III	-	2-3	2-4
IV	4	4	-

Например, при изолированном поражении кожи более 50%, устанавливается 3 стадия поражения кожи, и II степень ОРТПХ кожная форма. При поражении печени (билирубин 120 мкмоль/л) и кишечника (диарея 800мл/сут), устанавливается 3 стадия поражения печени и 2 стадия поражения кишечника, что соответствует III степени ОРТПХ с поражением печени и кишечника, и т.д.

2.2 Объем исследования и временной регламент

В исследовании определяли динамику популяций циркулирующих эндотелиальных клеток, предшественников эндотелиальных клеток, Th17 и

CD34-позитивных предшественников в ПК у больных после алло-ТГСК. Эти же типы клеток исследовались у 10 здоровых доноров (в рамках предоперационной подготовки перед эксфузией костного мозга) – контрольная группа.

Забор крови проводили в большинстве случаев путем венепункции атравматической иглой, реже – из центрального венозного катетера. Кровь доставляли в лабораторию в холодных условиях, в пробирках, содержащих, ЭДТА. Исследование выполняли не позднее 3-х часов после забора крови.

Суммарно выполнено 300 исследований, число пациентов, которым выполнено исследование в конкретной точке представлено в таблице 7.

Таблица 7. Контрольные точки исследования и число пациентов после трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток, которым выполнены исследования в конкретной точке.

Популяция клеток	Число пациентов, обследованных в конкретной точке							
	«До алло-ТГСК»	«День алло-ТГСК»	День исследования после алло-ТГСК					«День развития оРТПХ»
			«+10»	«день/в»	«+30»	«+60»	«+90»	
Th17	21	0	0	18	20	22	21	7
ЦЭК	30	28	8	29	29	29	28	10
ПЭК	30	28	8	29	29	29	28	10
CD34+ предшественники	30	28	8	29	29	29	28	10

Здесь и далее «день/в» – день восстановления $Le > 1 * 10^9 / л$ (медиана 21 день).

Детекция популяций клеток осуществлялась до 90 дня после алло-ТГСК, в дальнейшем пациенты наблюдались в условиях отделения высокодозной химиотерапии и трансплантации костного мозга для оценки общего состояния, осложнений, рецидивов и выживаемости.

2.3 Методы исследования

Для выявления ЦЭК, ПЭК, Th17 и CD34-позитивных предшественников применяли метод проточной цитометрии. Исследование выполняли в лаборатории иммунофенотипирования клеток крови и костного мозга ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России (зав. к.м.н. Гальцева И.В.) на проточном цитометре FACS Canto II, Becton Dickinson. Материалом для иммунофенотипического исследования служили образцы ПК больных. Иммунофенотип исследуемых популяций клеток представлен в таблице 8.

Таблица 8. Иммунофенотип исследуемых популяций клеток

Клетки	Иммунофенотип
Эндотелиальные клетки циркулирующие предшественники	CD34+/CD45-/CD146+ CD34+/CD45dim/CD146+
CD34-позитивные предшественники	CD34+/CD45low
Th17	CD4+/CD45RO+/CD146+

Для определения перечисленных популяций клеток в ПК применяли панель моноклональных антител (МкАТ), меченных одним из флуорохромов: FITC, PE, APC-Cy7, PerCP-Cy5.5, APC. Характеристика МкАТ представлена в таблице 9.

Таблица 9. Характеристика используемых моноклональных антител

Препараты МкАТ	Клон	Класс Ig	Флуорохром	Производитель
Anti-CD4	RPA-T4	G1	APC-Cy7	BD
Anti-CD146	D1H12	G1	PerCP-Cy5.5	BD
Anti-CD45RO	UCHL1	G1	FITC	BD
Anti-CD34	2D1	G1	PE	BD
Anti-CD45	8G12	G1	FITC	BD
Anti-CD54	HA58	G1	APC	BD

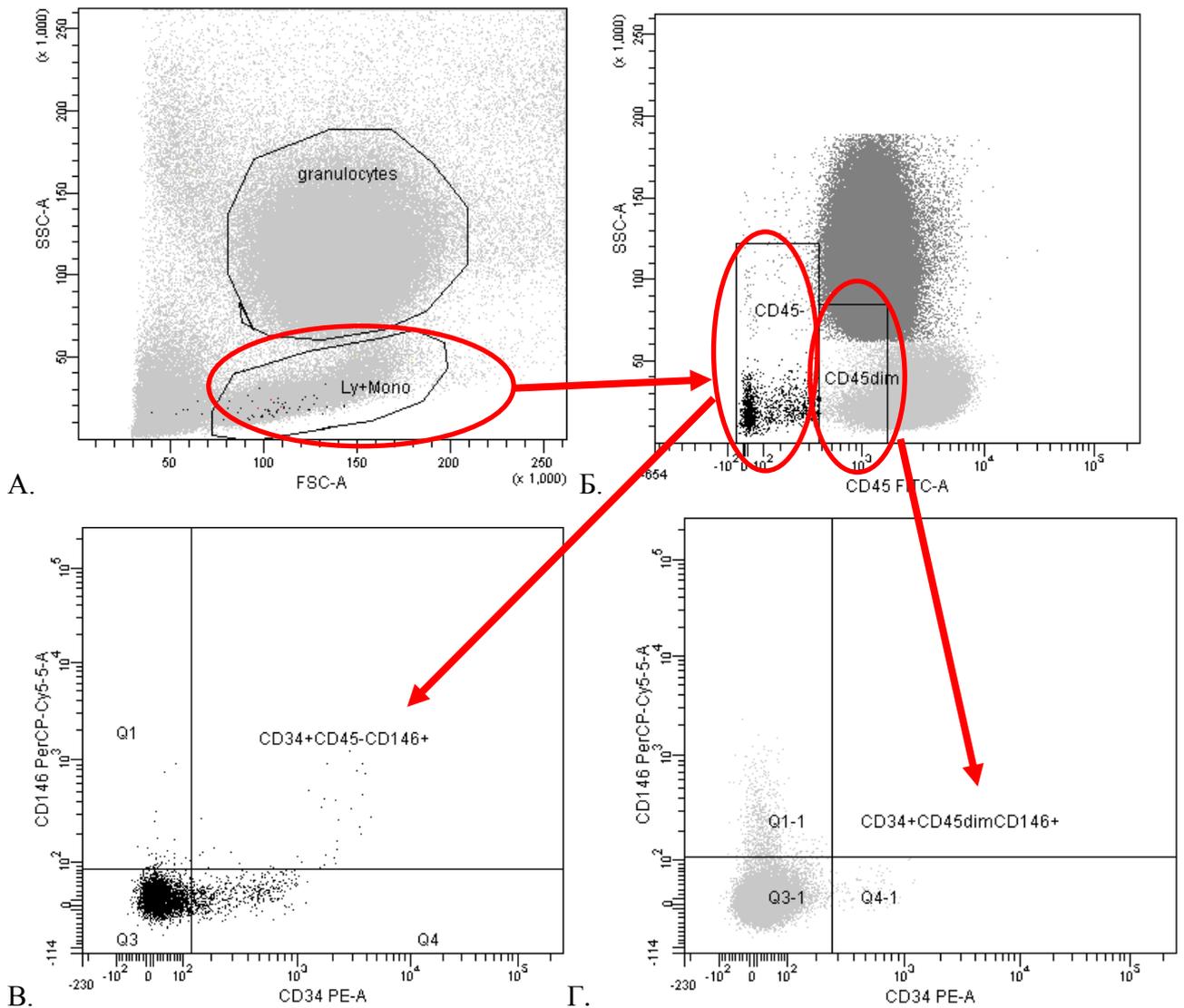
2.3.1 Метод определения циркулирующих эндотелиальных клеток, клеток-предшественников эндотелия и CD34-позитивных предшественников

Учитывая тот факт, что у пациентов в ранние сроки после трансплантации определяется глубокая цитопения, а также, что эндотелиальные клетки редко встречаются в периферической крови, для качественной оценки субпопуляций выполняли подсчет большого числа событий (1 миллион). Для исследования были взяты образцы ПК по 2 мл. Первоначально выполняли лизис эритроцитов с использованием десятикратно разведенного лизирующего раствора (FACS lysing solution) в течение 10 минут. В дальнейшем после центрифугирования в течение 3,5 минут в режиме 450 оборотов в минуту, удаляли надосадочную жидкость, добавляли 1 мл изотонического солевого фосфатного буфера (PBS, Sigma Aldrich) для отмывания образца от разрушенных клеток. Это действие проводили дважды для достижения максимальной чистоты выделения клеток. Затем выполняли окраску клеточной суспензии с помощью МкАТ по стандартному протоколу фирмы BD (МкАТ FITC-CD45, PerCP-Cy5.5-CD146, PE-CD34, APC-CD54). Далее при $t +4^{\circ}\text{C}$ в течение 20 минут в темноте происходила инкубация. Спустя 20 минут после инкубации клеточную взвесь дважды отмывали: к клеточной взвеси добавляли PBS в объеме 1 мл. Взвесь ресуспендировали и осаждали центрифугированием в течение 3,5 минут при 450 оборотов в минуту. Супернатант удаляли.

Из каждого образца просчитывали 1 миллион событий. Стратегия гейтирования ЦЭК, ПЭК и CD34-позитивных предшественников показана на рисунке 1. Для исключения из образца тромбоцитов и клеточных фрагментов использовали стандартное гейтирование по прямому и боковому светорассеянию. Учитывая, что эндотелиальные клетки большого размера, мы исследовали лимфомоноцитарный регион (см. рисунок 1А). При гейтировании по CD45 в лимфомоноцитарном регионе выделяли два типа клеток: CD45- и CD45dim (см. рисунок 1Б). В дальнейшем эти клетки гейтировали по

CD34/CD146 в качестве положительных событий (см. рисунок 1В) [152]. К ЦЭК относили события CD34+/CD45-/CD146+ (рисунок 1В) [71, 91, 115, 123], к ПЭК (рисунок 1Г) – CD34+/CD45dim/CD146+ [3, 51, 129, 152].

Для определения CD34-позитивных предшественников использовали стандартную стратегию гейтирования (представлена на рис. 1Д, 1Е, 1Ж), иммунофенотип клеток – CD34+/CD45low [21].



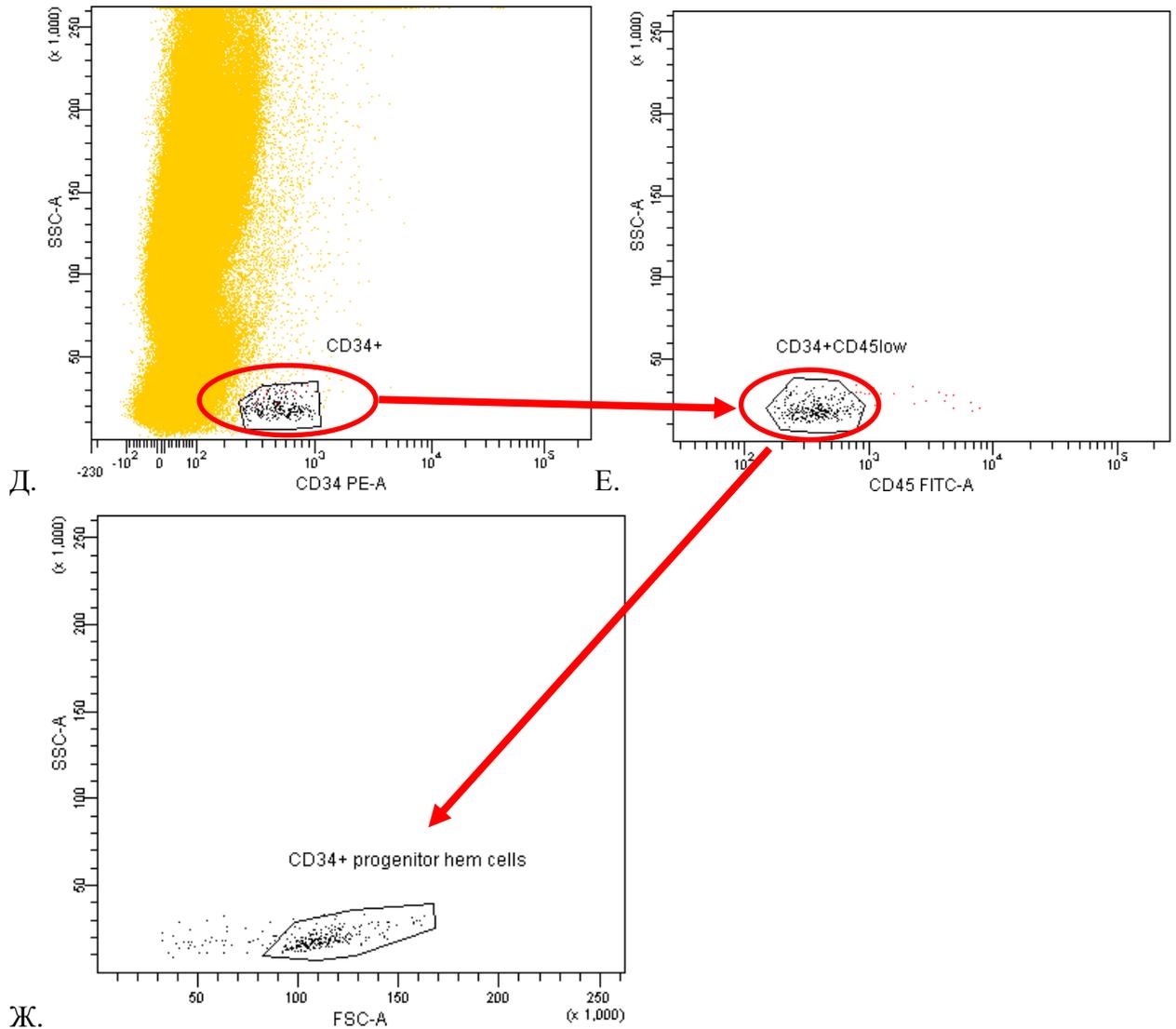


Рисунок 1. Стратегия гейтирования эндотелиальных клеток и CD34-положительных предшественников

Подсчет эндотелиальных клеток проводили по следующей формуле:

$$\frac{\text{Количество полученных эндотелиальных клеток (абсолютное количество)}}{\text{Общее количество } CD45+ \text{ событий}} = \frac{\text{количество эндот кл/л}}{Le \cdot 10^9 / \text{л}}$$

Подсчет абсолютного количества каждой субпопуляции эндотелиальных клеток выполняли с учетом данных гемограммы, полученных на автоматическом гематологическом анализаторе КХ-21N («Sysmex», Япония) в экспресс лаборатории отдела анестезиологии и реаниматологии и интенсивной терапии ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России.

2.3.2 Метод определения Т-хелперов 17-го типа

Для четкого выделения лимфомоноцитарной фракции пробоподготовка к детекции Th17 включала в себя разделение клеток в градиенте плотности согласно протоколу Miltenyi Biotec. Для этого 2 мл ПК разводили до 10 мл при помощи изотонического PBS. Далее в пробирку объемом 15 мл и содержащую 4 мл раствора фиколла (плотностью 1,077 г/см³) постепенно наслаивали разведенную суспензию клеток, после чего центрифугировали в течение 35 минут при 400g при комнатной температуре. Полученное кольцо, содержащее мононуклеарные клетки, осторожно переносили в другую пробирку также объемом 15 мл и доводили ее PBS до 10 мл. После чего клетки ресуспендировали и затем центрифугировали в течение 10 минут при 300g. Надосадочную жидкость удаляли и далее проводили окраску клеточной суспензии с помощью МкАТ по стандартному протоколу фирмы BD (МкАТ APC-Cy7-CD4, PerCP-Cy5.5-CD146, FITC –CD45RO). Далее при t +4°C в темноте происходила инкубация в течение 20 минут, затем клеточную взвесь дважды отмывали и добавляли PBS в объеме 1 мл. Взвесь ресуспендировали и осаждали центрифугированием в течение 3,5 минут при 450 оборотов в минуту. Супернатант удаляли.

В каждом образце ПК просчитывали 1 миллион событий. Для исключения из образца тромбоцитов и клеточных фрагментов использовали стандартное гейтирование по прямому и боковому светорассеянию (см. рисунок 2А). При гейтировании по CD4 выделяли фракцию CD4+ лимфоцитов (см. рисунок 2Б), в дальнейшем по прямому и боковому светорассеянию выделяли чистую фракцию CD4+ лимфоцитов (см. рисунок 2В). В дальнейшем эти клетки гейтировали по CD45RO, положительные события затем гейтировали по CD146 (см. рисунок 2Г, 2Д). К Th17 относили клетки CD4+/CD45RO+/CD146+ [35, 46, 62, 92].

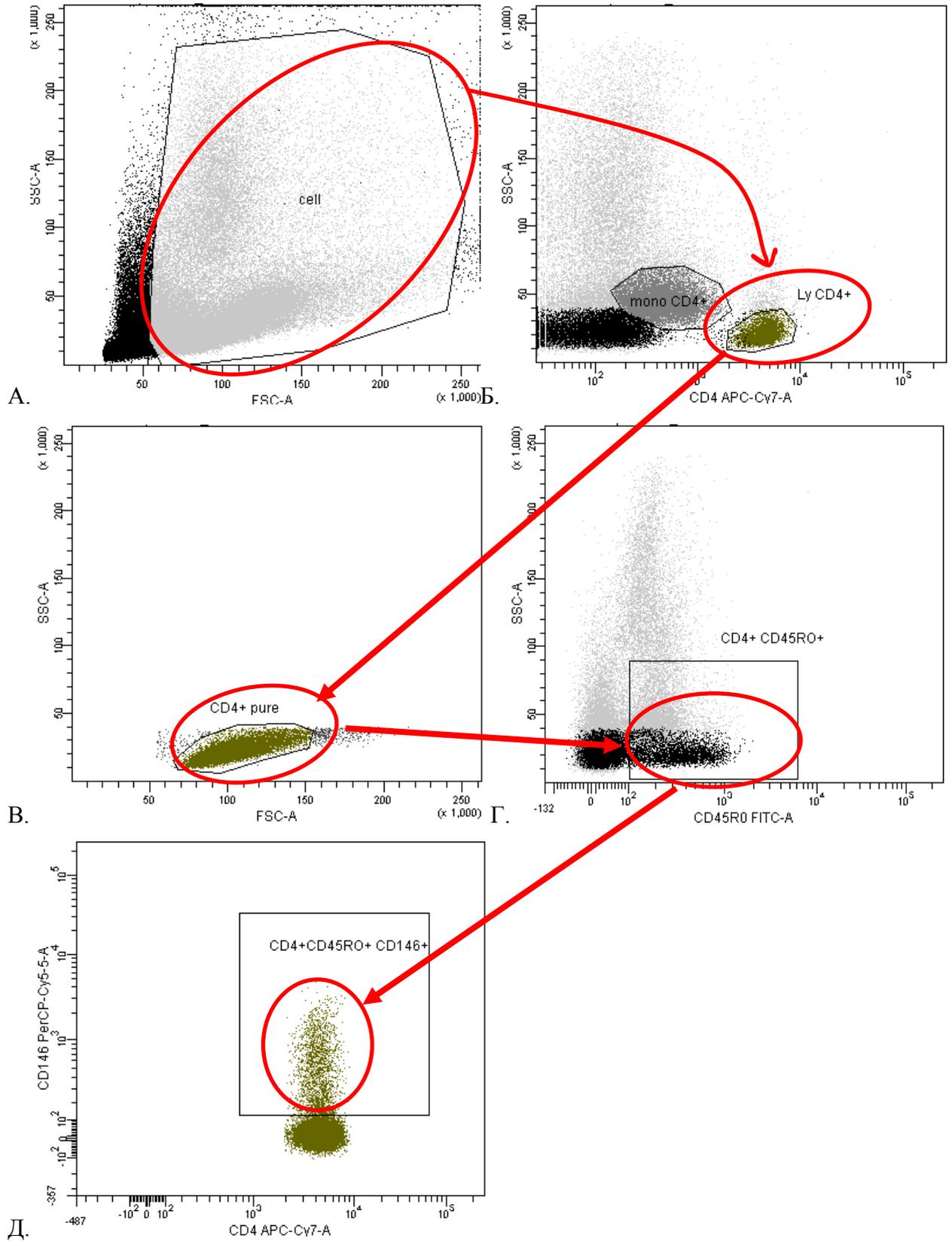


Рисунок 2. Стратегия гейтирования Th17.

Динамику популяции в данном случае оценивали в относительных значениях: доля Th17 к CD4+ клеткам, в дальнейшем по тексту эта популяция обозначается как «Th17», «Th17 клетки» или «Th 17 популяция».

Так же на этих клетках нами была оценена средняя интенсивность экспрессии (MFI) молекул MСAM, как показатель функциональной активности Th17 клеток.

2.3.3 Статистическая обработка полученных результатов

После проведенных исследований для анализа данных использовали классические методы описательной статистики, частотного, дисперсионного, регрессионного анализа, анализа повторных наблюдений и анализа выживаемости. При анализе динамики показателей в качестве предварительного этапа использовали методы графического анализа, экспертной визуальной оценки с целью генерации агрегированных характеристик динамики и советующих гипотез. В качестве производных показателей в анализе использовали в основном изменения значений исходных показателей между определенными временными точками или изменения средних значений до/после определенных событий, например, до/после развития ОРТПХ.

Также визуально на индивидуальных и усредненных по группе графиках оценивали особенности динамики показателей в группах с развитием и без развития ОРТПХ, различными видами кондиционирования и в зависимости от проводимой иммуносупрессивной терапии. Под усреднённой динамикой подразумевали, вычисленную по группе регрессионную кривую 3-порядка с доверительными интервалами (см. рисунки в приложении). Далее в каждой контрольной точке вычисляли групповые статистические характеристики – медианы и ее 95% доверительные интервалы, их наносили на соответствующие графики и для сравнения значений в группах проводили стандартный

однофакторный непараметрический анализ (с использованием критерия Вилкоксона). Использование ранговых статистик (медиана) и непараметрического дисперсионного анализа обусловлено существенной ненормальностью распределений изучаемых параметров.

Для увеличения статистической мощности выводов мы интегрировали данные нескольких контрольных точек. На основе проведенного визуально-экспертного анализа графического представления динамики формулировали гипотезы и производные агрегированные показатели, которые затем подвергались стандартному непараметрическому дисперсионному анализу (с использованием критерия Вилкоксона). Например, для каждого больного вычислялась медиана показателей до и после оРТПХ в группе с оРТПХ, в группе без оРТПХ – до и после контрольной точки, соответствующей медиане времени развития оРТПХ.

Для анализа клинического выхода использовали классические методы событийного анализа: оценки Каплана-Майера (К-М оценка), лог-ранг тест, а также ланд-марк анализ для факторов, зависящих от времени.

Для анализа зависимости между популяциями ЦЭК, ПЭК и Th17 использовали общий линейный ковариационный анализ.

Расчеты и запуск процедур анализа проводили с помощью статистического пакета SAS 9.4.

Глава 3. Результаты исследования и обсуждения

3.1 Клинические результаты

В исследование, посвященное анализу эндотелиально-Т-клеточного взаимодействия в зависимости от развития реакции трансплантата против хозяина, было включено 30 пациентов. Одна больная была исключена из анализа вероятности развития оРТПХ в связи со смертью до момента приживления трансплантата.

За время наблюдения к 100 дню у 10 больных отмечалось развитие оРТПХ; вероятность развития оРТПХ составила 33,3% (рисунок 3.).

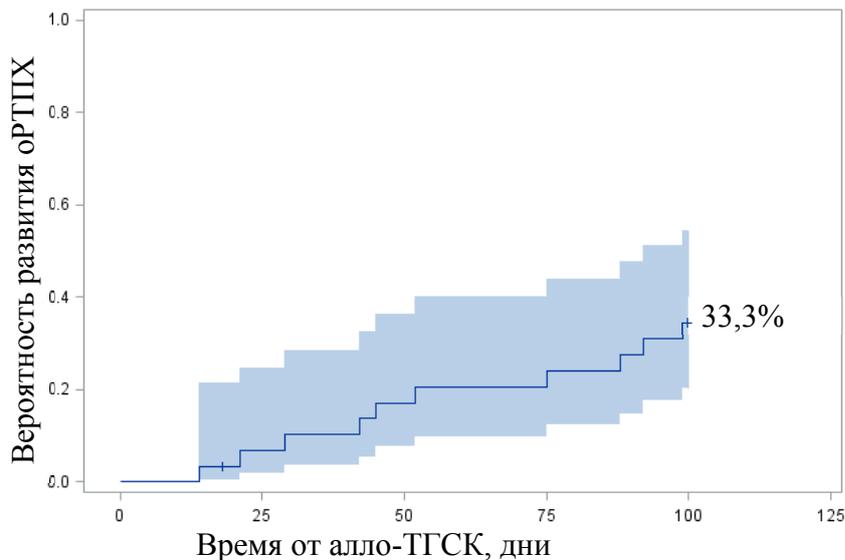


Рисунок 3. Оценка вероятности развития оРТПХ в общей группе больных (n=28) (К-М оценка с 95% доверительным интервалом).

В расчетах вероятности развития оРТПХ мы не учитывали больного с первичным неприживлением трансплантата и больную, погибшую на + 18 день после алло-ТГСК. Следует отметить, что самое раннее развитие оРТПХ было зафиксировано на +15 день после алло-ТГСК. Самая первая точка по определению клеточных популяций (ЦЭК, Th17, CD34-позитивных предшественников) после алло-ТГСК в нашем исследовании была на +10 день,

то есть в этой точке ни одного больного с развитием оРТПХ не было зарегистрировано.

Для оценки влияния оРТПХ на отдаленные результаты терапии, был проведен ланд-марк анализ выживаемости с контрольной точкой 100 дней после алло-ТГСК. Полученные нами результаты подтвердили известный факт, что наличие оРТПХ является крайне неблагоприятным фактором, влияющим на выживаемость больных ($p=0,0002$). В нашем исследовании у больных без развития оРТПХ 2-х летняя выживаемость составила 84,2%, в то время как с оРТПХ – 20% (рисунок 4). Этот факт неоднократно подтверждался многими исследователями, в том числе рабочей группой EBMT, которая при анализе 1859 пациентов ОМЛ показала, что наличие оРТПХ III-IV степени значительно влияет на общую выживаемость (4-х летняя выживаемость в группе с оРТПХ III-IV составила 43+/-4%, без оРТПХ 60+/-2%, $p<0.001$) [22].

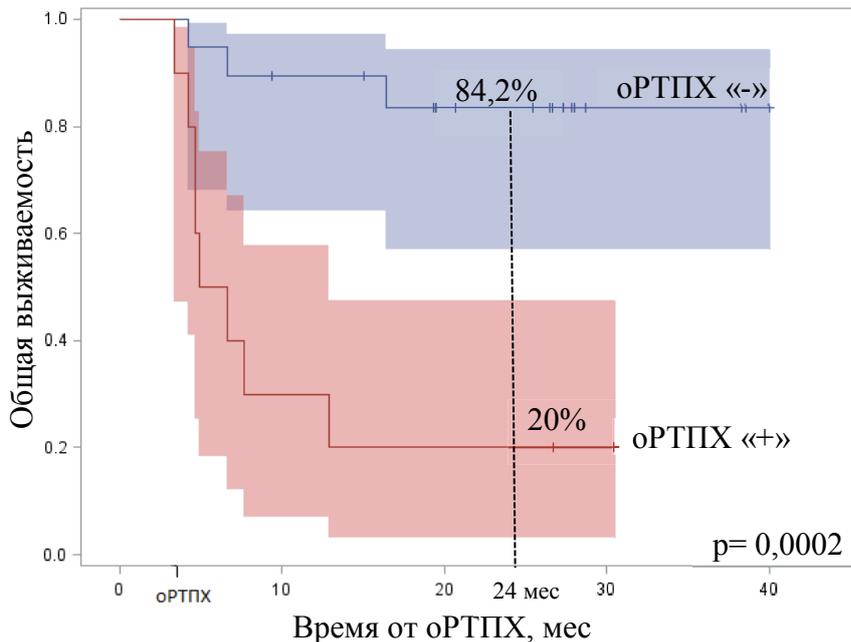


Рисунок 4. Общая выживаемость больных в зависимости от развития оРТПХ (К-М оценка с 95% доверительным интервалом).

У трех больных была констатирована III степень тяжести оРТПХ, у семи пациентов – II степень. Органами мишенями были: желудочно-кишечный тракт (ЖКТ) – у 2 человек, кожа – у 1 пациента, сочетанное поражение кожи и ЖКТ – у 6, сочетанное поражение кожи и печени – у 1 пациента. Четырём больным в

соответствии с международными критериями было констатировано рефрактерное течение оРТПХ. Вероятно, сочетание всех этих факторов (степень тяжести и рефрактерное течение РТПХ, поражение ЖКТ) и повлияли на столь низкие показатели общей выживаемости больных с оРТПХ.

Нами была оценена вероятность развития оРТПХ от различных факторов. Так зависимость развития оРТПХ от вида алло-ТГСК представлена на рисунке 5. У всех пациентов с несовместимыми трансплантациями ($n=3$) отмечалось развитие оРТПХ (100% пациентов), а также у 6 (35,3%) из 17 больных с неродственными совместимыми донорами и только у одного больного (10%) с родственной совместимой алло-ТГСК было констатировано развитие оРТПХ ($p<0,0001$).

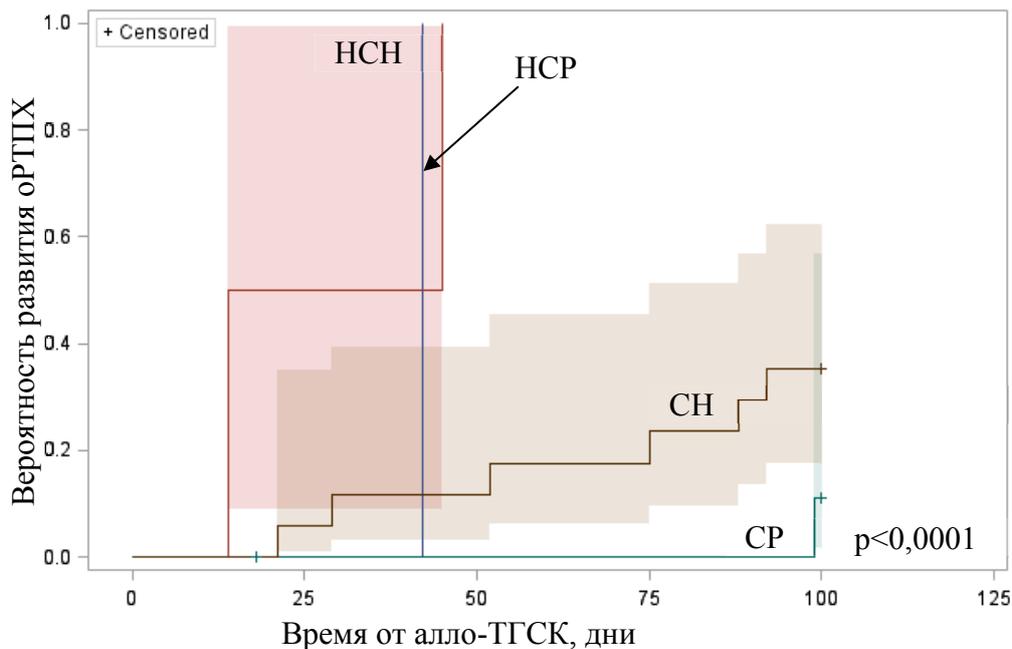


Рисунок 5. Вероятность развития оРТПХ в зависимости от вида алло-ТГСК: CR – совместимая родственная, CH – совместимая неродственная, HCR – несовместимая неродственная, HCR – несовместимая родственная (К-М оценка с 95% доверительным интервалом).

Влияние совместимости по HLA-системе на развитие оРТПХ и выживаемости производилось во многих исследованиях. В частности, крупное исследование проведенное на базе данных NMDP (Национальная программа донорства костного мозга (The National Marrow Donor Program)) с

использованием информации о 3857 пациентах, показало статистически значимое различие в вероятности развития оРТПХ у пациентов с несовместимостью с донором хотя бы по одному локусу HLA (человеческие лейкоцитарные антигены) [94]. Учитывая собственные результаты и используя данные литературы, мы предположили, что больным в группе несовместимых алло-ТГСК проведение только стандартной ИСТ недостаточно, и требуется назначение ЦФ – как дополнительного иммуносупрессивного агента. Этот подход в настоящее время активно используется в нашем центре.

Нами не было выявлено достоверных различий при анализе вероятности развития оРТПХ в зависимости от статуса перед алло-ТГСК (рисунок 6), так вероятность развития оРТПХ при первой полной ремиссии заболевания составила 27,8%, при второй и последующих ремиссиях – 37,5%, а при прогрессии/рецидиве заболевания – 50%.

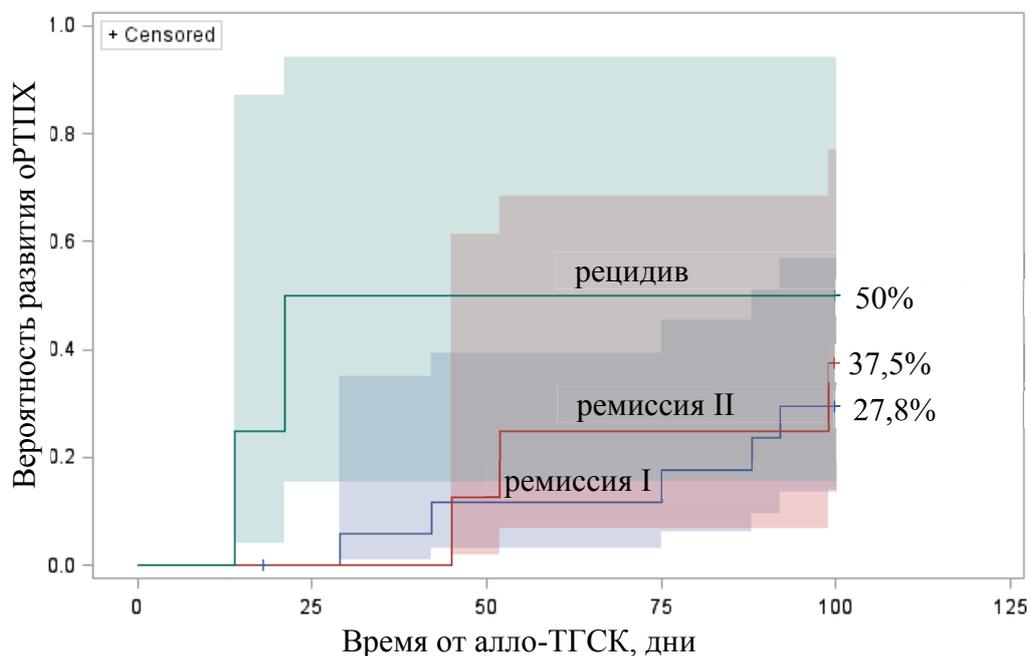


Рисунок 6. Вероятность развития оРТПХ в зависимости от статуса до алло-ТГСК (синяя линия – ремиссия I, красная линия – ремиссия II, зеленая линия – рецидив заболевания) (К-М оценка с 95% доверительным интервалом).

Вероятности развития оРТПХ была значимо выше у реципиентов СКК: 53,3%, против 13,3% ($p=0,026$) в группе, где использовался костный мозг (КМ) (рисунок 7).

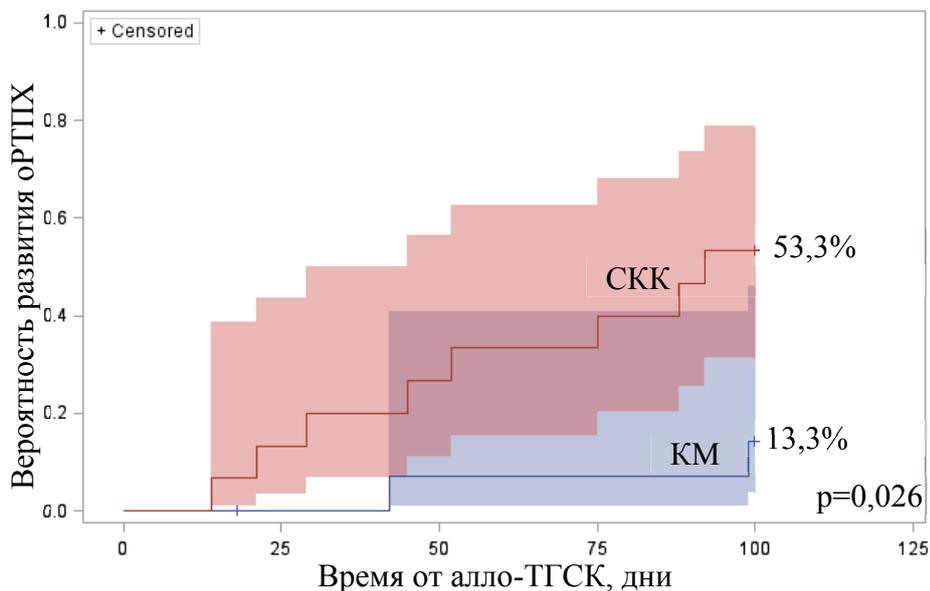


Рисунок 7. Вероятность развития оРТПХ в зависимости от источника трансплантата (К-М оценка с 95% доверительным интервалом).

Однако по нашим собственным неопубликованным данным при анализе 200 пациентов после алло-ТГСК были получены следующие результаты: у пациентов с развитием оРТПХ при аллогенной неродственной совместимой ТГСК в 81,8% использовали СКК, а у пациентов с родственной алло-ТГСК в 91,7% - КМ. Результаты недавно выполненных крупных зарубежных исследований показывают, что СКК в качестве источника трансплантата достоверно увеличивают развитие хрРТПХ, а не острой РТПХ. Так в исследовании под руководством Mary E. D. Flowers у 1022 пациентов с хрРТПХ при многофакторном анализе одним из 7 факторов, влияющих на вероятность развития хрРТПХ, было использование мобилизованных СКК, однако в этом исследовании не было выявлено достоверного влияния СКК на вероятность развития оРТПХ [63]. Также в исследовании Schmitz N. и соавт. вероятность развития хрРТПХ при использовании КМ (401 пациент) составила 45% и была

достоверно меньше, чем при использовании СКК (208 больных) – 61% ($p < 0,001$) [130].

На рисунке 8 представлена оценка вероятности общей выживаемости у всех пациентов после алло-ТГСК. 3-х летняя общая выживаемость у анализируемых больных составила 62,9%.

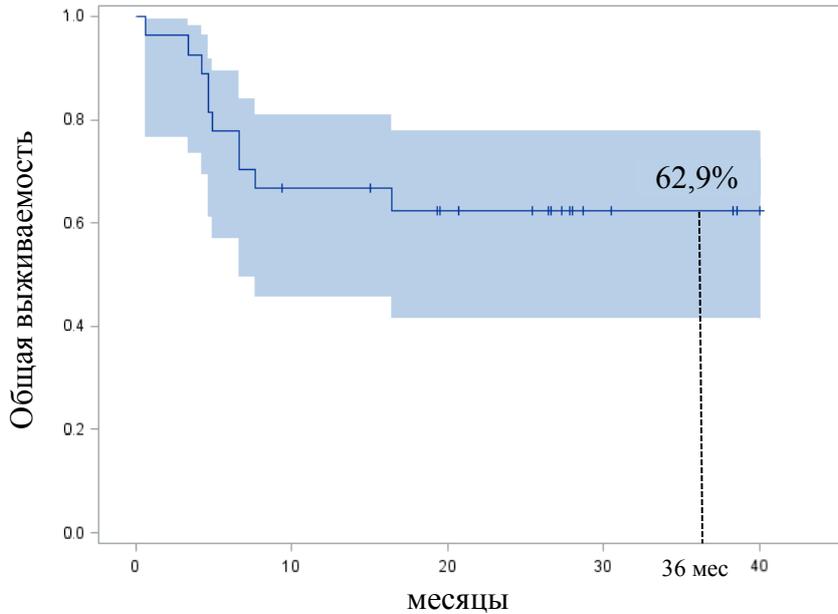


Рисунок 8. Общая выживаемость пациентов после алло-ТГСК (К-М оценка с 95% доверительным интервалом).

Так как в наше исследование были включены больные с разными гематологическими заболеваниями, было оценено влияние вариант заболевания на общую выживаемость. В виду малого количества больных с каждой нозологией мы объединили их в группы: (1) группа ОЛ (больные с ОМЛ, ОЛЛ и МДС - группа высокого риска) 25 пациентов, (2) группа – больные ХМПЗ (эту группу составили больные с Ph+ ХМЛ и Ph- ХМПЗ) – 4 пациента и один больной с ММ (рисунок 9).

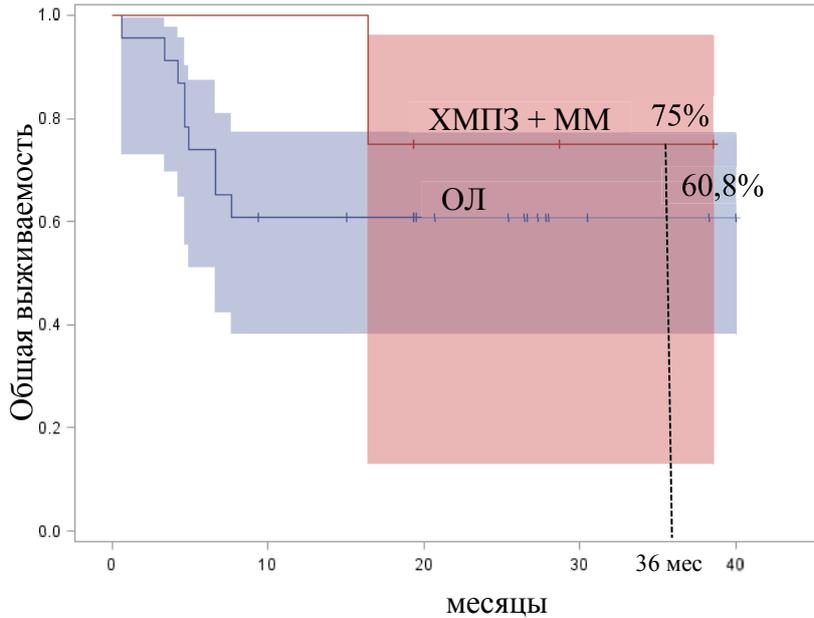


Рисунок 9. Общая выживаемость в зависимости от диагноза перед алло-ТГСК (К-М оценка с 95% доверительным интервалом).

У больных с ОЛ – общая трехлетняя выживаемость составила 60,8%, у другой группы – 75%. В то же время сравнивать полученные результаты сложно из-за малого числа больных в группах. В целом, долгосрочные результаты в описываемых группах сопоставимы с результатами крупных исследований. Так во французском исследовании в период 2000-2010 г., включающем 149 детей и молодых взрослых, 5-летняя общая выживаемость составила 64% [34].

При анализе нами не было получено статистически достоверной разницы влияния статуса заболевания перед алло-ТГСК на общую выживаемость. 16 из 25 больных ОЛ находились перед трансплантацией в первой полной ремиссии заболевания, 3 больным ТГСК была выполнена в рецидиве заболевания, 6 – во второй и последующей ремиссии болезни. 17 больным ОЛ алло-ТГСК была выполнена от неродственного донора, 8 – от родственного донора.

У двух пациентов из группы ХМПЗ перед алло-ТГСК сохранялась молекулярная ремиссия заболевания. Одной больной с 10 летним анамнезом ХМЛ алло-ТГСК выполнена на фоне 2-ой хронической фазы после применения ингибиторов тирозинкиназ 3-его поколения. Второй пациентке с ХМЛ алло-ТГСК выполнена через 1 год после диагностики заболевания, в процессе лечения

не было получено цитогенетического ответа, а также наблюдались выраженные токсические эффекты на терапии ингибиторами тирозинкиназ 1 и 2 поколения. Двое пациентов из группы ХМПЗ находились в прогрессии основного заболевания. Двум больным была выполнена алло-ТГСК от неродственного донора, двум – от родственного. В этой группе не была зарегистрирована оРТПХ, но обе пациентки с ХМЛ получали преднизолон с +14 дня согласно протоколу ИСТ, применяемому в отделении.

Одному больному ММ аллогенная ТГСК была выполнена в прогрессии заболевания, после реализации программы аутологичной ТГСК. Больному была выполнена алло-ТГСК от родственного донора, в качестве индукции толерантности использовали циклофосфамид на +3, +4 дни. Острая РТПХ 2 степени с вовлечением кожи у него была диагностирована на +98 день.

На рисунке 10 представлены результаты анализа выживаемости в зависимости от типа трансплантации.

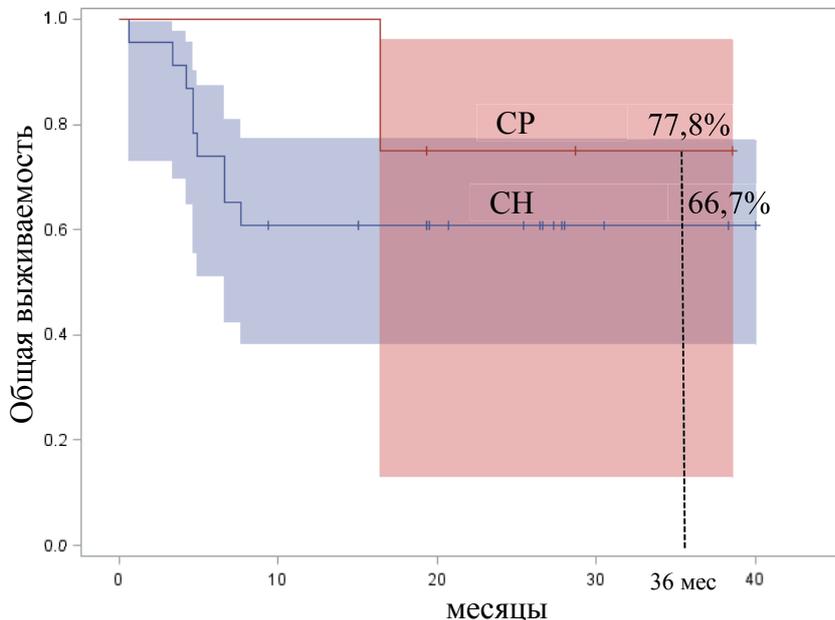


Рисунок 10. Общая выживаемость пациентов с разными видами алло-ТГСК (CR – совместимый родственный донор, CN – совместимый неродственный донор) (К-М оценка с 95% доверительным интервалом).

Наилучшая – 3-х летняя общая выживаемость была достигнута в группе HLA-совместимых родственных доноров и составила – 77,8%. 3-х летняя общая

выживаемость в группе больных с HLA-совместимым неродственным донором составила 66,7%. Эти различия были статистически не достоверны. Трое больных с несовместимым как неродственным, так и родственным донором погибли в посттрансплантационном периоде, не пережив и года после алло-ТГСК. Причинами смерти явились: рецидив заболевания, некупирующаяся бактериальная инфекция и резистентная форма ОРТПХ.

В данной работе произведена оценка зависимости общей выживаемости от источника трансплантата: 3-х летняя общая выживаемость пациентов, которым была выполнена трансплантация костного мозга, составила 78,5%, а у тех, кому в качестве источника трансплантата использовались СКК, – 46,5% (рисунок 11), но эти различия были статистически не достоверны.

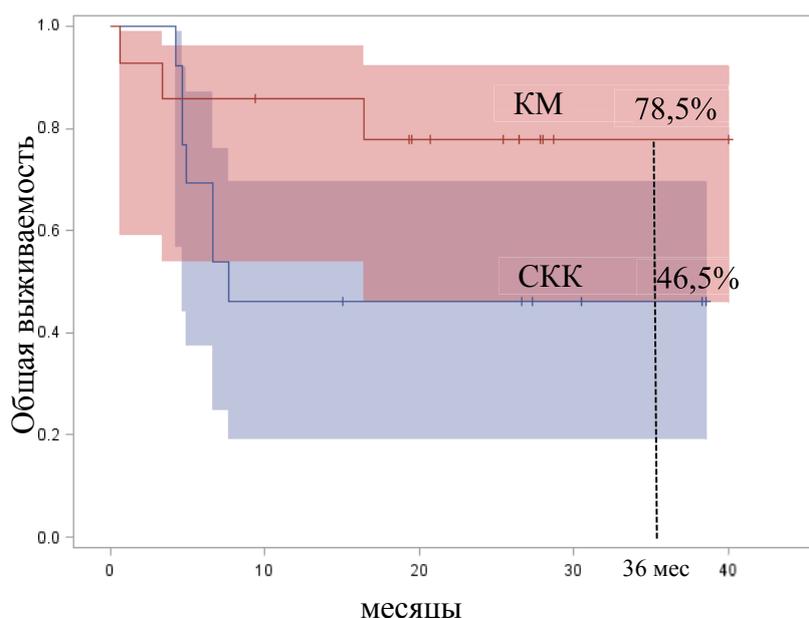


Рисунок 11. Общая выживаемость в зависимости от источника трансплантата К-М оценка с 95% доверительным интервалом).

Ввиду небольшого количества наблюдений не было выявлено достоверных различий в общей выживаемости среди пациентов с разным статусом перед алло-ТГСК (ремиссия I, ремиссия II+, прогрессия/рецидив). Также не было выявлено достоверных различий в выживаемости больных в зависимости от проведения стандартной иммуносупрессивной терапии или введения ЦФ с целью индукции толерантности (однако число больных, кому

вводили ЦФ составило 6, в то время как все оставшиеся больные были со стандартной иммуносупрессивной терапией).

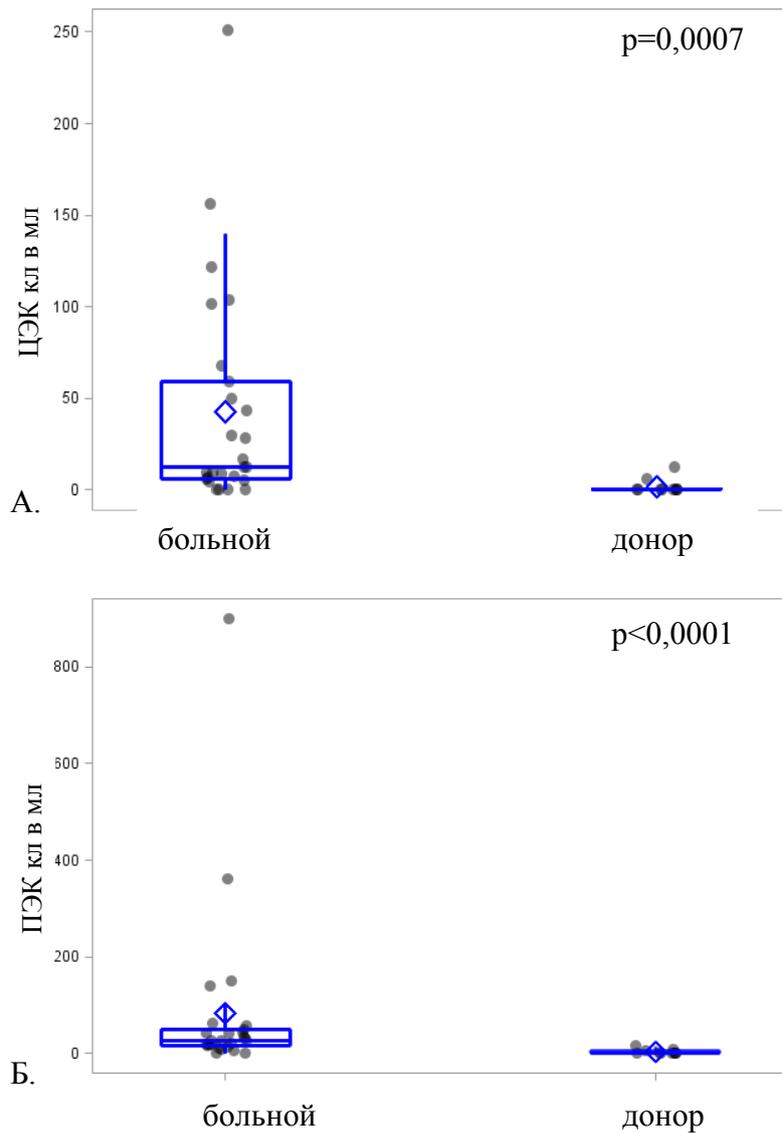
Полученные в процессе нашего исследования, результаты показывают, что вероятность развития оРТПХ составляет 33,3%. При этом 2-х летняя выживаемость пациентов, перенесших оРТПХ составляет всего 20%, и значительно отличается от тех больных, у которых не было диагностировано оРТПХ (84,2%, $p=0,0002$). По нашим данным, вероятность развития оРТПХ зависела от вида алло-ТГСК: у всех пациентов с несовместимыми донорами отмечалось развитие оРТПХ, у 35,3% с неродственными совместимыми донорами ($p<0,0001$). Опираясь на эти наблюдения, в нашем центре был модифицирован протокол ИСТ. При алло-ТГСК от несовместимых доноров к стандартной ИСТ добавили введения ЦФ в +3 и +4 дни. Также, по нашим данным, значимо влияло на развитие оРТПХ использование СКК, в качестве источника трансплантата. 3-х летняя общая выживаемость всех больных, включенных в исследование, составила 62,9%. Статистический анализ не выявил значимого влияния на 3-х летнюю выживаемость разных видов источника трансплантата, варианта диагноза, вида алло-ТГСК.

3.2 Количество ЦЭК, ПЭК, доля Т-хелперов 17-го типа в популяции CD4+ и интенсивность экспрессии МСАМ на Th17, процентное содержание CD34-позитивных предшественников в ПК у больных до алло-ТГСК и доноров

Нами было выполнено сравнение значений ЦЭК, ПЭК, Th17 и экспрессии МСАМ на Th17 у доноров и у больных в ремиссии заболеваний до проведения алло-ТГСК. Целью этого сравнения было, не только оценить эти клеточные популяции у пациентов, по сравнению с результатами, полученными в

популяции здоровых доноров, но и в дальнейшей рассмотреть динамические изменения после алло-ТГСК.

В исследовании выявлены статистически достоверные различия у больных и доноров в значениях ЦЭК, ПЭК и средней интенсивности экспрессии МСАМ на поверхности Th17 клеток (рисунок 12).



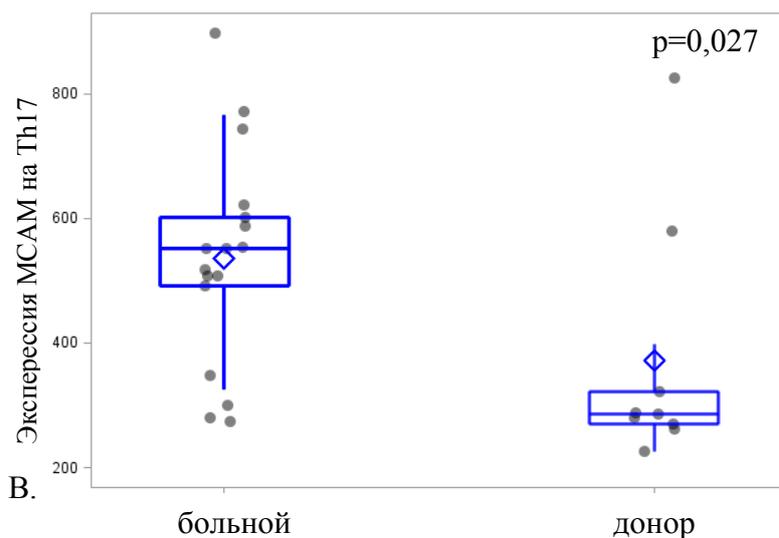


Рисунок 12. Графики значений ЦЭК (А), ПЭК (Б) и экспрессии MSAM на поверхности клеток Th17 (В) у пациентов перед алло-ТГСК и доноров КМ.

Ожидаемым результатом явилось обнаружение большего количества эндотелиальных клеток у больных, учитывая проведение курсов химиотерапии, что привело к значительному эндотелиальному повреждению (медиана ЦЭК у больных составила 42,7 кл/мл, у здоровых доноров 1,8 кл/мл, ПЭК у пациентов 81,7 кл/мл, ПЭК у доноров 2,9 кл/мл). Полученные данные подтверждаются различными исследованиями, не только у больных после химиотерапевтического воздействия, но и у больных с заболеваниями сосудистой стенки, при которых повреждение эндотелия является основным звеном патогенеза заболеваний [70, 104]. При этом, по данным разных источников, количество эндотелиальных клеток у здоровых добровольцев может быть в десятки, а иногда и в тысячи раз меньше. Так, например, Mancuso P. с соавт. определил, что количество ЦЭК и ПЭК у здоровых доноров ($n = 37$) было $140 \pm 171/мл$ и $181 \pm 167/мл$, соответственно, в то время как у пациентов с разными видами солидных опухолей ($n = 78$) это количество составило $951 \pm 1876/мл$ и $429 \pm 507/мл$, результаты были достоверны ($p < 0,0001$ и $p = 0,00019$, соответственно) [104].

Достоверных различий в относительном количестве Th17 клеток и CD34-позитивных предшественников у пациентов и доноров не выявлено (рисунок 13).

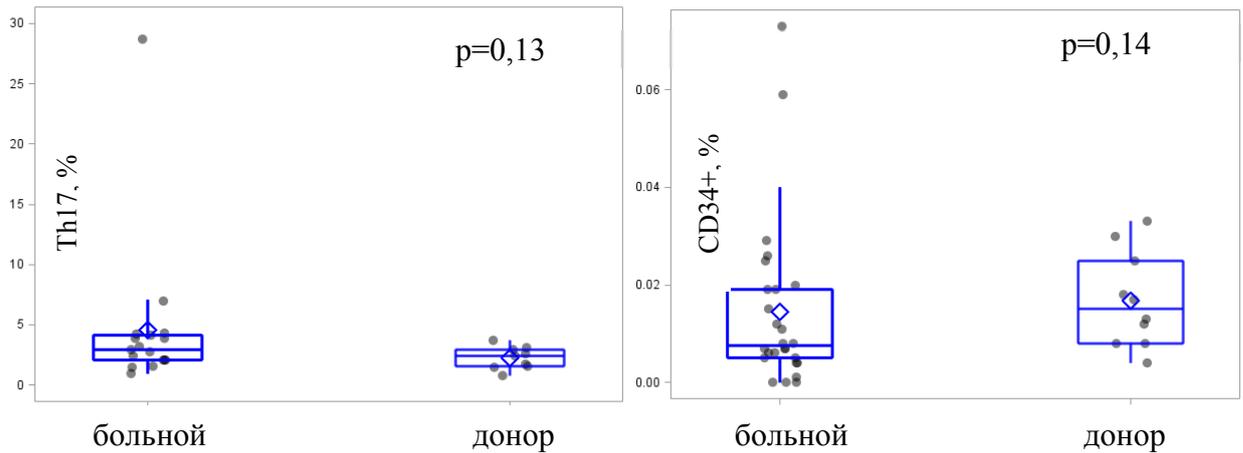


Рисунок 13. Графики значений Th17 и CD34-позитивных предшественников у пациентов перед алло-ТГСК и доноров КМ.

В ряде публикаций, повышенное количество Th17 клеток рассматривали как ответную реакцию на воспаление, перенесенные ранее вирусные и бактериальные инфекции [37, 69, 124]. В нашем исследовании образцы крови взяты перед алло-ТГСК при отсутствии инфекционных осложнений, в период «благополучия». Следует отметить, что интенсивность экспрессии МСАМ на поверхности Th17 клеток у пациентов была значимо выше, чем у доноров. Мы предполагаем, что именно интенсивность экспрессии МСАМ является показателем эффекторной функции этих клеток – способности мигрировать в места воспаления. Вероятно, у пациентов вследствие ранее перенесенных осложнений интенсивность экспрессии МСАМ была выше.

3.3 Динамика популяции ЦЭК

3.3.1 Динамика популяции ЦЭК в зависимости от развития ОРТПХ

При анализе динамики средних величин (рисунок 14) было выявлено, что количество ЦЭК на + 10 день и на + 30 день у пациентов после алло-ТГСК без развития в дальнейшем ОРТПХ значительно больше, чем у больных с развитием ОРТПХ ($p=0,037$, $p=0,017$ соответственно).

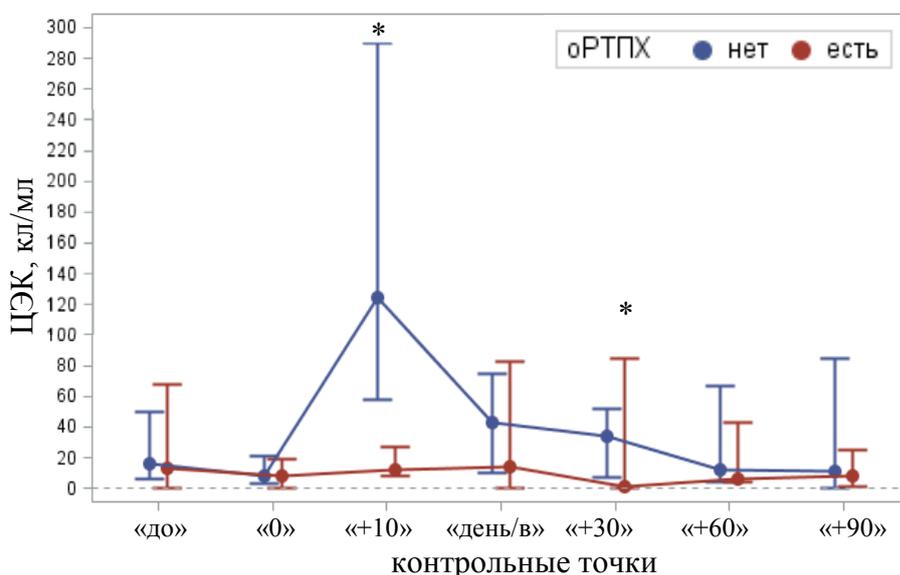


Рисунок 14. Динамика ЦЭК у пациентов после алло-ТГСК в зависимости от развития ОРТПХ. По вертикальной оси отложены медианы с 95% доверительными интервалами, по горизонтальной контрольные временные точки. Знаком «*» обозначены статистически достоверные различия.

Эти результаты показали нам интересными, так как, опираясь на данные литературы, указывающие на массивное повреждение эндотелия, как одно из главных звеньев патогенеза ОРТПХ, можно было предположить более значимое количество ЦЭК у больных с развитием ОРТПХ. Например, Yan Z. с соавт. на мышинных моделях показал, что при восстановлении донорских Т-клеток у мышей, которым не проводили иммуносупрессивную терапию, отмечались признаки ОРТПХ, при этом отмечалось значимое повышение количества ЦЭК,

по сравнению с мышами, которые получали иммуносупрессивную терапию и были без признаков оРТПХ [169]. Также Almicì С. с соавт. было выявлено, что у пациентов в день диагностики оРТПХ отмечался значимый прирост количества ЦЭК, по сравнению с днем восстановления в группах с оРТПХ и без оРТПХ. Стоит отметить, что наибольшее значение ЦЭК было у пациентов с I степенью оРТПХ, а наименьшее с III степенью (в исследовании не было пациентов с IV степенью оРТПХ) [13, 14].

Схожие данные с нашими результатами были описаны и Weije N. с соавт., ими было обнаружено пониженное содержание ЦЭК у пациентов с оРТПХ на сроке +3 мес. после алло-ТГСК (другие точки после алло-ТГСК не исследовались). Авторы объясняют это тем, что прямой иммунный ответ в виде оРТПХ, обуславливает уменьшение количества ЦЭК, как клеток эндотелия реципиента. Другое объяснение этого факта, которое предлагают авторы, связано с массивным эндотелиальным повреждением, при котором от ЦЭК остаются только клеточные фрагменты, которые по критериям проточной цитофлуориметрии не учитываются. Так же интересным в этом исследовании представляется то, что у пациентов и с хрРТПХ на срок +6 и + 12 месяцев после алло-ТГСК количество ЦЭК было значимо ниже, чем у пациентов без хрРТПХ [26].

Однако наше исследование было выполнено в значительно более ранние сроки после алло-ТГСК, и мы не исключаем иной механизм: возможно, большое количество ЦЭК в периферической крови на ранних сроках после алло-ТГСК ведет к избыточной антигенной стимуляции Т-клеток и индуцирует тем самым иммунологическую толерантность, что клинически выражается в отсутствии оРТПХ. Хотелось бы отметить, что данные группы не были не сбалансированы по режимам кондиционирования.

В индивидуальных динамических кривых и усреднённой динамике (регрессионной кривой) выявлены схожие изменения: значимость различия

составила 0,037, и 0,017 в днях измерения +10, +30 дни соответственно (рисунок 15 в Приложении).

3.3.2 Динамика популяции ЦЭК в зависимости от вида предтрансплантационного кондиционирования

Анализ динамики ЦЭК в зависимости от вида предтрансплантационного кондиционирования подтвердил факт того, что у пациентов с миелоаблативным вариантом кондиционирования на протяжении всего времени наблюдения отмечаются большие значения ЦЭК, чем у больных с режимами кондиционирования сниженной интенсивности (рисунок 16).

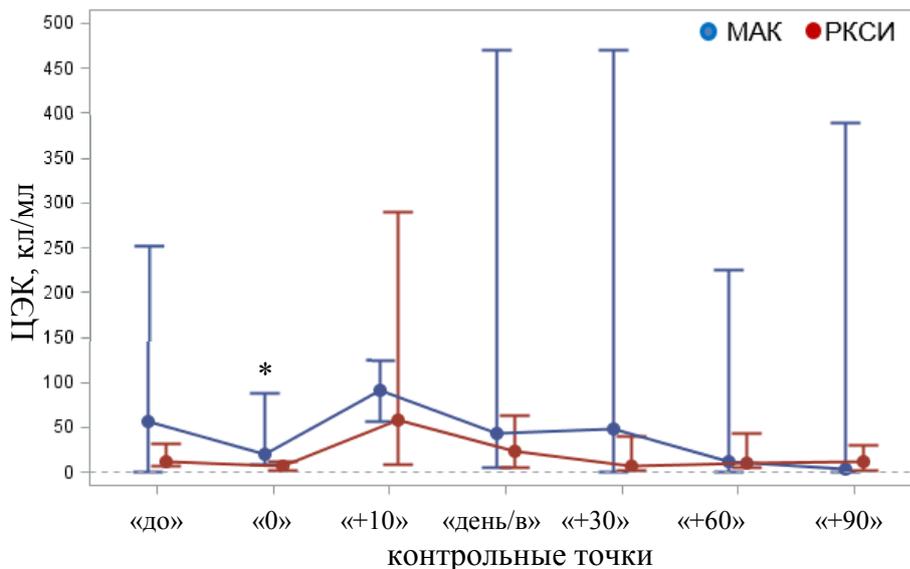


Рисунок 16. Динамика ЦЭК у пациентов после алло-ТГСК в зависимости от вида предтрансплантационного кондиционирования. По вертикальной оси отложены медианы с 95% доверительными интервалами, по горизонтальной — контрольные временные точки. Знаком «*» обозначены статистически достоверные различия.

Однако достоверные различия определялись только в день алло-ТГСК ($p=0,026$), непосредственно после проведения предтрансплантационного кондиционирования. Полученные нами результаты сопоставимы с известными данными, представленными в работе Woywodt A.: в день 0 алло-ТГСК у

пациентов с МАК было выявлено 44 кл/мл, а у пациентов с режимом кондиционирования сниженной интенсивности (РКСИ) – 24 кл/мл [163]. Это также не противоречит данным и других исследователей. В работе Weije N. с соавт. значимое повышение количества ЦЭК было выявлено на +30 день после алло-ТГСК у пациентов с МАК-режимом по сравнению с больными, получившими РКСИ, но в этом исследовании в день 0 количество ЦЭК не измеряли [26]. По нашим данным медиана количества клеток у пациентов в день 0 алло-ТГСК после МАК-режима составила 19 кл/мл, а после РКСИ – 7 кл/мл.

Эти же данные подтверждены и другим статистическим методом: анализом индивидуальных графиков и усреднённой динамике регрессионной кривой (рисунок 17 в Приложении) достоверное различие определяется только в день 0 алло-ТГСК ($p=0,026$).

3.3.3 Динамика популяции ЦЭК в зависимости от вида иммуносупрессивной терапии

Достоверных изменений в динамике ЦЭК в зависимости от вида иммуносупрессивной терапии как при анализе средних величин, так и в индивидуальных графиках и усреднённой динамике регрессионной кривой не выявлено (рисунок 18 А, Б в Приложении).

Almici C. с соавт. при исследовании крови 90 пациентов после алло-ТГСК также не выявил различий в динамике ЦЭК при использовании различных иммуносупрессивных агентов, группами сравнения в этом исследовании были пациенты с ИСТ: ЦСА+ метотрексат (МТХ) и ЦСА+ микофенолата мофетил (ММФ) [13]. В нашем же исследовании сравнивались пациенты со стандартной ИСТ и ЦФ в монорежиме. При этом у пациентов со стандартной ИСТ отмечались большие значения медианы ЦЭК на момент восстановления показателей, +30, +60 дни, однако без достоверных различий (рисунок 18 А, Б в Приложении). В

литературе отсутствуют исследования, посвященные подсчету ЦЭК после алло-ТГСК у пациентов с использованием ЦФ на +3, +4 дни в качестве иммуносупрессивной терапии.

Таким образом, заключая эту главу, у пациентов с ОРТПХ выявлено сниженное содержание ЦЭК на +10 день, день восстановления кроветворения и +30 день после алло-ТГСК (достоверные различия получены только на +10 и +30 дни), что, вероятно, связано либо с прямым иммунным ответом против ЦЭК у пациентов с ОРТПХ, либо с избыточной антигенной стимуляцией Т-клеток у пациентов без ОРТПХ, что приводит в дальнейшем к иммунологической толерантности. Также выявлено статистически значимое увеличение количества ЦЭК в день 0 алло-ТГСК у больных, получивших миелоаблативный режим кондиционирования.

3.4. Динамика популяции ПЭК

При исследовании динамики ПЭК в зависимости от развития ОРТПХ (рисунок 19 А, Б в Приложении), от вида предтрансплантационного кондиционирования (рисунок 20 А, Б в Приложении) и от вида иммуносупрессивной терапии (рисунок 21 А, Б в Приложении) статистически достоверных различий получено не было, мы связываем это с тем, что данный набор антител недостаточен для проведения детекции этих клеток, и вероятно окрашивание анти-CD133 (как маркер ранних предшественников) поможет более четко детектировать эти клетки.

3.5. Динамика популяции Th17 клеток

3.5.1 Динамика популяции Th17 клеток в зависимости от развития ОРТПХ

Нами были проанализирована динамика Th17 популяции у пациентов после алло-ТГСК в зависимости от развития ОРТПХ.

На рисунок 22 изображены изменения медианы значений в группах с и без ОРТПХ и их 95% доверительные интервалы.

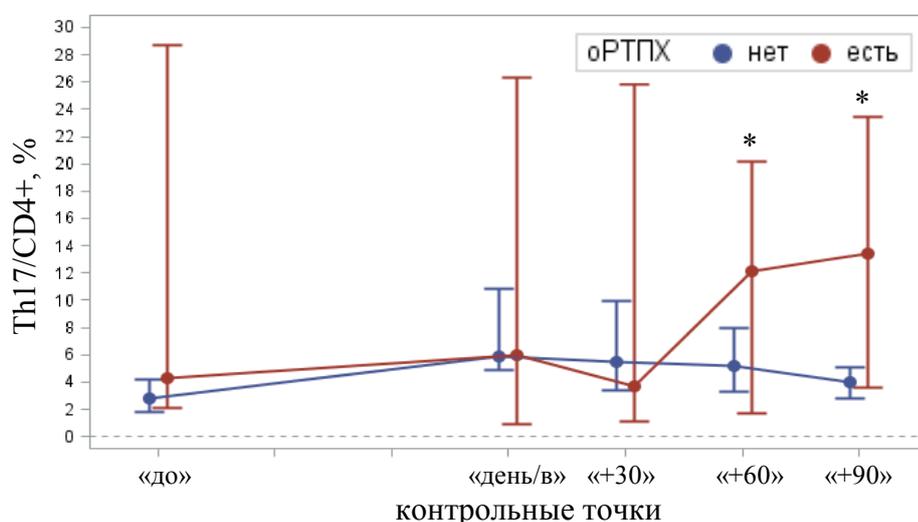


Рисунок 22. Динамика Th17 популяции у пациентов после алло-ТГСК в зависимости от развития ОРТПХ. По вертикальной оси отложены медианы с 95% доверительными интервалами, по горизонтальной — контрольные временные точки. Знаком «*» обозначены статистически достоверные различия.

Из графика на рисунке 22 видно, что у пациентов с ОРТПХ к +90 дню после алло-ТГСК отмечается значительный прирост Th17 клеток, и к +90 дню отличие в группах с и без ОРТПХ становится статистически значимой ($p=0,0062$).

Таким образом, Th17 являются участниками патогенеза ОРТПХ, что неоднократно было показано и в других исследовательских работах. Так, например, в исследовании Carlson M. с соавт. на лабораторных мышах, которым после облучения трансплантировали Th17 клетки донора, имели достоверно значимое различие в частоте развития РТПХ с поражением кожи и легких, в отличие от мышей-реципиентов общих Т-клеток или $CD4^+/CD25^-$ Т-клеток [38,

42]. Также две группы ученых независимо друг от друга на мышах показали уменьшение частоты оРТПХ в случае трансфузии Т-клеток, которые не могли продуцировать IL-17, и наоборот, увеличение частоты оРТПХ у мышей-реципиентов Т-клеток, продуцирующих IL-17 [85, 171]. Liu Y. с соавт. показал, что у пациентов в день диагностики оРТПХ III-IV степени соотношение CD4+ IL-17+ клеток к CD4+ Т-клеткам было достоверно больше (max до 4,8%), по сравнению с пациентами с оРТПХ 1-2 степени (max до 2,5%), без оРТПХ (max до 1,8%) и группой здоровых доноров (max до 1,7%) [100]. Похожие данные были получены в исследовании Dander E.с коллегами: при острой РТПХ у пациентов отмечалось повышение Th17 клеток более 4,8% по отношению к общему количеству CD4+ Т-клеток, а при хронической РТПХ – более 2,4% от CD4+ Т-клеток [47]. В соответствии с литературными данными, популяция Th17 клеток является одной из основных в реализации РТПХ с вовлечением ЖКТ [114, 132]. Необходимо отметить, что в нашем исследовании у 8 из 10 больных с оРТПХ было поражение ЖКТ, и, возможно, именно это и является объяснением столь существенных различий.

Индивидуальные графики (рисунок 23 в Приложении), демонстрируют аналогичную характерную динамику Th17 популяции. Для подтверждения гипотезы о резком увеличении Th17 популяции в момент развития оРТПХ мы рассчитали прирост медианы индивидуальных значений Th17 во временных точках до и после оРТПХ. Для сравнения с группой, где не было оРТПХ, в качестве контрольной точки мы взяли время, соответствующее медиане времени развития оРТПХ, и также проанализировали прирост уровня Th17 до и после контрольной точки.

Этот показатель прироста уровня Th17 в контрольной точке оказался статистически значимо выше у больных с оРТПХ по сравнению с больными у которых оРТПХ не было ($p=0,0022$). Таким образом, мы подтвердили не только гипотезу о существенном изменении уровня Th17 в момент оРТПХ, но и о

гипотезу о том, что это изменение значимо выше вероятного изменения уровня Th17 в сравниваемой группе (без оРТПХ).

Также была исследована динамика экспрессии молекул МСАМ, путем определения MFI CD146 на поверхности клеток Th17, в зависимости от развития оРТПХ. Средняя интенсивность экспрессии МСАМ у пациентов с диагностированной оРТПХ после +30 дня начинает увеличиваться и на +60, +90 дни существенно превосходить значения у больных в группе без оРТПХ (различия значимы, $p=0,0003$ и $p=0,0028$, соответственно (рисунок 24)).

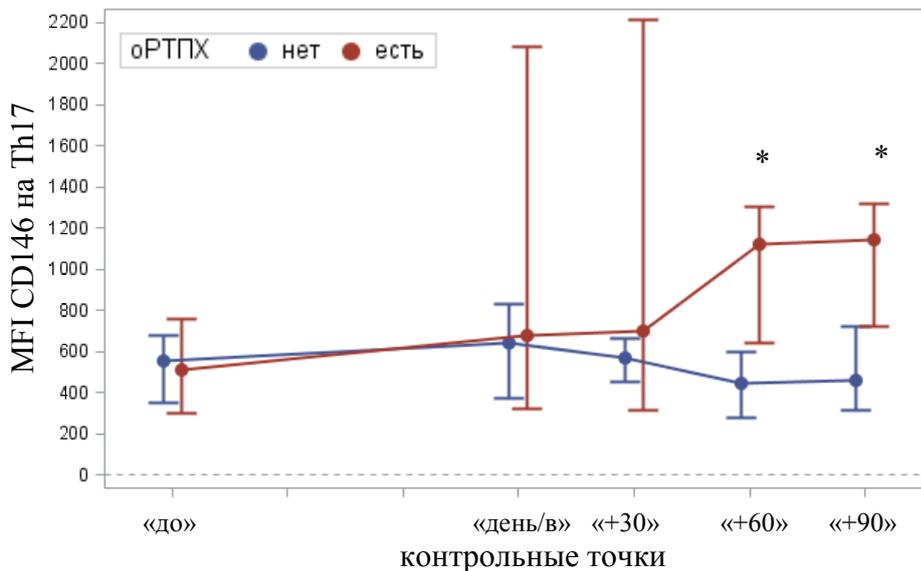


Рисунок 24. Динамика экспрессии МСАМ на поверхности Th17 у пациентов после алло-ТГСК в зависимости от развития оРТПХ. По вертикальной оси отложены медианы с 95% доверительными интервалами, по горизонтальной – контрольные временные точки. Знаком «*» обозначены статистически достоверные различия.

В индивидуальных графиках и усреднённой динамике (рисунок 25 в Приложении) при сравнении изменений медиан показателей выявлены достоверные различия прироста средней интенсивности экспрессии МСАМ на поверхности Th17 в контрольной точке у пациентов с диагностированной оРТПХ по сравнению группой, где не было оРТПХ $p=0,0016$.

Таким образом, нами было отмечено увеличение Th17 популяции, а также увеличение средней интенсивности экспрессии МСАМ на поверхности Th17 у пациентов с ОРТПХ в динамике. Это указывает, на то, что количество исследуемых Th17, не будучи предиктором ОРТПХ, является своеобразным индикатором ее интенсивности и динамики, так как эти клетки являются активными участниками аллоиммунного процесса. Эти результаты сопоставимы с исследованиями зарубежных авторов, где также были выявлены повышенные значения Th17 у пациентов с ОРТПХ [47, 100].

3.5.2 Динамика Th17 популяции в зависимости от вида иммуносупрессивной терапии

При исследовании динамики Th17 популяции в зависимости от применяемой иммуносупрессивной терапии, нами не было выявлено статистически значимых различий в контрольных временных точках. Тем не менее, максимальные значения этого показателя наблюдались у пациентов с ЦФ в монорежиме в качестве иммуносупрессивной терапии (рисунок 26).

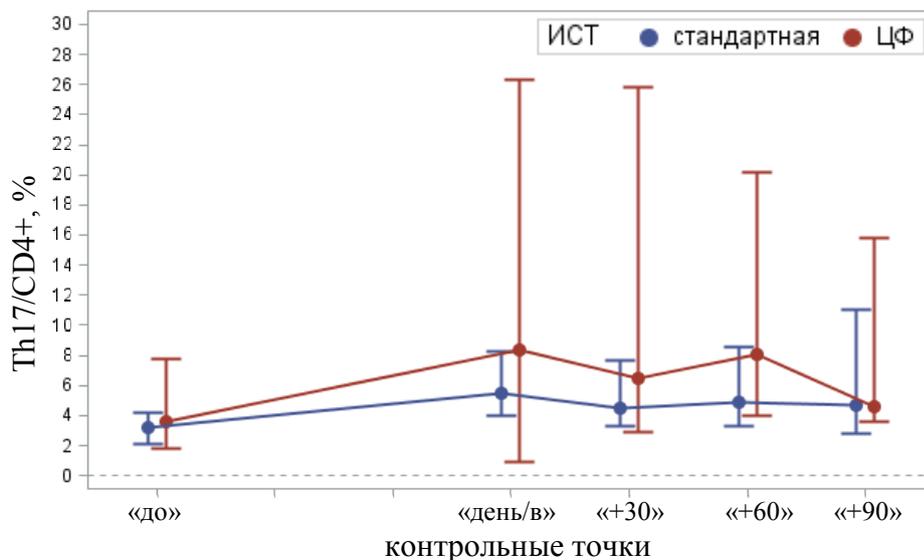


Рисунок 26. Динамики Th17 популяции у пациентов после алло-ТГСК в зависимости от иммуносупрессивной терапии. По вертикальной оси отложены медианы с 95% доверительными интервалами, по горизонтальной — контрольные временные точки.

При анализе индивидуальных графиков и усреднённой динамике регрессионной кривой Th17 популяции в зависимости от иммуносупрессивной терапии (рисунок 27 в Приложении) выявлено, что у пациентов с ЦФ в качестве ИСТ отмечался больший прирост доли этих клеток. Достоверные изменения этого прироста были зафиксированы в интервале от дня восстановления до +90 дня ($p=0,017$). Учитывая отсутствие в литературе данных о влиянии посттрансплантационного ЦФ на Th17-популяцию, нами было сделано предположение, что больший прирост этих клеток связан с отсутствием применения у больных из этой группы ЦСА и ММФ, которые блокируют пролиферацию Т-клеток. Так, Zhang С. с соавт. выявил, что добавление ЦСА в клеточную линию Th17 лимфоцитов приводит к снижению продукции ими IL-17 и тем самым снижает дифференцировку Th17 [172]. Так же Hester J. с соавт. описала, что у реципиентов почечных трансплантатов при иммуносупрессивной терапии сиролимусом+ММФ количество Th17 меньше по сравнению с пациентами, принимающими сиролимус в монорежиме [75]. Более того, von Vietinghoff S. и соавт. было показано, что микофеноловая кислота ингибирует продукцию IL-17 Т-клетками как *in vitro*, так и *in vivo* [157].

Как при анализе средних величин, так и в индивидуальных графиках MFI молекул МСАМ в зависимости от вида иммуносупрессивной терапии достоверных различий найдено не было (рисунок 28 А, Б в Приложении).

3.5.3 Динамика Th17 популяции в зависимости от предтрансплантационного кондиционирования

На рисунке 29 А, Б в Приложении показана динамика Th17-популяции в зависимости от предтрансплантационного кондиционирования: как при анализе средних величин, так и в индивидуальных графиках и усреднённой динамике достоверных различий найдено не было. Широкие доверительные интервалы

оценки медиан и отсутствие значимых отличий обусловлены малым объемом выборки.

На графике оценки средней интенсивности экспрессии МСАМ на поверхности Th17 в зависимости от предтрансплантационного кондиционирования видно, что MFI МСАМ несколько увеличена у пациентов с миелоаблативным режимом кондиционирования, однако значимое различие определяется только на момент восстановления кроветворения ($Le \geq 1 \cdot 10^9/\text{л}$) после алло-ТГСК $p=0,017$ (рисунок 30). Можно предположить, что повышенная экспрессия МСАМ на Th17 может являться показателем инфильтративной активности этих клеток в условиях массивного тканевого распада.

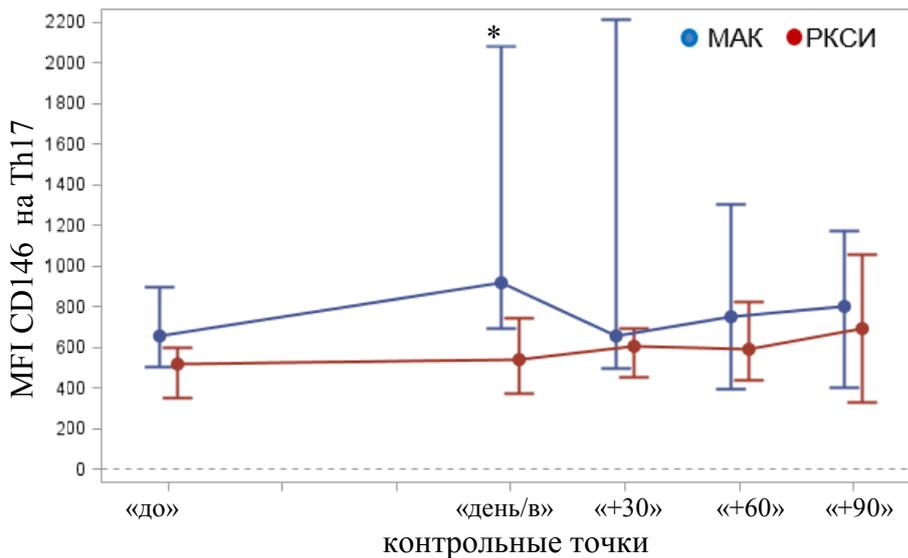


Рисунок 30. Динамика средней интенсивности экспрессии МСАМ на поверхности Th17 у пациентов после алло-ТГСК в зависимости от предтрансплантационного кондиционирования. По вертикальной оси отложены медианы с 95% доверительными интервалами, по горизонтальной контрольные временные точки. Знаком «*» обозначены статистически достоверные различия.

Аналогичная динамика средней интенсивности экспрессии МСАМ на поверхности Th17 получена в индивидуальных графиках и усреднённой динамике регрессионной кривой (рисунок 31 в Приложении).

Bahr F. с коллегами в своем исследовании не обнаружил существенных различий в реконституции Т-клеточных популяций: Th1, Th1/17, Th17 у пациентов с разными режимами кондиционирования, за исключением значимого

повышения уровня Th1 на +3 месяца после алло-ТГСК у пациентов с МАК-режимом. Авторы объясняют это тем, что клетки Th1, Th1/17 и Th17 не восстанавливаются до нормального уровня в течение первых 3 месяцев после алло-ТГСК [17].

Таким образом, в динамике Th17-популяции интересным представляется достоверный прирост этой популяции у пациентов с оРТПХ к + 90 дню ($p=0,0062$), а динамика средней интенсивности экспрессии молекул МСАМ на поверхности клеток Th17 в зависимости от развития оРТПХ увеличивается у пациентов с оРТПХ на +60, +90. Эти показатели указывают, на то, что эта популяция клеток является активным участником аллоиммунного процесса, а MFI МСАМ, указывая на инфильтративную способность клеток, является показателем активности Th17 и, вероятно, ассоциировано с рефрактерным течением оРТПХ.

3.6. Динамика популяции CD34-позитивных предшественников

3.6.1 Динамика популяции CD34-позитивных предшественников в зависимости от вида иммуносупрессивной терапии

При анализе полученных данных нами были выявлены изменения в динамике CD34-позитивных предшественников в зависимости от варианта иммуносупрессивной терапии (рисунок 32). При анализе в конкретных временных точках у пациентов со стандартной иммуносупрессивной терапией выброс этих клеток ко дню восстановления кроветворения достоверно больше, чем у пациентов с ЦФ в монорежиме ($p=0,0038$).

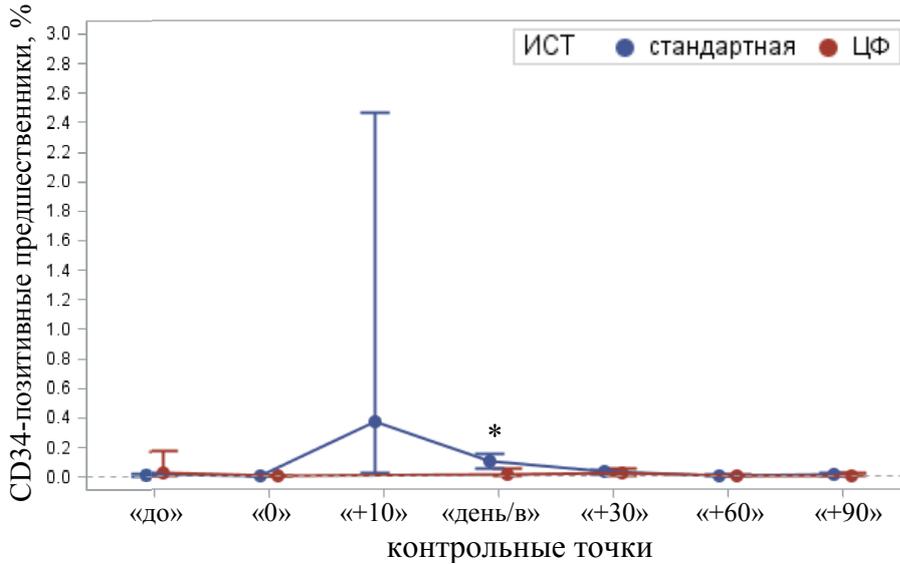


Рисунок 32. Динамики CD34-позитивных предшественников (%), у пациентов после алло-ТГСК в зависимости от иммуносупрессивной терапии. По вертикальной оси отложены медианы с 95% доверительными интервалами, по горизонтальной – контрольные временные точки. Знаком «*» обозначены статистически достоверные различия.

В литературе отсутствует информация, описывающая реконституцию CD34-позитивных предшественников после введения ЦФ. Вероятно, полученные нами результаты связаны с прямым цитостатическим воздействием ЦФ. Известно, что ЦФ не является токсическим по отношению к стволовым кроветворным клеткам, учитывая повышенное содержание внутриклеточного фермента альдегиддегидрогеназы, однако определяемые нами CD34-позитивные предшественники не являются истинными СКК [67, 151].

В индивидуальных графиках и усреднённой динамике регрессионной кривой рисунок 33 в Приложении – аналогичный прирост CD34-позитивных предшественников от дня алло-ТГСК к моменту восстановления кроветворения значимо больше у пациентов со стандартным иммуносупрессивным воздействием ($p=0,0056$).

3.6.2 Динамика популяции CD34-позитивных предшественников в зависимости от развития ОРТПХ

При анализе изменений в контрольных временных точках содержания CD34-позитивных предшественников у пациентов после алло-ТГСК в зависимости от развития ОРТПХ было выявлено, что количество этих клеток к +10 дню достоверно больше у тех больных, у которых в последующем отмечается развитие ОРТПХ, рисунок 34. ($p=0,037$).

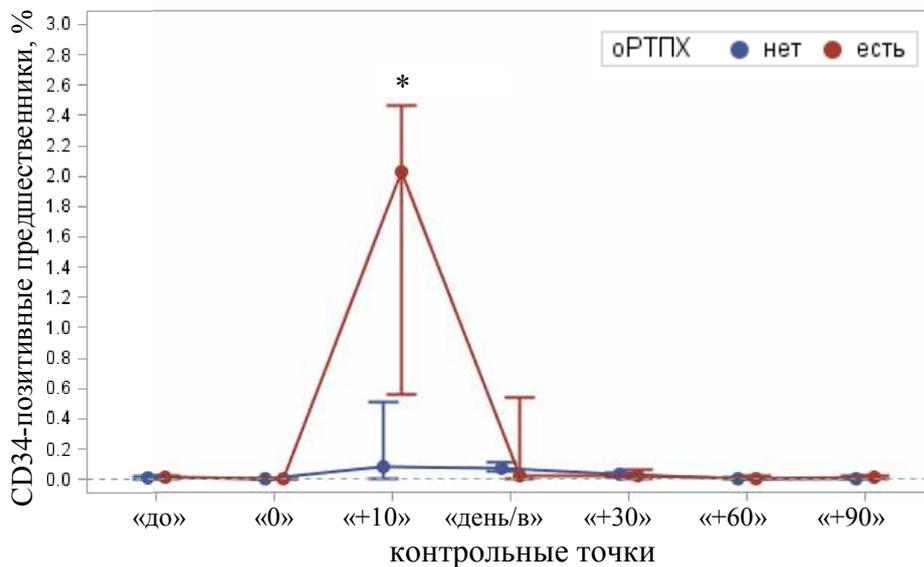


Рисунок 34. Динамика CD34-позитивных предшественников (%), у пациентов после алло-ТГСК в зависимости от развития ОРТПХ. По вертикальной оси отложены медианы с 95% доверительными интервалами, по горизонтальной — контрольные временные точки. Знаком «*» обозначены статистически достоверные различия.

Отличия получились значимыми, несмотря на то, что анализируемые группы крайне малы (в этой точке было проанализировано 8 больных: у 3 больных была диагностирована ОРТПХ, у 5 - нет). Аналогичные изменения в динамике были найдены в индивидуальных графиках и усреднённой динамике регрессионной кривой (рисунок 35 в Приложении).

Медиана относительного содержания CD34-позитивных предшественников на +10 день у пациентов с ОРТПХ составила 1,68%, в то

время как в группе без оРТПХ медиана CD34-позитивных предшественников – 0,169%. Группы не различались по источнику трансплантата, режиму кондиционирования и иммуносупрессивной терапии.

Эти изменения, вероятно, указывают на большую функциональную активность трансплантата у пациентов, у которых в будущем разовьется оРТПХ. Похожих наблюдений в литературных источниках нами найдено не было.

3.6.3 Динамика популяции CD34-позитивных предшественников в зависимости от вида предтрансплантационного кондиционирования

При анализе динамики в отдельных временных точках, а также в индивидуальных графиках CD34-позитивных предшественников у пациентов после алло-ТГСК в зависимости от вида предтрансплантационного кондиционирования достоверных отличий получено не было (рисунок 36 А, Б в Приложении).

Таким образом, проведенный анализ реконституции CD34-позитивных предшественников показал, что у пациентов со стандартной иммуносупрессивной терапией количество этих клеток в день восстановления достоверно больше, чем у пациентов, которым вводили ЦФ, что связано с прямым цитостатическим воздействием ЦФ. Также эта популяция клеток оказалась значимо больше у пациентов с оРТПХ на + 10 день.

3.7 Взаимосвязь ЦЭК и ПЭК, ЦЭК и Th17, ПЭК и Th17.

Показатели ЦЭК и ПЭК, ЦЭК и Th17 измерялись в нескольких временных контрольных точках, и поэтому для анализа их взаимодействия был использован не простой корреляционный анализ, который учитывает внутреннюю

корреляцию последовательных индивидуальных измерений, а были использованы методы общего линейного ковариационного анализа последовательных наблюдений. Для расчетов применялась процедура MIXED пакета SAS 9.4. Изучались попарные связи (ЦЭК и ПЭК, ЦЭК и Th17, ПЭК и Th17) с добавлением в регрессионную модель фактора времени, т.е. номера последовательного измерения.

Была выявлена положительная значимая корреляционная зависимость между ЦЭК и ПЭК ($R^2 = 0,25$, $p < 0,001$) (рисунок 37). Это ожидаемо, учитывая, что ПЭК – является пулом клеток, который в дальнейшем замещает поврежденный эндотелий (ЦЭК).

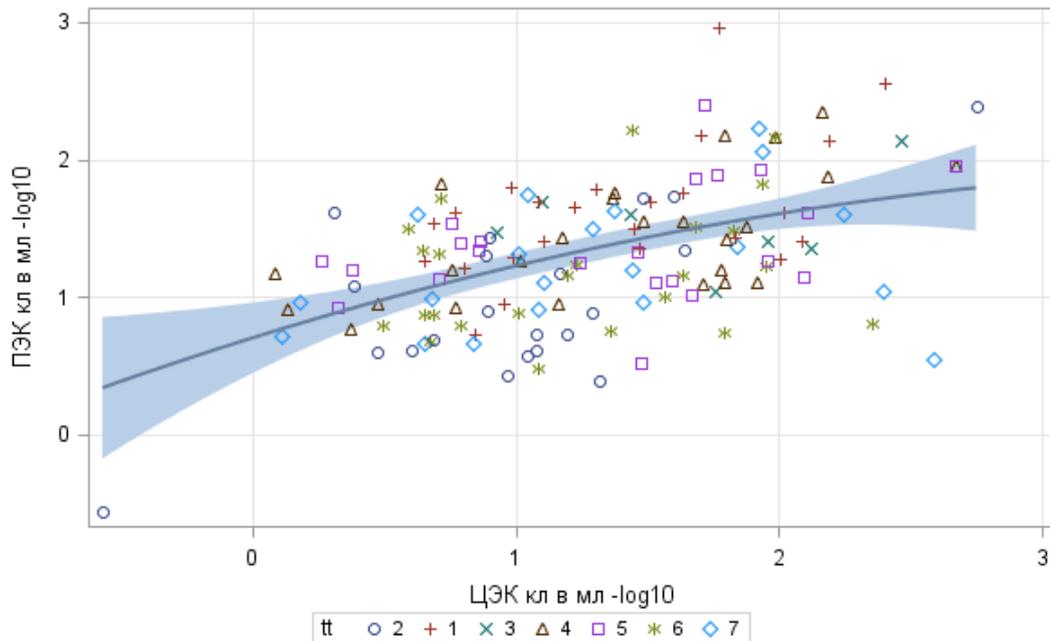


Рисунок № 37. Зависимость ЦЭК и ПЭК в разных временных точках. Общий линейный ковариационный анализ.

Сравнительная динамика достоверных различий трех популяций клеток в зависимости от развития ОРТПХ представлена в таблице 10.

Таблица 10. Изменение клеточных популяций у пациентов в группах с и без оРТПХ.

Популяции клеток	Больные	
	с оРТПХ	без оРТПХ
Th17	Прирост с +30 дня до достоверного повышения к + 90 дню по сравнению с динамикой Th17 у пациентов без оРТПХ	Не отмечено изменений в этой популяции в динамике
ЦЭК	Значимо меньшее количество ЦЭК по сравнению с больными без оРТПХ на +10, день восстановления, +30 день	Достоверное повышение на +10 день, день восстановления, + 30 день по сравнению с группой с оРТПХ ($p < 0,05$ на +10, +30 дни)
CD34-позитивные предшественники	Значимое повышение на +10 день по сравнению с показателями у больных без оРТПХ	Выявлен значимо более низкое процентное содержание CD34-позитивных клеток на +10 день по сравнению с пациентами с оРТПХ

Таким образом, у больных с оРТПХ:

1. был выявлен постепенный прирост Th17 популяции с +30 дня до +90 дня, сопровождающийся увеличением средней интенсивности экспрессии МСАМ;
2. отмечалось сниженное количество ЦЭК на +10 день, день восстановления кроветворения, на + 30 день;
3. было зафиксировано значимое повышение на +10 день содержания CD34-позитивных предшественников.

Глава 4. Заключение

В заключение нашей работы хотелось бы, прежде всего, остановиться на клинических результатах – эффективности трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток. В целом, общая выживаемость у больных, включенных в исследование, в течение 3-х лет составила 62,9%. На общую выживаемость в нашем исследовании не оказывали влияния ни источник трансплантата (КМ или СКК), ни вид нозологии, ни вид алло-ТГСК. Однако было продемонстрировано, что общую 2-х летнюю выживаемость достоверно значимо ухудшало развитие оРТПХ: 20% в сравнении с 84,2% у больных без оРТПХ ($p=0,0002$). Вероятность развития оРТПХ в исследовании составляла в среднем 33,3%. Ее развитие зависело от вида алло-ТГСК: развитие оРТПХ отмечалось у всех пациентов с частичносовместимыми трансплантациями, а у больных с неродственными совместимыми донорами – в 35,3% случаев ($p<0,0001$). Опираясь на это наблюдение, мы модифицировали протокол ИСТ для несовместимых алло-ТГСК. К стандартной ИСТ был добавлен ЦФ в дозе 50 мг/кг в +3, +4 дни после трансплантации. На развитие оРТПХ значимо влияло использование СКК в качестве источника трансплантата.

Известно, что острая РТПХ является наиболее грозным осложнением трансплантации аллогенного костного мозга, значимо снижая ее эффективность. Патогенез оРТПХ, с одной стороны – хорошо изучен, с другой стороны – остаются невыясненными многие механизмы ее развития. В начале нашей работы нами было высказано предположение, что, исследуя объем тканевого повреждения с помощью оценки количества циркулирующих эндотелиальных клеток параллельно с детекцией одной из значимых субпопуляций Т-клеточного звена иммунной системы – Т-хелперов 17-го типа (малоизученными в то время), мы сможем выявить закономерности с развитием оРТПХ. Поскольку взаимодействие Т-клеток донора и антигенов тканей хозяина, в том числе и клеток эндотелия, происходит с участием CD146 (МСАМ), являющейся одной

из универсальных молекул адгезии и межклеточного взаимодействия, которая определяется на многих клетках организма, включая активированные натуральные киллеры, часть Т- и В-клеток памяти и, что показалось важным, характеризует активированные Т-хелперы 17-го типа, представилось интересным у больных после аллогенной ТГСК выполнить динамическое исследование содержания циркулирующих эндотелиальных клеток и Т-хелперов, экспрессирующих одинаковую молекулу адгезии, и попытаться обнаружить взаимосвязь между этими популяциями у больных при развитии оРТПХ. Сведений о подобных работах в доступной литературе не было выявлено. Для исследования было выбрано несколько точек мониторинга, включая очень ранние сроки после алло-ТГСК: день 0, +10 день, день восстановления гемопоэза, +30, +60, +90 дни. Исследование клеточных популяций было выполнено с помощью метода проточной цитометрии. Следует отметить, что эта работа носила поисковый характер, так как в большинстве исследований измерения осуществляют на более поздних сроках после алло-ТГСК, начиная с +30 дня, или на момент развития оРТПХ.

Также в ходе исследования было принято решение о подсчете CD34-позитивных клеток-предшественниц на первых точках мониторинга (день 0, +10, день восстановления кроветворения, +30). Известно, что информация об изменениях этой популяции у больных после алло-ТГСК крайне скудная, а у больных, которым вводят циклофосфамид с целью профилактики оРТПХ, отсутствует.

В итоге, исследование объединило мониторинг трех клеточных популяций (ЦЭК, Th17, CD34-позитивных предшественников). Кроме того, нами было оценено влияние на динамику этих популяций, помимо острой РТПХ, таких факторов как вид иммуносупрессивной терапии и вариант режима кондиционирования.

При исследовании динамических изменений ЦЭК мы полагали, что количество ЦЭК при развитии оРТПХ должно быть значимо больше по

сравнению с теми, у кого не было оРТПХ [13, 14, 169]. Однако при анализе данных и выполнении динамического исследования этой популяции было выявлено большее количество ЦЭК у пациентов без развития оРТПХ (на + 10 день, к моменту восстановления показателей и на + 30 день), чем у больных с оРТПХ ($p=0,037$, $p=0,25$, $p=0,017$ соответственно). Аналогичные результаты были представлены в работе Weije N. с соавт., в которой было обнаружено пониженное содержание ЦЭК у пациентов с оРТПХ на срок +3 мес. после алло-ТГСК. Сниженное количество ЦЭК авторы интерпретируют как следствие прямого иммунного ответа против ЦЭК, также не исключают массивное эндотелиальное повреждение, при котором от ЦЭК остаются только клеточные фрагменты [26]. Помимо этих объяснений, затрагивающих изменения в популяции ЦЭК к третьему месяцу после алло-ТГСК, мы можем предположить, что на тех очень ранних сроках после алло-ТГСК (+10 день, день восстановления, +30 день), когда еще не сформирован иммунный ответ, у больных с массивным повреждением эндотелия избыточная антигенная стимуляция ведет к развитию толерантности (+10 день – это сроки реконституции Т-клеток), и, собственно, оРТПХ у больных не развивается.

Также у пациентов после миелоаблативного режима кондиционирования отмечалось достоверное увеличение количества ЦЭК в день алло-ТГСК ($p=0,026$) (МАК-режим 19 кл/мл, РКСИ – 7 кл/мл), что является вполне ожидаемым, поскольку, чем интенсивнее химиотерапевтическое воздействие, тем более выражено будет повреждение тканей, в том числе и эндотелия [163].

Значимых изменений ЦЭК в зависимости от варианта иммуносупрессивной терапии (стандартная ИСТ против ЦФ в монорежиме) не выявлено, однако у пациентов со стандартной ИСТ отмечались большие значения медианы ЦЭК на момент восстановления показателей, на +30, + 60 дни. Эти исследования можно назвать приоритетными, так как в литературе нами не найдено исследований, посвященных подсчету ЦЭК после алло-ТГСК у

пациентов с использованием ЦФ на +3, +4 дни в качестве иммуносупрессивной терапии.

Изменения в динамике ПЭК после алло-ТГСК не выявлены, что связано с как низкой концентрацией этих клеток и с высокой вероятностью ошибки при их определении, а также малой выборкой пациентов. В других исследованиях было отмечено повышение количества ПЭК как к моменту восстановления после алло-ТГСК, так и у пациентов с констатированной оРТПХ [5, 121, 133, 134]. Исследователи связывают это повышение с репарацией ПЭК поврежденной сосудистой стенки.

В ходе работы проанализированы данные по изменению Th17 популяции у пациентов после алло-ТГСК в зависимости от развития оРТПХ, режима кондиционирования, варианта иммуносупрессивной терапии. Было отмечено увеличение Th17 популяции у пациентов с оРТПХ (значимое различие к +90 дню), а также увеличение средней интенсивности экспрессии МСАМ на поверхности Th17 у пациентов с оРТПХ в динамике на протяжении всего периода наблюдения (значимые различия к +60, +90 дням). Неоднократно было показано, что эти клетки являются активными участниками патогенеза оРТПХ [38, 42]. В нашей и ряде других исследовательских работ было показано, что количество Th17 клеток является скорее индикатором степени тяжести оРТПХ, чем предиктором ее развития [47, 100]. Анализируя результаты нашего собственного исследования и данные, полученные рядом зарубежных авторов, мы не исключаем, что популяция Th17 клеток является одной из ключевой в реализации оРТПХ с поражением ЖКТ [114, 132]. Поражение ЖКТ в нашем исследовании было диагностировано у 8 из 10 больных.

При анализе динамики Th17 популяции в зависимости от применяемой иммуносупрессивной терапии в индивидуальных графиках и усреднённой динамике регрессионной кривой у пациентов с ЦФ в качестве ИСТ отмечался большой прирост доли этих клеток (статистически достоверное изменение зафиксировано в интервале от дня восстановления до +90 дня ($p=0,017$)). В

доступной литературе имеется крайне малое количество данных о влиянии посттрансплантационного ЦФ на Th17 популяцию. В ряде работ было лишь показано, что иммуносупрессивные агенты, такие как ЦСА, сиролимус, ММФ, ингибируют продукцию IL-17 Т-клетками как *in vitro*, так и *in vivo* [75, 157, 172]. Таким образом, мы предположили, что именно отсутствие других иммуносупрессивных агентов у больных, кому применяли ЦФ в монорежиме, явилось причиной более высоких значений Th17 популяции.

В работе не выявлено значимых изменений Th17 популяции в зависимости от предтрансплантационного кондиционирования, что во многом объясняется малым числом обследованных больных. Однако средняя интенсивность экспрессии МСАМ на поверхности Th17 была увеличена у пациентов, получивших миелоаблативный режим кондиционирования в период всего времени наблюдения, но значимые различия определялись только на момент восстановления кроветворения после алло-ТГСК. Также мы обратили внимание на то, что у пациентов с рефрактерным течением острой РТПХ (4 из 10 больных) средняя интенсивность экспрессии CD146 была выше, возможно, это отражает инфильтративную способность Th17, и этот факт может стать поводом к более раннему изменению тактики лечения оРТПХ

При анализе динамики CD34-позитивных предшественников выявлено прямое цитотоксическое действие посттрансплантационного ЦФ: у пациентов, которым применяли ЦФ, доля CD34-позитивных предшественников в день восстановления была достоверно меньше по сравнению с пациентами со стандартной иммуносупрессивной терапией ($p=0,0038$). При это средний срок восстановления при стандартной иммуносупрессивной терапии составил 20,7 дней, а при использовании ЦФ 29,5 дней. Вероятно, полученные нами результаты связаны с прямым цитотоксическим воздействием ЦФ, поскольку препараты, входящие в программу стандартной ИСТ, ингибируют пролиферацию только Т-клеток.

Хотелось бы отметить, что у пациентов с оРТПХ к + 10 дню определялось статистически достоверно большее содержание CD34-позитивных предшественников ($p=0,037$), что косвенно может указывать на активную функциональную способность трансплантата не только в восстановлении гемопоэза, но и в индукции аллореактивности.

В результате выполнения общего линейного ковариационного анализа последовательных наблюдений была выявлена положительная значимая корреляционная зависимость между ЦЭК и ПЭК. Это было ожидаемо, учитывая, что ПЭК являются пулом клеток, которые в дальнейшем замещают поврежденный эндотелий [76].

Таким образом, мы можем констатировать тот факт, что у больных с оРТПХ на +10 и + 30 дни отмечалось значительно меньшее количество ЦЭК и существенно большее содержание CD34-позитивных предшественников, значимо увеличивался динамический прирост Th17 популяции, и функциональная активность Th17 клеток была существенно выше.

В целом, выполненное нами исследование продемонстрировало разнонаправленные, малоизученные изменения в популяции, таких «ключевых игроков» оРТПХ, как Th17 клетки. Были впервые продемонстрированы отклонения в количестве CD34-позитивных предшественников при использовании ЦФ и при развитии оРТПХ. При частом временном мониторинге даже на незначительной группе больных были определены интересные закономерности. Например, значимое повышение на +10 день количества ЦЭК у больных, у которых впоследствии разовьется оРТПХ. Наверное, на этом сроке еще рано предполагать развитие прямого иммунного ответа на эти клетки. Возможно, избыточная антигенная стимуляция в момент реконституции T-клеток ведет к индукции толерантности.

Таким образом, особенностью нашей работы явились частота и совокупность измерений трех популяций клеток (циркулирующих эндотелиальных клеток, T-хелперов 17-го типа, CD34+позитивных клеток-

предшественниц), что позволило, несмотря на незначительное число обследованных больных, за счет выполнения исследований в шести временных точках, в том числе очень ранних, получить неописанные ранее результаты, относящиеся к развитию острой РТПХ.

Глава 5. Выводы

1. Установлено достоверное повышение количества циркулирующих эндотелиальных клеток в день аллогенной трансплантации у больных после миелоаблативного режима кондиционирования (19 кл/мл) в сравнении с режимом пониженной интенсивности (7 кл/мл). Достоверных изменений в динамике циркулирующих эндотелиальных клеток в зависимости от вида иммуносупрессивной терапии не получено.

2. Обнаружен достоверно больший прирост Th17-клеток от дня восстановления кроветворения до +90 дня при использовании посттрансплантационного циклофосфида по сравнению со стандартной иммуносупрессивной терапией. При этом, на момент восстановления кроветворения выявлено значимое увеличение средней интенсивности экспрессии MSAM на поверхности Th17 клеток у больных после миелоаблативного режима кондиционирования ($p=0,017$).

3. Определено, что количество CD34-позитивных предшественников значимо меньше на +30 день при использовании циклофосфида на +3, +4 дни после алло-ТГСК, при этом достоверных различий в количестве CD34-позитивных предшественников в зависимости от предтрансплантационного кондиционирования не получено.

4. Выявлено, что у больных острой РТПХ определялось достоверно более низкое количество циркулирующих эндотелиальных клеток на +10 день (12,5 кл/мл), +30 день (0,9 кл/мл) после трансплантации по сравнению с больными, у которых не было этого осложнения (124 кл/мл и 33,8 кл/мл, соответственно); значимо большее процентное содержания CD34-позитивных предшественников на +30 день (1,68%), чем у больных без оРТПХ (0,169%), а также достоверно более существенный прирост к + 90 дню доли Т-хелперов 17-го типа ($p=0,0062$) и средней интенсивности экспрессии на них молекулы MSAM.

5. 3-х летняя общая выживаемость больных в исследовании составила 62,9%, вероятность развития острой реакции трансплантат против хозяина к +100 дню достигала – 33,3%. У больных, перенесших острую РТПХ, 2-х летняя общая выживаемость была значимо ниже чем у больных без острой РТПХ – 20% и 84,2% соответственно, ($p= 0,0002$). Вероятность развития острой РТПХ была выше при трансплантациях при частичной совместимости донора и реципиента (при неродственном частично совместимом доноре – 100%, при неродственном совместимом – 35,3%, при родственном совместимом – 10%) при использовании в качестве источника трансплантата стволовых клеток крови (53,3% в сравнении с использованием костномозговой взвеси 13,3%).

Список используемых сокращений

- Алло-ТГСК – трансплантация аллогенных гемопоэтических стволовых клеток
АТГ – антиtimoцитарный глобулин
ЖКТ – желудочно-кишечный тракт
ИСТ – иммуносупрессивная терапия
КМ – костный мозг
К-М оценка – оценка Каплана-Майера
МАК – миелоаблативный режим кондиционирования
МДС – миелодиспластический синдром
МкАТ – моноклональные антитела
ММ – множественной миеломой
ММСК – мультипотентные мезенхимные стромальные клетки
ММФ – микофенолата мофетил
м-РНК – матричная рибонуклеиновая кислота
НК – натуральные киллеры
ОЛ – острый лейкоз
ОЛЛ – острый лимфобластный лейкоз
ОМЛ – острый миелобластный лейкоз
oРТПХ – острая реакция трансплантата против хозяина
ПК – периферическая кровь
ПЭК – предшественники эндотелиальных клеток
РТПХ – реакция трансплантата против хозяина
РКСИ – режим кондиционирования сниженной интенсивности
СКК – стволовые клетки крови
Т-рег – Т-регуляторные клетки
ФВ – Фактор Виллебранда
ХМЛ – хронический миелолейкоз
ХМПЗ – хроническое миелопролиферативное заболевание

хрРТПХ – хроническая реакция трансплантата против хозяина

ХТ – химиотерапия

ЦМВ – цитомегаловирус

ЦСА – циклоспорин А

ЦФ – циклофосфамид

ЦЭК – циркулирующие эндотелиальные клетки

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

CD – кластер дифференцировки

EBMT – европейское общество трансплантации крови и костного мозга European Society of Blood and Marrow Transplantation

HLA – человеческие лейкоцитарные антигены

IL – интерлейкин

МСАМ – молекула адгезии клеток меланомы

MFI – средняя интенсивность экспрессии

MTX – метотрексат

NPI – Ноттингемский прогностический индекс Nottingham Prognostic Index

Ph – филадельфийская хромосома

TGF- β – Трансформирующий фактор роста-бета

Th1 – Т-хелперы 1-го типа

Th2 – Т-хелперы 2-го типа

Th17 – Т-хелперы 17-го типа

TNF – фактор некроза опухоли

Список литературы

1. Дроков М.Ю., Паровичникова Е. Н., Кузьмина Л. А., Васильева В. А., Урнова Е. С., Троицкая В. В., Галстян Г. М., Богданов Р.Ф. Савченко.В.Г. Трансплантация аллогенного костного мозга без проведения предтрансплантационного кондиционирования с использованием циклофосфида и мезенхимальных стромальных клеток в качестве индукции толерантности / С. В. Г. Дроков М.Ю., Паровичникова Е. Н., Кузьмина Л. А., Васильева В. А., Урнова Е. С., Троицкая В. В., Галстян Г. М., Богданов Р.Ф. // Гематология и трансфузиология. – 2014. – Т. 59– 42–46с.
2. Зурочка А.В., Хайдуков С.В., Кудрявцев И.В. Ч.В.А.Проточная цитометрия в медицине и биологии / Ч. В. А. Зурочка А.В., Хайдуков С.В., Кудрявцев И.В. – , 2013.– 552с.
3. И.С. Моисеев Маркеры эндотелиальной дисфункции и микрососудистые осложнения при аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток / И.С. Моисеев – , 2013.– 88с.
4. Х.М. Марков Молекулярные механизмы дисфункции сосудистого эндотелия / Х.М. Марков // Кардиология – 2005. – Т. 12– 62–72с.
5. Червонцева А.М. Повреждение сосудистого эндотелия в процессе лечения острых миелоидных лейкозов / Червонцева А.М. – , 2008.– 99с.
6. А. Г. Румянцев А.А.М. Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток у детей. / А. А. М. А. Г. Румянцев – Москва: Медицинское информационное агентство, 2003.– 912с.
7. АЛЯНСКИЙ А.Л., МАКАРЕНКО О.А., ИВАНОВА Н.Е., ГОЛОВАЧЁВА А.А., КУЗЬМИЧ Е.В., КУЧЕР М.А., БАБЕНКО Е.В., ЭСТРИНА М.А., ВИТРИЩАК А.А., ПАИНА О.В., ПЕТРОВА А.Л., ПЕВЦОВ Д.Э., ЗУБАРОВСКАЯ Л.С. Афанасьев .Б.В. Информационные технологии в детской гематологии-онкологии и иммунологии, в том числе принципы регистрации и мониторинга злокачественных новообразований у детей и подростков / Афанасьев Б. В. АЛЯНСКИЙ А.Л., МАКАРЕНКО О.А., ИВАНОВА Н.Е., ГОЛОВАЧЁВА А.А., КУЗЬМИЧ Е.В., КУЧЕР М.А., БАБЕНКО Е.В., ЭСТРИНА М.А., ВИТРИЩАК А.А., ПАИНА О.В., ПЕТРОВА А.Л., ПЕВЦОВ Д.Э., ЗУБАРОВСКАЯ Л.С. // РОССИЙСКИЙ ЖУРНАЛ ДЕТСКОЙ ГЕМАТОЛОГИИ И ОНКОЛОГИИ – 2016. – Т. 3 – № 2– 68–74с.
8. АФАНАСЬЕВ Б.В. Зубаровская Л.С. РОЛЬ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В ТЕРАПИИ ВЗРОСЛЫХ БОЛЬНЫХ ОСТРЫМИ ЛЕЙКОЗАМИ / Зубаровская Л. С. АФАНАСЬЕВ Б.В. // ОНКОГЕМАТОЛОГИЯ – 2006. – Т. 1–2– 70–85с.
9. В.Г. Савченко, Л.С. Любимова Е.Н.П. Трансплантация аллогенных и аутологичных гемопоэтических стволовых клеток при острых лейкозах (итоги 20-летнего опыта) / Е. Н. П. В.Г. Савченко, Л.С. Любимова // Терапевтический архив – 2007. – Т. 7– 30с.

10. ЕФИМОВ Г.А., ВДОВИН А.С., ГРИГОРЬЕВ А.А., ФИЛЬКИН С.Ю., БЫКОВА Н.А. С.В.Г. ИММУНОБИОЛОГИЯ ОСТРОЙ РЕАКЦИИ “ТРАНСПЛАНТАТ ПРОТИВ ХОЗЯИНА” / С. В. Г. ЕФИМОВ Г.А., ВДОВИН А.С., ГРИГОРЬЕВ А.А., ФИЛЬКИН С.Ю., БЫКОВА Н.А. // МЕДИЦИНСКАЯ ИММУНОЛОГИЯ – 2015. – Т. 17 – № 6– 499–516с.
11. Acosta-Rodriguez E. V Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. / E. V Acosta-Rodriguez, G. Napolitani, A. Lanzavecchia, F. Sallusto // Nat. Immunol. – 2007. – Т. 8 – № 9– 942–9с.
12. Afzali B. The role of T helper 17 (Th17) and regulatory T cells (Treg) in human organ transplantation and autoimmune disease. / B. Afzali, G. Lombardi, R. I. Lechler, G. M. Lord // Clin. Exp. Immunol. – 2007. – Т. 148 – № 1– 32–46с.
13. Almici C. Circulating endothelial cell count: a reliable marker of endothelial damage in patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation / C. Almici, C. Skert, B. Bruno, A. Bianchetti, R. Verardi, A. Di Palma, A. Neva, S. Braga, G. Piccinelli, G. Piovani, M. Malagola, S. Bernardi, L. Giaccone, L. Brunello, M. Festuccia, K. Baeten, D. Russo, M. Marini // Bone Marrow Transplant. – 2017. – Т. 52 – № 10– 1637–1642с.
14. Almici C. Changes in Circulating Endothelial Cells Count Could Become a Valuable Tool in the Diagnostic Definition of Acute Graft-Versus-Host Disease / C. Almici, C. Skert, R. Verardi, A. Di Palma, A. Bianchetti, A. Neva, S. Braga, M. Malagola, A. Turra, M. Marini, D. Russo // Transplantation – 2014. – Т. 98 – № 7– 706–712с.
15. Annunziato F. Phenotypic and functional features of human Th17 cells. / F. Annunziato, L. Cosmi, V. Santarlasci, L. Maggi, F. Liotta, B. Mazzinghi, E. Parente, L. Fili, S. Ferri, F. Frosali, F. Giudici, P. Romagnani, P. Parronchi, F. Tonelli, E. Maggi, S. Romagnani // J. Exp. Med. – 2007. – Т. 204 – № 8– 1849–61с.
16. Asahara T. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. / T. Asahara, T. Murohara, A. Sullivan, M. Silver, R. van der Zee, T. Li, B. Witzenbichler, G. Schatteman, J. M. Isner // Science – 1997. – Т. 275 – № 5302– 964–7с.
17. Bahr F. Reconstitution of interleukin-17-producing T helper cells after allogeneic hematopoietic cell transplantation. / F. Bahr, R. Wehner, U. Platzbecker, M. Wermke, N. Shayegi, J. M. Middeke, C. Röllig, J. Schetelig, G. Ehninger, M. Schmitz, M. Bornhäuser, S. Tuve // Biol. Blood Marrow Transplant. – 2013. – Т. 19 – № 3– 357– 65с.
18. Barczyk A. Interleukin-17 in sputum correlates with airway hyperresponsiveness to methacholine. / A. Barczyk, W. Pierzchala, E. Sozańska // Respir. Med. – 2003. – Т. 97 – № 6– 726–33с.
19. Bardin N. S-Endo 1, a pan-endothelial monoclonal antibody recognizing a novel human endothelial antigen. / N. Bardin, F. George, M. Mutin, C. Brisson, N. Horschowski, V. Francés, G. Lesaulle, J. Sampol // Tissue Antigens – 1996. – Т. 48 – № 5– 531–9с.

20. Bardin N. Soluble CD146, a novel endothelial marker, is increased in physiopathological settings linked to endothelial junctional alteration. / N. Bardin, V. Moal, F. Anfosso, L. Daniel, P. Brunet, J. Sampol, F. Dignat George // *Thromb. Haemost.* – 2003. – T. 90 – № 5– 915–20c.
21. Barnett D. Guideline for the flow cytometric enumeration of CD34+ haematopoietic stem cells. Prepared by the CD34+ haematopoietic stem cell working party. General Haematology Task Force of the British Committee for Standards in Haematology. / D. Barnett, G. Janossy, A. Lubenko, E. Matutes, A. Newland, J. T. Reilly // *Clin. Lab. Haematol.* – 1999. – T. 21 – № 5– 301–8c.
22. Baron F. Impact of graft-versus-host disease after reduced-intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia: a report from the Acute Leukemia Working Party of the European group for blood and marrow transplantation / F. Baron, M. Labopin, D. Niederwieser, S. Vigouroux, J. J. Cornelissen, C. Malm, L. L. Vindelov, D. Blaise, J. J. W. M. Janssen, E. Petersen, G. Socié, A. Nagler, V. Rocha, M. Mohty // *Leukemia* – 2012. – T. 26 – № 12– 2462–2468c.
23. Batten M. Interleukin 27 limits autoimmune encephalomyelitis by suppressing the development of interleukin 17-producing T cells. / M. Batten, J. Li, S. Yi, N. M. Kljavin, D. M. Danilenko, S. Lucas, J. Lee, F. J. de Sauvage, N. Ghilardi // *Nat. Immunol.* – 2006. – T. 7 – № 9– 929–36c.
24. Beelen A.J. van Interleukin-17 in inflammatory skin disorders. / A. J. van Beelen, M. B. M. Teunissen, M. L. Kapsenberg, E. C. de Jong // *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* – 2007. – T. 7 – № 5– 374–81c.
25. Beelen D.W. Dose-escalated treosulphan in combination with cyclophosphamide as a new preparative regimen for allogeneic haematopoietic stem cell transplantation in patients with an increased risk for regimen-related complications. / D. W. Beelen, R. Trenschele, J. Casper, M. Freund, R. A. Hilger, M. E. Scheulen, N. Basara, A. A. Fauser, B. Hertenstein, H. A. Mylius, J. Baumgart, U. Pichlmeier, J. R. Hahn, E. Holler // *Bone Marrow Transplant.* – 2005. – T. 35 – № 3– 233–41c.
26. Beije N. Circulating endothelial cell enumeration demonstrates prolonged endothelial damage in recipients of myeloablative allogeneic stem cell transplantation. / N. Beije, J. Versluis, J. Kraan, J. W. Gratama, S. Sleijfer, J. J. Cornelissen // *Haematologica* – 2015. – T. 100 – № 6– e246-9c.
27. Benchetrit F. Interleukin-17 inhibits tumor cell growth by means of a T-cell-dependent mechanism. / F. Benchetrit, A. Ciree, V. Vives, G. Warnier, A. Gey, C. Sautès-Fridman, F. Fossiez, N. Haicheur, W. H. Fridman, E. Tartour // *Blood* – 2002. – T. 99 – № 6– 2114–21c.
28. Bethel K. Fluid phase biopsy for detection and characterization of circulating endothelial cells in myocardial infarction. / K. Bethel, M. S. Luttgen, S. Damani, A. Kolatkar, R. Lamy, M. Sabouri-Ghomi, S. Topol, E. J. Topol, P. Kuhn // *Phys. Biol.* – 2014. – T. 11 – № 1– 16002c.
29. Bettelli E. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. / E. Bettelli, Y. Carrier, W. Gao, T. Korn, T. B.

- Strom, M. Oukka, H. L. Weiner, V. K. Kuchroo // *Nature* – 2006. – T. 441 – № 7090– 235–8c.
30. Blann A.D. Circulating endothelial cells. Biomarker of vascular disease. / A. D. Blann, A. Woywodt, F. Bertolini, T. M. Bull, J. P. Buyon, R. M. Clancy, M. Haubitz, R. P. Hebbel, G. Y. H. Lip, P. Mancuso, J. Sampol, A. Solovey, F. Dignat-George // *Thromb. Haemost.* – 2005. – T. 93 – № 2– 228–35c.
31. Boniface K. From interleukin-23 to T-helper 17 cells: human T-helper cell differentiation revisited. / K. Boniface, B. Blom, Y.-J. Liu, R. de Waal Malefyt // *Immunol. Rev.* – 2008. – T. 226– 132–46c.
32. Bouvier C.A., Gaynor E. C.J.R. et al. Circulating endothelium as an indicator of vascular injury. / C. J. R. et al. Bouvier C.A., Gaynor E. // *Thromb Diath Haemorrh* – 1970. – T. 40 (Suppl) – 163–168c.
33. Brignole C. Effect of bortezomib on human neuroblastoma cell growth, apoptosis, and angiogenesis. / C. Brignole, D. Marimpietri, F. Pastorino, B. Nico, D. Di Paolo, M. Cioni, F. Piccardi, M. Cilli, A. Pezzolo, M. V. Corrias, V. Pistoia, D. Ribatti, G. Pagnan, M. Ponzoni // *J. Natl. Cancer Inst.* – 2006. – T. 98 – № 16– 1142–57c.
34. Brissot E. Improvement of overall survival after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for children and adolescents: a three-decade experience of a single institution / E. Brissot, F. Rialland, X. Cahu, M. Strullu, N. Corradini, C. Thomas, N. Blin, X. Rialland, E. Thebaud, P. Chevallerier, P. Moreau, N. Milpied, J. Harousseau, F. Mechinaud, M. Mohty // *Bone Marrow Transplant.* – 2015. – T. 51 – № 10– 267–272c.
35. Brucklacher-Waldert V. Phenotypical and functional characterization of T helper 17 cells in multiple sclerosis. / V. Brucklacher-Waldert, K. Stuermer, M. Kolster, J. Wolthausen, E. Tolosa // *Brain* – 2009. – T. 132– № Pt 12– 3329–41c.
36. Brüstle A. The development of inflammatory T(H)-17 cells requires interferon-regulatory factor 4. / A. Brüstle, S. Heink, M. Huber, C. Rosenplänter, C. Stadelmann, P. Yu, E. Arpaia, T. W. Mak, T. Kamradt, M. Lohoff // *Nat. Immunol.* – 2007. – T. 8 – № 9– 958–66c.
37. Camoin-Jau L. Circulating endothelial cells in Behçet's disease with cerebral thrombophlebitis. / L. Camoin-Jau, I. Kone-Paut, B. Chabrol, J. Sampol, F. Dignat-George // *Thromb. Haemost.* – 2000. – T. 83 – № 4– 631–2c.
38. Carlson M.J. In vitro-differentiated TH17 cells mediate lethal acute graft-versus-host disease with severe cutaneous and pulmonary pathologic manifestations. / M. J. Carlson, M. L. West, J. M. Coghill, A. Panoskaltis-Mortari, B. R. Blazar, J. S. Serody // *Blood* – 2009. – T. 113 – № 6– 1365–74c.
39. Chabaud M. Contribution of interleukin 17 to synovium matrix destruction in rheumatoid arthritis. / M. Chabaud, P. Garnero, J. M. Dayer, P. A. Guerne, F. Fossiez, P. Miossec // *Cytokine* – 2000. – T. 12 – № 7– 1092–9c.
40. Cines D.B. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. / D. B. Cines, E. S. Pollak, C. A. Buck, J. Loscalzo, G. A. Zimmerman, R. P. McEver, J. S. Pober, T. M. Wick, B. A. Konkle, B. S. Schwartz, E. S. Barnathan, K. R. McCrae, B. A. Hug, A. M. Schmidt, D. M. Stern // *Blood* – 1998. – T. 91 – №

10– 3527–61c.

41. Cirée A. Expression and activity of IL-17 in cutaneous T-cell lymphomas (mycosis fungoides and Sezary syndrome). / A. Cirée, L. Michel, S. Camilleri-Bröet, F. Jean Louis, M. Oster, B. Flageul, P. Senet, F. Fossiez, W. H. Fridman, H. Bachelez, E. Tartour // *Int. J. cancer* – 2004. – T. 112 – № 1– 113–20c.
42. Coghill J.M. Effector CD4+ T cells, the cytokines they generate, and GVHD: something old and something new. / J. M. Coghill, S. Sarantopoulos, T. P. Moran, W. J. Murphy, B. R. Blazar, J. S. Serody // *Blood* – 2011. – T. 117 – № 12– 3268–76c.
43. Cosmi L. Human interleukin 17-producing cells originate from a CD161+CD4+ T cell precursor. / L. Cosmi, R. De Palma, V. Santarlasci, L. Maggi, M. Capone, F. Frosali, G. Rodolico, V. Querci, G. Abbate, R. Angeli, L. Berrino, M. Fambrini, M. Caproni, F. Tonelli, E. Lazzeri, P. Parronchi, F. Liotta, E. Maggi, S. Romagnani, F. Annunziato // *J. Exp. Med.* – 2008. – T. 205 – № 8– 1903–16c.
44. Crisan M. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. / M. Crisan, S. Yap, L. Casteilla, C.-W. Chen, M. Corselli, T. S. Park, G. Andriolo, B. Sun, B. Zheng, L. Zhang, C. Norotte, P.-N. Teng, J. Traas, R. Schugar, B. M. Deasy, S. Badylak, H.-J. Buhring, J.-P. Jacobino, L. Lazzari, J. Huard, B. Péault // *Cell Stem Cell* – 2008. – T. 3 – № 3– 301–13c.
45. Crome S.Q. Translational mini-review series on Th17 cells: function and regulation of human T helper 17 cells in health and disease. / S. Q. Crome, A. Y. Wang, M. K. Levings // *Clin. Exp. Immunol.* – 2010. – T. 159 – № 2– 109–19c.
46. Dagur P.K. MCAM-expressing CD4(+) T cells in peripheral blood secrete IL-17A and are significantly elevated in inflammatory autoimmune diseases. / P. K. Dagur, A. Biancotto, L. Wei, H. N. Sen, M. Yao, W. Strober, R. B. Nussenblatt, J. P. McCoy // *J. Autoimmun.* – 2011. – T. 37 – № 4– 319–27c.
47. Dander E. Interleukin-17-producing T-helper cells as new potential player mediating graft-versus-host disease in patients undergoing allogeneic stem-cell transplantation. / E. Dander, A. Balduzzi, G. Zappa, G. Lucchini, P. Perseghin, V. André, E. Todisco, D. Rahal, M. Migliavacca, D. Longoni, G. Solinas, A. Villa, E. Berti, P. Della Mina, M. Parma, P. Allavena, E. Biagi, A. Rovelli, A. Biondi, G. D'Amico // *Transplantation* – 2009. – T. 88 – № 11– 1261–72c.
48. Despoix N. Mouse CD146/MCAM is a marker of natural killer cell maturation. / N. Despoix, T. Walzer, N. Jouve, M. Blot-Chabaud, N. Bardin, P. Paul, L. Lyonnet, E. Vivier, F. Dignat-George, F. Vély // *Eur. J. Immunol.* – 2008. – T. 38 – № 10– 2855–64c.
49. Dhodapkar K.M. Dendritic cells mediate the induction of polyfunctional human IL17-producing cells (Th17-1 cells) enriched in the bone marrow of patients with myeloma. / K. M. Dhodapkar, S. Barbuto, P. Matthews, A. Kukreja, A. Mazumder, D. Vesole, S. Jagannath, M. V Dhodapkar // *Blood* – 2008. – T. 112 – № 7– 2878–85c.
50. Dignat-George F. Circulating endothelial cells in vascular disorders: new insights into an old concept. / F. Dignat-George, J. Sampol // *Eur. J. Haematol.* – 2000. – T. 65 – № 4– 215–20c.

51. Duda D.G. Differential CD146 expression on circulating versus tissue endothelial cells in rectal cancer patients: implications for circulating endothelial and progenitor cells as biomarkers for antiangiogenic therapy. / D. G. Duda, K. S. Cohen, E. di Tomaso, P. Au, R. J. Klein, D. T. Scadden, C. G. Willett, R. K. Jain // *J. Clin. Oncol.* – 2006. – T. 24 – № 9– 1449–53c.
52. Dumler J.S. Endothelial-cell injury in cutaneous acute graft-versus-host disease. / J. S. Dumler, W. E. Beschorner, E. R. Farmer, K. A. Di Gennaro, R. Saral, G. W. Santos // *Am. J. Pathol.* – 1989. – T. 135 – № 6– 1097–103c.
53. Eisenstein E.M. The T(reg)/Th17 cell balance: a new paradigm for autoimmunity. / E. M. Eisenstein, C. B. Williams // *Pediatr. Res.* – 2009. – T. 65– № 5 Pt 2– 26R– 31Rc.
54. Elshal M.F. CD146 (Mel-CAM), an adhesion marker of endothelial cells, is a novel marker of lymphocyte subset activation in normal peripheral blood. / M. F. Elshal, S. S. Khan, Y. Takahashi, M. A. Solomon, J. P. McCoy // *Blood* – 2005. – T. 106 – № 8– 2923–4c.
55. Erdbruegger U. Circulating endothelial cells: a novel marker of endothelial damage. / U. Erdbruegger, M. Haubitz, A. Woywodt // *Clin. Chim. Acta.* – 2006. – T. 373 – № 1–2– 17–26c.
56. Ersvaer E. Intensive chemotherapy for acute myeloid leukemia differentially affects circulating TC1, TH1, TH17 and TREG cells. / E. Ersvaer, K. Liseth, J. Skavland, B. T. Gjertsen, Ø. Bruserud // *BMC Immunol.* – 2010. – T. 11– 38c.
57. Ertault-Daneshpouy M. Pericapillary hemorrhage as criterion of severe human digestive graft-versus-host disease. / M. Ertault-Daneshpouy, C. Leboeuf, M. Lemann, F. Bouhidel, L. Ades, E. Gluckman, G. Socié, A. Janin // *Blood* – 2004. – T. 103 – № 12– 4681–4c.
58. Eyrich M. Sequential Expression of Adhesion and Costimulatory Molecules in Graft-versus-Host Disease Target Organs after Murine Bone Marrow Transplantation across Minor Histocompatibility Antigen Barriers / M. Eyrich, G. Burger, K. Marquardt, W. Budach, K. Schilbach, D. Niethammer, P. G. Schlegel // *Biol. Blood Marrow Transplant.* – 2005. – T. 11 – № 5– 371–382c.
59. Ferrara J.L. Pathophysiologic mechanisms of acute graft-vs.-host disease. / J. L. Ferrara, R. Levy, N. J. Chao // *Biol. Blood Marrow Transplant.* – 1999. – T. 5 – № 6– 347–56c.
60. Ferrara J.L. Pathophysiologic mechanisms of acute graft-vs.-host disease. / J. L. Ferrara, R. Levy, N. J. Chao // *Biol. Blood Marrow Transplant.* – 1999. – T. 5 – № 6– 347–56c.
61. Ferretti S. IL-17, produced by lymphocytes and neutrophils, is necessary for lipopolysaccharide-induced airway neutrophilia: IL-15 as a possible trigger. / S. Ferretti, O. Bonneau, G. R. Dubois, C. E. Jones, A. Trifilieff // *J. Immunol.* – 2003. – T. 170 – № 4– 2106–12c.
62. Flanagan K. Laminin-411 is a vascular ligand for MCAM and facilitates TH17 cell entry into the CNS. / K. Flanagan, K. Fitzgerald, J. Baker, K. Regnstrom, S. Gardai, F. Bard, S. Mocci, P. Seto, M. You, C. Larochele, A. Prat, S. Chow, L. Li, C.

- Vandevert, W. Zago, C. Lorenzana, C. Nishioka, J. Hoffman, R. Botelho, C. Willits, K. Tanaka, J. Johnston, T. Yednock // *PLoS One* – 2012. – T. 7 – № 7– e40443c.
63. Flowers M.E.D. Comparative analysis of risk factors for acute graft-versus-host disease and for chronic graft-versus-host disease according to National Institutes of Health consensus criteria. / M. E. D. Flowers, Y. Inamoto, P. A. Carpenter, S. J. Lee, H.-P. Kiem, E. W. Petersdorf, S. E. Pereira, R. A. Nash, M. Mielcarek, M. L. Fero, E. H. Warren, J. E. Sanders, R. F. Storb, F. R. Appelbaum, B. E. Storer, P. J. Martin // *Blood* – 2011. – T. 117 – № 11– 3214–9c.
64. Foley J.F. STAT3 Regulates the Generation of Th17 Cells / J. F. Foley // *Sci. STKE* – 2007. – T. 2007 – № 380– tw113–tw113c.
65. Garibaldi S. Soluble form of the endothelial adhesion molecule CD146 binds preferentially CD16+ monocytes. / S. Garibaldi, C. Barisione, G. Ghigliotti, P. Spallarossa, A. Barsotti, P. Fabbi, L. Corsiglia, D. Palmieri, D. Palombo, C. Brunelli // *Mol. Biol. Rep.* – 2012. – T. 39 – № 6– 6745–52c.
66. Gaynor E. A technique for locating rare cells in the circulation for ultramicroscopy. / E. Gaynor, C. A. Bouvier, J. R. Cintron // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* – 1970. – T. 133 – № 2– 520–3c.
67. Gentry T. Simultaneous isolation of human BM hematopoietic, endothelial and mesenchymal progenitor cells by flow sorting based on aldehyde dehydrogenase activity: implications for cell therapy / T. Gentry, S. Foster, L. Winstead, E. Deibert, M. Fiordalisi, A. Balber // *Cytotherapy* – 2007. – T. 9 – № 3– 259–274c.
68. George F. Rapid isolation of human endothelial cells from whole blood using S-Endo1 monoclonal antibody coupled to immuno-magnetic beads: demonstration of endothelial injury after angioplasty. / F. George, C. Brisson, P. Poncelet, J. C. Laurent, O. Massot, D. Arnoux, P. Ambrosi, C. Klein-Soyer, J. P. Cazenave, J. Sampol // *Thromb. Haemost.* – 1992. – T. 67 – № 1– 147–53c.
69. Glucksberg H. Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors. / H. Glucksberg, R. Storb, A. Fefer, C. D. Buckner, P. E. Neiman, R. A. Clift, K. G. Lerner, E. D. Thomas // *Transplantation* – 1974. – T. 18 – № 4– 295–304c.
70. Goon P.K.Y. Circulating endothelial cells: markers of vascular dysfunction. / P. K. Y. Goon, C. J. Boos, G. Y. H. Lip // *Clin. Lab.* – 2005. – T. 51 – № 9–10– 531–8c.
71. Goon P.K.Y. Circulating endothelial cells and circulating progenitor cells in breast cancer: relationship to endothelial damage/dysfunction/apoptosis, clinicopathologic factors, and the Nottingham Prognostic Index. / P. K. Y. Goon, G. Y. H. Lip, P. S. Stonelake, A. D. Blann // *Neoplasia* – 2009. – T. 11 – № 8– 771–9c.
72. Guezguez B. Dual role of melanoma cell adhesion molecule (MCAM)/CD146 in lymphocyte endothelium interaction: MCAM/CD146 promotes rolling via microvilli induction in lymphocyte and is an endothelial adhesion receptor. / B. Guezguez, P. Vigneron, N. Lamerant, C. Kieda, T. Jaffredo, D. Dunon // *J. Immunol.* – 2007. – T. 179 – № 10– 6673–85c.
73. Harrington L.E. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a

- lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. / L. E. Harrington, R. D. Hatton, P. R. Mangan, H. Turner, T. L. Murphy, K. M. Murphy, C. T. Weaver // *Nat. Immunol.* – 2005. – T. 6 – № 11– 1123–32c.
74. Haubitz M. Circulating endothelial cells and vasculitis. / M. Haubitz, A. Woywodt // *Intern. Med.* – 2004. – T. 43 – № 8– 660–7c.
75. Hester J. Th17 cells in alemtuzumab-treated patients. The effect of long-term maintenance immunosuppressive therapy Europe PMC Funders Group / J. Hester, N. Mills, S. Shankar, M. Carvalho-Gaspar, P. Friend, K. J. Wood // *Transplant.* April – 2011. – T. 15 – № 917– 744–750c.
76. Hill J.M. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. / J. M. Hill, G. Zalos, J. P. J. Halcox, W. H. Schenke, M. A. Waclawiw, A. A. Quyyumi, T. Finkel // *N. Engl. J. Med.* – 2003. – T. 348 – № 7– 593–600c.
77. Hladovec J. Circulating endothelial cells isolated together with platelets and the experimental modification of their counts in rats / J. Hladovec, P. Rossmann // *Thromb. Res.* – 1973. – T. 3 – № 6– 665–674c.
78. Hoeve M.A. Divergent effects of IL-12 and IL-23 on the production of IL-17 by human T cells. / M. A. Hoeve, N. D. L. Savage, T. de Boer, D. M. L. Langenberg, R. de Waal Malefyt, T. H. M. Ottenhoff, F. A. W. Verreck // *Eur. J. Immunol.* – 2006. – T. 36 – № 3– 661–70c.
79. Hristov M. Endothelial progenitor cells: mobilization, differentiation, and homing. / M. Hristov, W. Erl, P. C. Weber // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2003. – T. 23 – № 7– 1185–9c.
80. Hwang S.-Y. Expression of IL-17 homologs and their receptors in the synovial cells of rheumatoid arthritis patients. / S.-Y. Hwang, H.-Y. Kim // *Mol. Cells* – 2005. – T. 19 – № 2– 180–4c.
81. Ivanov I.I. Transcriptional regulation of Th17 cell differentiation. / I. I. Ivanov, L. Zhou, D. R. Littman // *Semin. Immunol.* – 2007. – T. 19 – № 6– 409–17c.
82. Ivanov S. Functional relevance of the IL-23-IL-17 axis in lungs in vivo. / S. Ivanov, S. Bozinovski, A. Bossios, H. Valadi, R. Vlahos, C. Malmhäll, M. Sjöstrand, J. K. Kolls, G. P. Anderson, A. Lindén // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* – 2007. – T. 36 – № 4– 442–51c.
83. Jacobsohn D.A. Acute graft versus host disease. / D. A. Jacobsohn, G. B. Vogelsang // *Orphanet J. Rare Dis.* – 2007. – T. 2– 35c.
84. Jovanovic D. V Stimulation of 92-kd gelatinase (matrix metalloproteinase 9) production by interleukin-17 in human monocyte/macrophages: a possible role in rheumatoid arthritis. / D. V Jovanovic, J. Martel-Pelletier, J. A. Di Battista, F. Mineau, F. C. Jolicoeur, M. Bendoric, J. P. Pelletier // *Arthritis Rheum.* – 2000. – T. 43 – № 5– 1134–44c.
85. Kappel L.W. IL-17 contributes to CD4-mediated graft-versus-host disease / L. W. Kappel, G. L. Goldberg, C. G. King, D. Y. Suh, O. M. Smith, C. Ligh, A. M. Holland, J. Grubin, N. M. Mark, C. Liu, Y. Iwakura, G. Heller, M. R. M. van den Brink // *Blood* – 2009. – T. 113 – № 4– 945–952c.

86. Kas-Deelen A.M. Uninfected and cytomegalic endothelial cells in blood during cytomegalovirus infection: effect of acute rejection. / A. M. Kas-Deelen, E. F. de Maar, M. C. Harmsen, C. Driessen, W. J. van Son, T. H. The // *J. Infect. Dis.* – 2000. – T. 181 – № 2– 721–4c.
87. Kato T. Expression of IL-17 mRNA in ovarian cancer. / T. Kato, H. Furumoto, T. Ogura, Y. Onishi, M. Irahara, S. Yamano, M. Kamada, T. Aono // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2001. – T. 282 – № 3– 735–8c.
88. Khan S.S. Detection of circulating endothelial cells and endothelial progenitor cells by flow cytometry. / S. S. Khan, M. A. Solomon, J. P. McCoy // *Cytometry B. Clin. Cytom.* – 2005. – T. 64 – № 1– 1–8c.
89. Kolb H.-J. Graft-versus-leukemia effects of transplantation and donor lymphocytes. / H.-J. Kolb // *Blood* – 2008. – T. 112 – № 12– 4371–83c.
90. Kurasawa K. Increased interleukin-17 production in patients with systemic sclerosis. / K. Kurasawa, K. Hirose, H. Sano, H. Endo, H. Shinkai, Y. Nawata, K. Takabayashi, I. Iwamoto // *Arthritis Rheum.* – 2000. – T. 43 – № 11– 2455–63c.
91. Lanuti P. A novel flow cytometric approach to distinguish circulating endothelial cells from endothelial microparticles: relevance for the evaluation of endothelial dysfunction. / P. Lanuti, F. Santilli, M. Marchisio, L. Pierdomenico, E. Vitacolonna, E. Santavenere, A. Iacone, G. Davì, M. Romano, S. Miscia // *J. Immunol. Methods* – 2012. – T. 380 – № 1–2– 16–22c.
92. Larochelle C. Melanoma cell adhesion molecule identifies encephalitogenic T lymphocytes and promotes their recruitment to the central nervous system. / C. Larochelle, R. Cayrol, H. Kebir, J. I. Alvarez, M.-A. Lécuyer, I. Ifergan, É. Viel, L. Bourbonnière, D. Beauseigle, S. Terouz, L. Hachehouche, S. Gendron, J. Poirier, C. Jobin, P. Duquette, K. Flanagan, T. Yednock, N. Arbour, A. Prat // *Brain* – 2012. – T. 135– № Pt 10– 2906–24c.
93. Laurence A. Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation. / A. Laurence, C. M. Tato, T. S. Davidson, Y. Kanno, Z. Chen, Z. Yao, R. B. Blank, F. Meylan, R. Siegel, L. Hennighausen, E. M. Shevach, J. J. O'shea // *Immunity* – 2007. – T. 26 – № 3– 371–81c.
94. Lee S.J. High-resolution donor-recipient HLA matching contributes to the success of unrelated donor marrow transplantation / S. J. Lee, J. Klein, M. Haagenson, L. A. Baxter-Lowe, D. L. Confer, M. Eapen, M. Fernandez-Vina, N. Flomenberg, M. Horowitz, C. K. Hurley, H. Noreen, M. Oudshoorn, E. Petersdorf, M. Setterholm, S. Spellman, D. Weisdorf, T. M. Williams, C. Anasetti // *Blood* – 2007. – T. 110 – № 13– 4576–4583c.
95. Lefevre P. Detection of circulating endothelial cells in thrombotic thrombocytopenic purpura. / P. Lefevre, F. George, J. M. Durand, J. Sampol // *Thromb. Haemost.* – 1993. – T. 69 – № 5– 522c.
96. Lehmann J.M. Discrimination between benign and malignant cells of melanocytic lineage by two novel antigens, a glycoprotein with a molecular weight of 113,000 and a protein with a molecular weight of 76,000. / J. M. Lehmann, B. Holzmann, E. W. Breitbart, P. Schmiegelow, G. Riethmüller, J. P. Johnson // *Cancer Res.* – 1987. – T.

47 – № 3– 841–5c.

97. Lehmann J.M. MUC18, a marker of tumor progression in human melanoma, shows sequence similarity to the neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily. / J. M. Lehmann, G. Riethmüller, J. P. Johnson // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 1989. – T. 86 – № 24– 9891–5c.

98. Lin Y. Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood. / Y. Lin, D. J. Weisdorf, A. Solovey, R. P. Hebbel // *J. Clin. Invest.* – 2000. – T. 105 – № 1– 71–7c.

99. Lindén A. Role of interleukin-17 and the neutrophil in asthma. / A. Lindén // *Int. Arch. Allergy Immunol.* – 2001. – T. 126 – № 3– 179–84c.

100. Liu Y. The expression of Th17-associated cytokines in human acute graft-versus-host disease. / Y. Liu, Y. Cai, L. Dai, G. Chen, X. Ma, Y. Wang, T. Xu, S. Jin, X. Wu, H. Qiu, X. Tang, C. Li, A. Sun, D. Wu, H. Liu // *Biol. Blood Marrow Transplant.* – 2013. – T. 19 – № 10– 1421–9c.

101. Lubberts E. Overexpression of IL-17 in the knee joint of collagen type II immunized mice promotes collagen arthritis and aggravates joint destruction. / E. Lubberts, L. A. B. Joosten, F. A. J. van de Loo, P. Schwarzenberger, J. Kolls, W. B. van den Berg // *Inflamm. Res.* – 2002. – T. 51 – № 2– 102–4c.

102. Luznik L. Posttransplantation cyclophosphamide facilitates engraftment of major histocompatibility complex-identical allogeneic marrow in mice conditioned with low-dose total body irradiation. / L. Luznik, L. W. Engstrom, R. Iannone, E. J. Fuchs // *Biol. Blood Marrow Transplant.* – 2002. – T. 8 – № 3– 131–8c.

103. Malard F. Increased Th17/Treg ratio in chronic liver GVHD. / F. Malard, C. Bossard, E. Brissot, P. Chevallier, T. Guillaume, J. Delaunay, J.-F. Mosnier, P. Moreau, M. Grégoire, B. Gaugler, M. Mohty // *Bone Marrow Transplant.* – 2014. – T. 49 – № 4– 539–44c.

104. Mancuso P. Validation of a standardized method for enumerating circulating endothelial cells and progenitors: flow cytometry and molecular and ultrastructural analyses. / P. Mancuso, P. Antoniotti, J. Quarna, A. Calleri, C. Rabascio, C. Tacchetti, P. Braidotti, H.-K. Wu, A. J. Zurita, L. Saronni, J. B. Cheng, D. R. Shalinsky, J. V Heymach, F. Bertolini // *Clin. Cancer Res.* – 2009. – T. 15 – № 1– 267–73c.

105. Marmaduke D.P. Gastric vascular ectasia in patients undergoing bone marrow transplantation. / D. P. Marmaduke, J. K. Greenson, I. Cunningham, E. E. Herderick, J. F. Cornhill // *Am. J. Clin. Pathol.* – 1994. – T. 102 – № 2– 194–8c.

106. Miossec P. Interleukin-17 in rheumatoid arthritis: if T cells were to contribute to inflammation and destruction through synergy. / P. Miossec // *Arthritis Rheum.* – 2003. – T. 48 – № 3– 594–601c.

107. Mohty M. Inflammatory cytokines and acute graft-versus-host disease after reduced-intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation / M. Mohty, D. Blaise, C. Faucher, N. Vey, R. Bouabdallah, A.-M. Stoppa, F. Viret, G. Gravis, D. Olive, B. Gaugler // *Blood* – 2005. – T. 106 – № 13– 4407–4411c.

108. Morris G.P. Dual Receptor T Cells Mediate Pathologic Alloreactivity in Patients

- with Acute Graft-Versus-Host Disease / G. P. Morris, G. L. Uy, D. Donermeyer, J. F. DiPersio, P. M. Allen // *Sci. Transl. Med.* – 2013. – T. 5 – № 188– 188ra74-188ra74c.
109. Mutin M. Direct evidence of endothelial injury in acute myocardial infarction and unstable angina by demonstration of circulating endothelial cells. / M. Mutin, I. Canavy, A. Blann, M. Bory, J. Sampol, F. Dignat-George // *Blood* – 1999. – T. 93 – № 9– 2951–8c.
110. Nakatani K. Circulating endothelial cells in Kawasaki disease. / K. Nakatani, S. Takeshita, H. Tsujimoto, Y. Kawamura, T. Tokutomi, I. Sekine // *Clin. Exp. Immunol.* – 2003. – T. 131 – № 3– 536–40c.
111. NASSEREDDINE S. Acute Graft Versus Host Disease: A Comprehensive Review / S. NASSEREDDINE, H. RAFEI, E. ELBAHESH, I. TABBARA // *Anticancer Res.* – 2017. – T. 37 – № 4– 1547–1555c.
112. Norton J. Adhesion molecule expression in human hepatic graft-versus-host disease. / J. Norton, N. al-Saffar, J. P. Sloane // *Bone Marrow Transplant.* – 1992. – T. 10 – № 2– 153–6c.
113. Numasaki M. Interleukin-17 promotes angiogenesis and tumor growth. / M. Numasaki, J. Fukushi, M. Ono, S. K. Narula, P. J. Zavodny, T. Kudo, P. D. Robbins, H. Tahara, M. T. Lotze // *Blood* – 2003. – T. 101 – № 7– 2620–7c.
114. Pan B. Deviated balance between Th1 and Th17 cells exacerbates acute graft-versus-host disease in mice. / B. Pan, Y. Zhang, Y. Sun, H. Cheng, Y. Wu, G. Song, W. Chen, L. Zeng, K. Xu // *Cytokine* – 2014. – T. 68 – № 2– 69–75c.
115. Papa N. Del Circulating endothelial cells as a marker of ongoing vascular disease in systemic sclerosis. / N. Del Papa, G. Colombo, N. Fracchiolla, L. M. Moronetti, F. Ingegnoli, W. Maglione, D. P. Comina, C. Vitali, F. Fantini, A. Cortelezzi // *Arthritis Rheum.* – 2004. – T. 50 – № 4– 1296–304c.
116. Papa N. Del Bone marrow endothelial progenitors are defective in systemic sclerosis / N. Del Papa, N. Quirici, D. Soligo, C. Scavullo, M. Cortiana, C. Borsotti, W. Maglione, D. P. Comina, C. Vitali, P. Fraticelli, A. Gabrielli, A. Cortelezzi, G. Lambertenghi-Delilieri // *Arthritis Rheum.* – 2006. – T. 54 – № 8– 2605–2615c.
117. Park H. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. / H. Park, Z. Li, X. O. Yang, S. H. Chang, R. Nurieva, Y.-H. Wang, Y. Wang, L. Hood, Z. Zhu, Q. Tian, C. Dong // *Nat. Immunol.* – 2005. – T. 6 – № 11– 1133–41c.
118. Park M.-K. Halofuginone ameliorates autoimmune arthritis in mice by regulating the balance between Th17 and Treg cells and inhibiting osteoclastogenesis. / M.-K. Park, J.-S. Park, E.-M. Park, M.-A. Lim, S.-M. Kim, D.-G. Lee, S.-Y. Baek, E.-J. Yang, J.-W. Woo, J. Lee, S.-K. Kwok, H.-Y. Kim, M.-L. Cho, S.-H. Park // *Arthritis Rheumatol. (Hoboken, N.J.)* – 2014. – T. 66 – № 5– 1195–207c.
119. Passweg J.R. Use of haploidentical stem cell transplantation continues to increase: the 2015 European Society for Blood and Marrow Transplant activity survey report / J. R. Passweg, H. Baldomero, P. Bader, C. Bonini, R. F. Duarte, C. Dufour, A. Gennery, N. Kröger, J. Kuball, F. Lanza, S. Montoto, A. Nagler, J. A.

Snowden, J. Styczynski, M. Mohty // *Bone Marrow Transplant.* – 2017. – T. 52 – № 6– 811–817c.

120. Penack O. Inhibition of neovascularization to simultaneously ameliorate graft-vs-host disease and decrease tumor growth. / O. Penack, E. Henke, D. Suh, C. G. King, O. M. Smith, I.-K. Na, A. M. Holland, A. Ghosh, S. X. Lu, R. R. Jenq, C. Liu, G. F. Murphy, T. T. Lu, C. May, D. A. Scheinberg, D. C. Gao, V. Mittal, G. Heller, R. Benezra, M. R. M. van den Brink // *J. Natl. Cancer Inst.* – 2010. – T. 102 – № 12– 894–908c.

121. Penack O. The importance of neovascularization and its inhibition for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. / O. Penack, G. Socié, M. R. M. van den Brink // *Blood* – 2011. – T. 117 – № 16– 4181–9c.

122. Petzelbauer P. Heterogeneity of dermal microvascular endothelial cell antigen expression and cytokine responsiveness in situ and in cell culture. / P. Petzelbauer, J. R. Bender, J. Wilson, J. S. Pober // *J. Immunol.* – 1993. – T. 151 – № 9– 5062–72c.

123. Porta M.G. Della Immunophenotypic, cytogenetic and functional characterization of circulating endothelial cells in myelodysplastic syndromes. / M. G. Della Porta, L. Malcovati, G. M. Rigolin, V. Rosti, E. Bonetti, E. Travaglini, E. Boveri, A. Galli, S. Boggi, M. Ciccone, T. Pramparo, G. Mazzini, R. Invernizzi, M. Lazzarino, M. Cazzola // *Leukemia* – 2008. – T. 22 – № 3– 530–7c.

124. Prabhala R.H. Elevated IL-17 produced by TH17 cells promotes myeloma cell growth and inhibits immune function in multiple myeloma. / R. H. Prabhala, D. Pelluru, M. Fulciniti, H. K. Prabhala, P. Nanjappa, W. Song, C. Pai, S. Amin, Y.-T. Tai, P. G. Richardson, I. M. Ghobrial, S. P. Treon, J. F. Daley, K. C. Anderson, J. L. Kutok, N. C. Munshi // *Blood* – 2010. – T. 115 – № 26– 5385–92c.

125. Roodhart J.M. Late release of circulating endothelial cells and endothelial progenitor cells after chemotherapy predicts response and survival in cancer patients. / J. M. Roodhart, M. H. Langenberg, J. S. Vermaat, M. P. Lolkema, A. Baars, R. H. Giles, E. O. Witteveen, E. E. Voest // *Neoplasia* – 2010. – T. 12 – № 1– 87–94c.

126. Rouvier E. CTLA-8, cloned from an activated T cell, bearing AU-rich messenger RNA instability sequences, and homologous to a herpesvirus saimiri gene. / E. Rouvier, M. F. Luciani, M. G. Mattéi, F. Denizot, P. Golstein // *J. Immunol.* – 1993. – T. 150 – № 12– 5445–56c.

127. Sackstein R. A Revision of Billingham's Tenets: The Central Role of Lymphocyte Migration in Acute Graft-versus-Host Disease / R. Sackstein // *Biol. Blood Marrow Transplant.* – 2006. – T. 12 – № 1– 2–8c.

128. Salat C. Endothelial cell markers in bone marrow transplant recipients with and without acute graft-versus-host disease. / C. Salat, E. Holler, H. J. Kolb, R. Pihusch, B. Reinhardt, E. Hiller // *Bone Marrow Transplant.* – 1997. – T. 19 – № 9– 909–14c.

129. Schmidt-Lucke C. Quantification of circulating endothelial progenitor cells using the modified ISHAGE protocol. / C. Schmidt-Lucke, S. Fichtlscherer, A. Aicher, C. Tschöpe, H.-P. Schultheiss, A. M. Zeiher, S. Dimmeler // *PLoS One* – 2010. – T. 5 – № 11– e13790c.

130. Schmitz N. Long-term outcome of patients given transplants of mobilized blood

- or bone marrow: a report from the International Bone Marrow Transplant Registry and the European Group for Blood and Marrow Transplantation / N. Schmitz, M. Eapen, M. M. Horowitz, M.-J. Zhang, J. P. Klein, J. D. Rizzo, F. R. Loberiza, A. Gratwohl, R. E. Champlin, International Bone Marrow Transplant Registry, European Group for Blood and Marrow Transplantation // *Blood* – 2006. – T. 108 – № 13– 4288–4290c.
131. Schwandner R. Requirement of tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF)6 in interleukin 17 signal transduction. / R. Schwandner, K. Yamaguchi, Z. Cao // *J. Exp. Med.* – 2000. – T. 191 – № 7– 1233–40c.
132. Serody J.S. The IL-17 differentiation pathway and its role in transplant outcome. / J. S. Serody, G. R. Hill // *Biol. Blood Marrow Transplant.* – 2012. – T. 18– № 1 Suppl– S56-61c.
133. Shaked Y. Therapy-induced acute recruitment of circulating endothelial progenitor cells to tumors. / Y. Shaked, A. Ciarrocchi, M. Franco, C. R. Lee, S. Man, A. M. Cheung, D. J. Hicklin, D. Chaplin, F. S. Foster, R. Benezra, R. S. Kerbel // *Science* – 2006. – T. 313 – № 5794– 1785–7c.
134. Shaked Y. Rapid chemotherapy-induced acute endothelial progenitor cell mobilization: implications for antiangiogenic drugs as chemosensitizing agents. / Y. Shaked, E. Henke, J. M. L. Roodhart, P. Mancuso, M. H. G. Langenberg, M. Colleoni, L. G. Daenen, S. Man, P. Xu, U. Emmenegger, T. Tang, Z. Zhu, L. Witte, R. M. Strieter, F. Bertolini, E. E. Voest, R. Benezra, R. S. Kerbel // *Cancer Cell* – 2008. – T. 14 – № 3– 263–73c.
135. Shih I.M. The role of CD146 (Mel-CAM) in biology and pathology. / I. M. Shih // *J. Pathol.* – 1999. – T. 189 – № 1– 4–11c.
136. Shimura K. Circulating Endothelial Progenitor Cells Decreased in Patients with Sclerodermatous Chronic Graft-versus-Host Disease / K. Shimura, E. Ashihara, C. Shimazaki, S. Matsunaga, K. Taniguchi, H. Uchiyama, Y. Matsumoto, S. Kimura, H. Matsubara, M. Taniwaki, T. Maekawa // *Biol. Blood Marrow Transplant.* – 2008. – T. 14 – № 4– 426–437c.
137. Singh R. Th1/Th17 cytokine profiles in patients with reactive arthritis/undifferentiated spondyloarthritis. / R. Singh, A. Aggarwal, R. Misra // *J. Rheumatol.* – 2007. – T. 34 – № 11– 2285–90c.
138. Solovey A. Circulating activated endothelial cells in sickle cell anemia. / A. Solovey, Y. Lin, P. Browne, S. Choong, E. Wayner, R. P. Hebbel // *N. Engl. J. Med.* – 1997. – T. 337 – № 22– 1584–90c.
139. Steiner G.E. Expression and function of pro-inflammatory interleukin IL-17 and IL-17 receptor in normal, benign hyperplastic, and malignant prostate. / G. E. Steiner, M. E. Newman, D. Paikl, U. Stix, N. Memaran-Dagda, C. Lee, M. J. Marberger // *Prostate* – 2003. – T. 56 – № 3– 171–82c.
140. Stumhofer J.S. Interleukin 27 negatively regulates the development of interleukin 17-producing T helper cells during chronic inflammation of the central nervous system. / J. S. Stumhofer, A. Laurence, E. H. Wilson, E. Huang, C. M. Tato, L. M. Johnson, A. V Villarino, Q. Huang, A. Yoshimura, D. Sehy, C. J. M. Saris, J. J.

- O'Shea, L. Hennighausen, M. Ernst, C. A. Hunter // *Nat. Immunol.* – 2006. – T. 7 – № 9– 937–45c.
141. Sugiyama T. Bone marrow niches for hematopoietic stem cells and immune cells. / T. Sugiyama, T. Nagasawa // *Inflamm. Allergy Drug Targets* – 2012. – T. 11 – № 3– 201–6c.
142. Sun K. Inhibition of acute graft-versus-host disease with retention of graft-versus-tumor effects by the proteasome inhibitor bortezomib. / K. Sun, L. A. Welniak, A. Panoskaltsis-Mortari, M. J. O'Shaughnessy, H. Liu, I. Barao, W. Riordan, R. Sitcheran, C. Wysocki, J. S. Serody, B. R. Blazar, T. J. Sayers, W. J. Murphy // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2004. – T. 101 – № 21– 8120–5c.
143. Sundrud M.S. Halofuginone inhibits TH17 cell differentiation by activating the amino acid starvation response. / M. S. Sundrud, S. B. Koralov, M. Feuerer, D. P. Calado, A. E. Kozhaya, A. Rhule-Smith, R. E. Lefebvre, D. Unutmaz, R. Mazitschek, H. Waldner, M. Whitman, T. Keller, A. Rao // *Science* – 2009. – T. 324 – № 5932– 1334–8c.
144. Swerlick R.A. Human dermal microvascular endothelial but not human umbilical vein endothelial cells express CD36 in vivo and in vitro. / R. A. Swerlick, K. H. Lee, T. M. Wick, T. J. Lawley // *J. Immunol.* – 1992. – T. 148 – № 1– 78–83c.
145. Taira E. Molecular cloning and functional expression of gicerin, a novel cell adhesion molecule that binds to neurite outgrowth factor. / E. Taira, N. Takaha, H. Taniura, C. H. Kim, N. Miki // *Neuron* – 1994. – T. 12 – № 4– 861–72c.
146. Tanaka M. The impact of the dose of natural killer cells in the graft on severe acute graft-versus-host disease after unrelated bone marrow transplantation / M. Tanaka, S. Kobayashi, A. Numata, T. Tachibana, H. Takasaki, A. Maruta, Y. Ishigatsubo, H. Kanamori // *Leuk. Res.* – 2012. – T. 36 – № 6– 699–703c.
147. Taniura H. Purification and characterization of an 82-kD membrane protein as a neurite outgrowth factor binding protein: possible involvement of NOF binding protein in axonal outgrowth in developing retina. / H. Taniura, C. H. Kuo, Y. Hayashi, N. Miki // *J. Cell Biol.* – 1991. – T. 112 – № 2– 313–22c.
148. Tepper O.M. Human endothelial progenitor cells from type II diabetics exhibit impaired proliferation, adhesion, and incorporation into vascular structures. / O. M. Tepper, R. D. Galiano, J. M. Capla, C. Kalka, P. J. Gagne, G. R. Jacobowitz, J. P. Levine, G. C. Gurtner // *Circulation* – 2002. – T. 106 – № 22– 2781–6c.
149. Tesmer L.A. Th17 cells in human disease. / L. A. Tesmer, S. K. Lundy, S. Sarkar, D. A. Fox // *Immunol. Rev.* – 2008. – T. 223– 87–113c.
150. Toldi G. Peripheral T(h)1/T(h)2/T(h)17/regulatory T-cell balance in asthmatic pregnancy. / G. Toldi, A. Molvarec, B. Stenczer, V. Müller, N. Eszes, A. Bohács, A. Bikov, J. Rigó, B. Vásárhelyi, G. Losonczy, L. Tamási // *Int. Immunol.* – 2011. – T. 23 – № 11– 669–77c.
151. Tomita H. The Role of Aldehyde Dehydrogenase 1A1 in Stem Cells and Cancer Stem Cells / H. Tomita, K. Tanaka, K. Hisamatsu, A. Hara // *Cancer Cell Microenviron.* – 2015. – T. 2 – № 4.
152. Torres C. Circulating endothelial cells in patients with venous thromboembolism

- and myeloproliferative neoplasms. / C. Torres, A. M. Fonseca, M. Leander, R. Matos, S. Morais, M. Campos, M. Lima // PLoS One – 2013. – T. 8 – № 12– e81574c.
153. Tutschka P.J. Bone marrow transplantation for leukemia following a new busulfan and cyclophosphamide regimen. / P. J. Tutschka, E. A. Copelan, J. P. Klein // Blood – 1987. – T. 70 – № 5– 1382–8c.
154. Vainio O. HEMCAM, an adhesion molecule expressed by c-kit+ hemopoietic progenitors. / O. Vainio, D. Dunon, F. Aïssi, J. P. Dangy, K. M. McNagny, B. A. Imhof // J. Cell Biol. – 1996. – T. 135– № 6 Pt 1– 1655–68c.
155. Veldhoen M. The aryl hydrocarbon receptor links TH17-cell-mediated autoimmunity to environmental toxins. / M. Veldhoen, K. Hirota, A. M. Westendorf, J. Buer, L. Dumoutier, J.-C. Renauld, B. Stockinger // Nature – 2008. – T. 453 – № 7191– 106–9c.
156. Veldhoen M. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. / M. Veldhoen, R. J. Hocking, C. J. Atkins, R. M. Locksley, B. Stockinger // Immunity – 2006. – T. 24 – № 2– 179–89c.
157. Vietinghoff S. von Mycophenolic acid suppresses granulopoiesis by inhibition of interleukin-17 production / S. von Vietinghoff, H. Ouyang, K. Ley // Kidney Int. – 2010. – T. 78 – № 1– 79–88c.
158. Weaver C.T. The Th17 pathway and inflammatory diseases of the intestines, lungs, and skin. / C. T. Weaver, C. O. Elson, L. A. Fouser, J. K. Kolls // Annu. Rev. Pathol. – 2013. – T. 8– 477–512c.
159. Weaver C.T. Interplay between the TH17 and TReg cell lineages: a (co-)evolutionary perspective. / C. T. Weaver, R. D. Hatton // Nat. Rev. Immunol. – 2009. – T. 9 – № 12– 883–9c.
160. Wong C.K. Proinflammatory cytokines (IL-17, IL-6, IL-18 and IL-12) and Th cytokines (IFN-gamma, IL-4, IL-10 and IL-13) in patients with allergic asthma. / C. K. Wong, C. Y. Ho, F. W. Ko, C. H. Chan, A. S. Ho, D. S. Hui, C. W. Lam // Clin. Exp. Immunol. – 2001. – T. 125 – № 2– 177–83c.
161. Wong C.K. Elevation of proinflammatory cytokine (IL-18, IL-17, IL-12) and Th2 cytokine (IL-4) concentrations in patients with systemic lupus erythematosus. / C. K. Wong, C. Y. Ho, E. K. Li, C. W. Lam // Lupus – 2000. – T. 9 – № 8– 589–93c.
162. Woywodt A. Circulating endothelial cells: life, death, detachment and repair of the endothelial cell layer. / A. Woywodt, F. H. Bahlmann, K. De Groot, H. Haller, M. Haubitz // Nephrol. Dial. Transplant – 2002. – T. 17 – № 10– 1728–30c.
163. Woywodt A. Circulating endothelial cells as a marker of endothelial damage in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. / A. Woywodt, J. Scheer, L. Hambach, S. Buchholz, A. Ganser, H. Haller, B. Hertenstein, M. Haubitz // Blood – 2004. – T. 103 – № 9– 3603–5c.
164. Woywodt A. Elevated numbers of circulating endothelial cells in renal transplant recipients. / A. Woywodt, M. Schroeder, W. Gwinner, M. Mengel, M. Jaeger, A. Schwarz, H. Haller, M. Haubitz // Transplantation – 2003. – T. 76 – № 1– 1–4c.

165. Woywodt A. Circulating endothelial cells are a novel marker of cyclosporine-induced endothelial damage. / A. Woywodt, M. Schroeder, M. Mengel, A. Schwarz, W. Gwinner, H. Haller, M. Haubitz // *Hypertens. (Dallas, Tex. 1979)* – 2003. – Т. 41– № 3 Pt 2– 720–3c.
166. Woywodt A. Circulating endothelial cells as markers for ANCA-associated small-vessel vasculitis. / A. Woywodt, F. Streiber, K. de Groot, H. Regelsberger, H. Haller, M. Haubitz // *Lancet (London, England)* – 2003. – Т. 361 – № 9353– 206–10c.
167. Wu C. Increased frequencies of T helper type 17 cells in the peripheral blood of patients with acute myeloid leukaemia. / C. Wu, S. Wang, F. Wang, Q. Chen, S. Peng, Y. Zhang, J. Qian, J. Jin, H. Xu // *Clin. Exp. Immunol.* – 2009. – Т. 158 – № 2– 199–204c.
168. Wysocki C.A. Leukocyte migration and graft-versus-host disease / C. A. Wysocki, A. Panoskaltis-Mortari, B. R. Blazar, J. S. Serody // *Blood* – 2005. – Т. 105 – № 11– 4191–4199c.
169. YAN Z. Increased numbers of circulating ECs are associated with systemic GVHD / Z. YAN, L. ZENG, L. JIA, S. XU, S. DING // *Int. J. Lab. Hematol.* – 2011. – Т. 33 – № 5– no-noc.
170. Yang L. IL-21 and TGF-beta are required for differentiation of human T(H)17 cells. / L. Yang, D. E. Anderson, C. Baecher-Allan, W. D. Hastings, E. Bettelli, M. Oukka, V. K. Kuchroo, D. A. Hafler // *Nature* – 2008. – Т. 454 – № 7202– 350–2c.
171. Yi T. Absence of donor Th17 leads to augmented Th1 differentiation and exacerbated acute graft-versus-host disease / T. Yi, D. Zhao, C.-L. Lin, C. Zhang, Y. Chen, I. Todorov, T. LeBon, F. Kandeel, S. Forman, D. Zeng // *Blood* – 2008. – Т. 112 – № 5– 2101–2110c.
172. Zhang C. Cyclosporin A inhibits the production of IL-17 by memory Th17 cells from healthy individuals and patients with rheumatoid arthritis / C. Zhang, J. Zhang, B. Yang, C. Wu // *Cytokine* – 2008. – Т. 42 – № 3– 345–352c.
173. The 2012 revised edition of the EBMT-ESH Handbook on Haematopoietic Stem Cell Transplantation // под ред. Т.М. J. Apperley, E. Carreras, E. Gluckman. – – forum service editore, 2012. Вып. 6– 683c.

Приложение

Графики средних величин и индивидуальные графики с усредненной регрессионной кривой третьего порядка

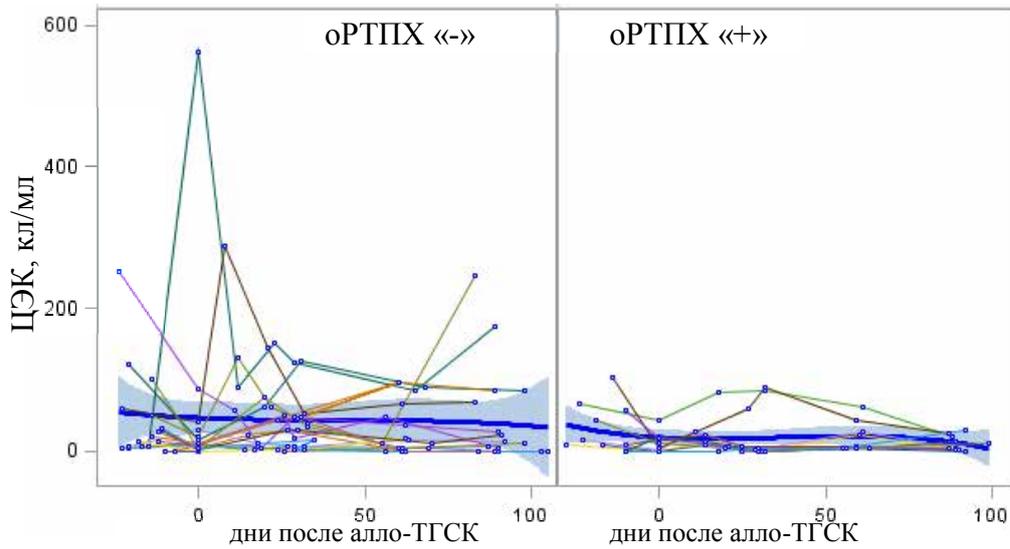


Рисунок 15. Индивидуальные графики и усредненная регрессионная кривая третьего порядка динамики ЦЭК у пациентов после алло-ТГСК в зависимости от развития ОРТПХ.

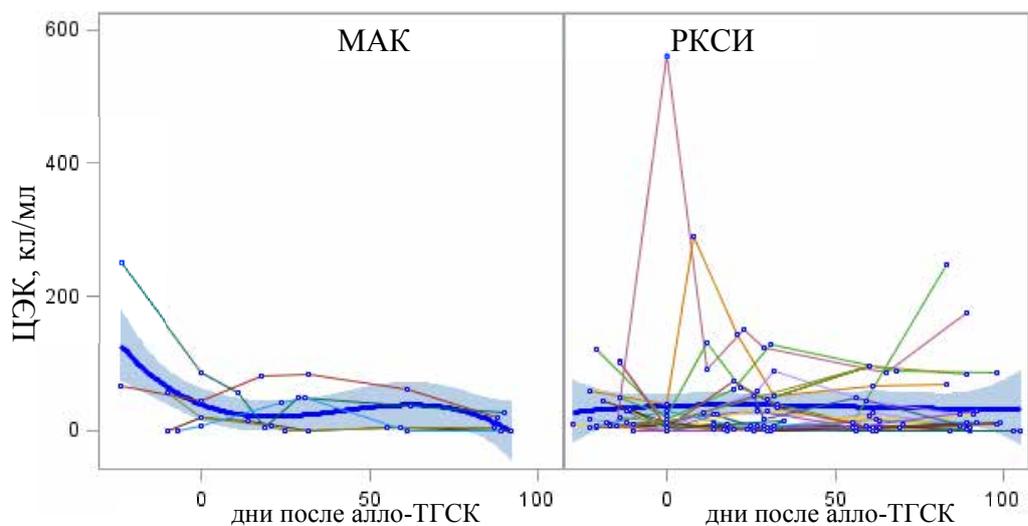


Рисунок 17. Индивидуальные графики и усредненная регрессионная кривая третьего порядка динамики ЦЭЖ у пациентов после алло-ТГСК в зависимости от вида предтрансплантационного кондиционирования.

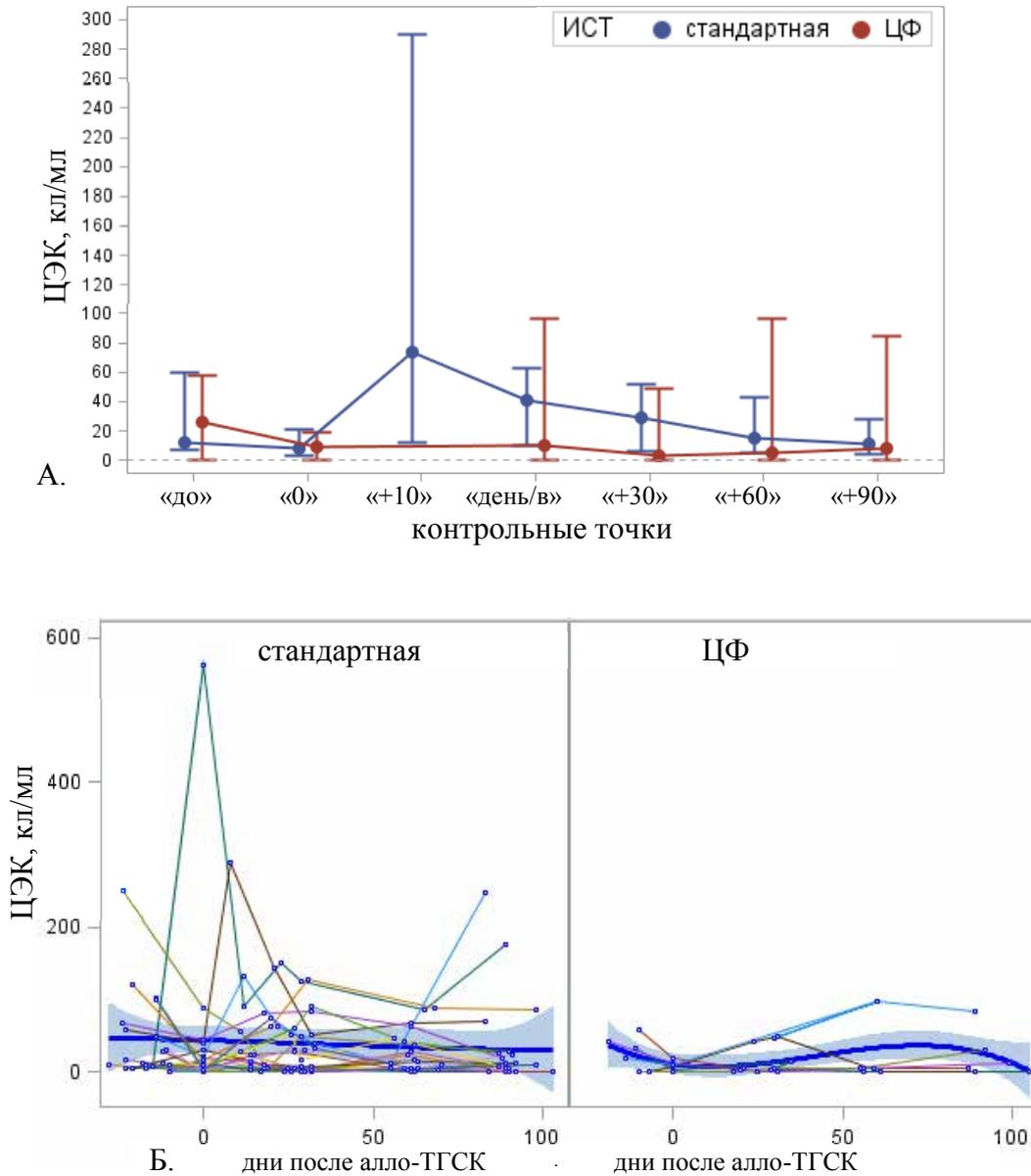
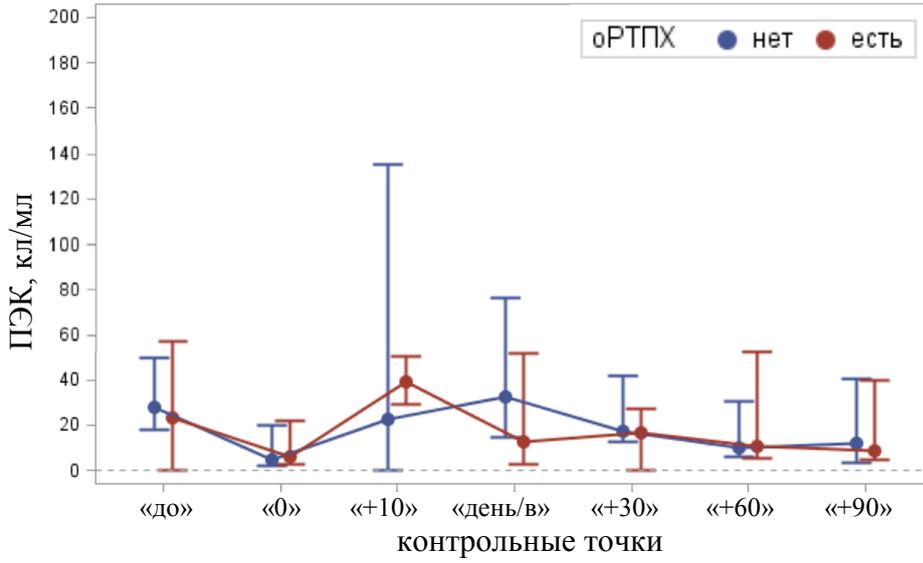
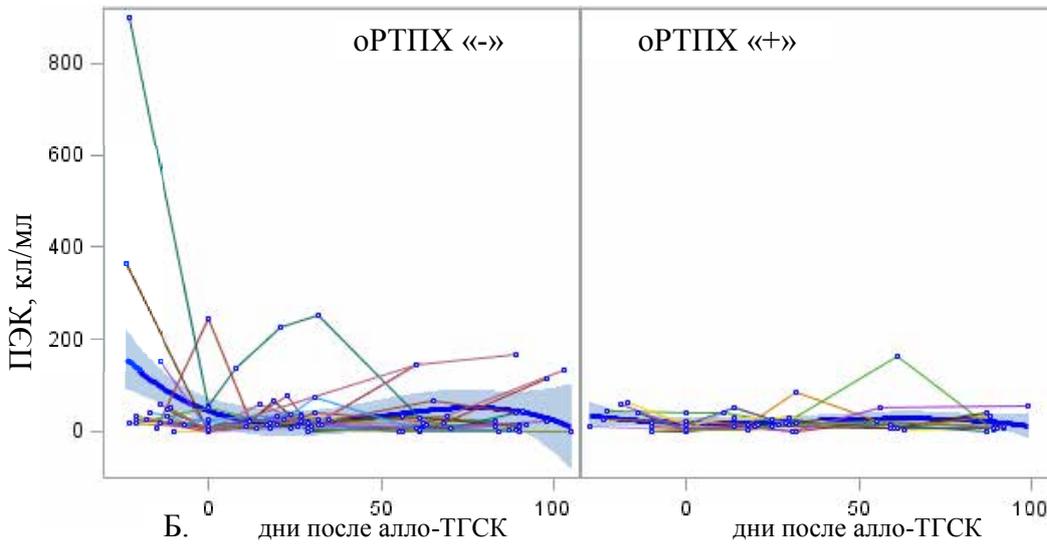


Рисунок 18 А, Б. Динамика ЦЭК у пациентов после алло-ТГСК в зависимости от иммуносупрессивной терапии (стандартная ИСТ, посттрансплантационный ЦФ). А – по вертикальной оси отложены медианы с 95% доверительными интервалами, по горизонтальной контрольные временные точки; Б – индивидуальные графики и усредненная регрессионная кривая третьего порядка.

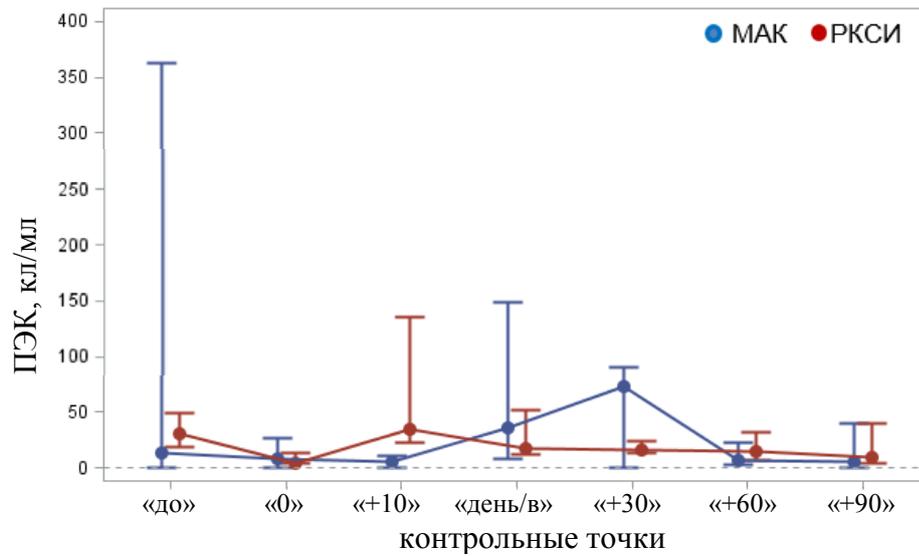


А.

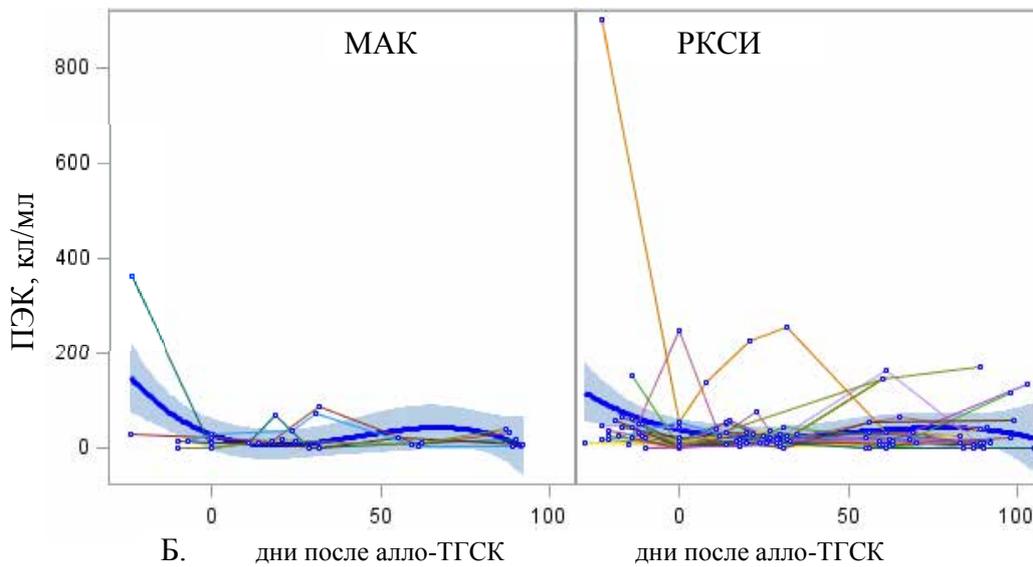


Б.

Рисунок 19 А, Б. Динамика ПЭК у пациентов после алло-ТГСК в зависимости от развития ОРТПХ. А – по вертикальной оси отложены медианы с 95% доверительными интервалами, по горизонтальной контрольные временные точки.; Б – индивидуальные графики и усредненная регрессионная кривая третьего порядка.



А.



Б. дни после алло-ТГСК

дни после алло-ТГСК

Рисунок 20 А, Б. Динамика ПЭК у пациентов после алло-ТГСК в зависимости от вида предтрансплантационного кондиционирования. А – по вертикальной оси отложены медианы с 95% доверительными интервалами, по горизонтальной – контрольные временные точки; Б – индивидуальные графики и усредненная регрессионная кривая третьего порядка.

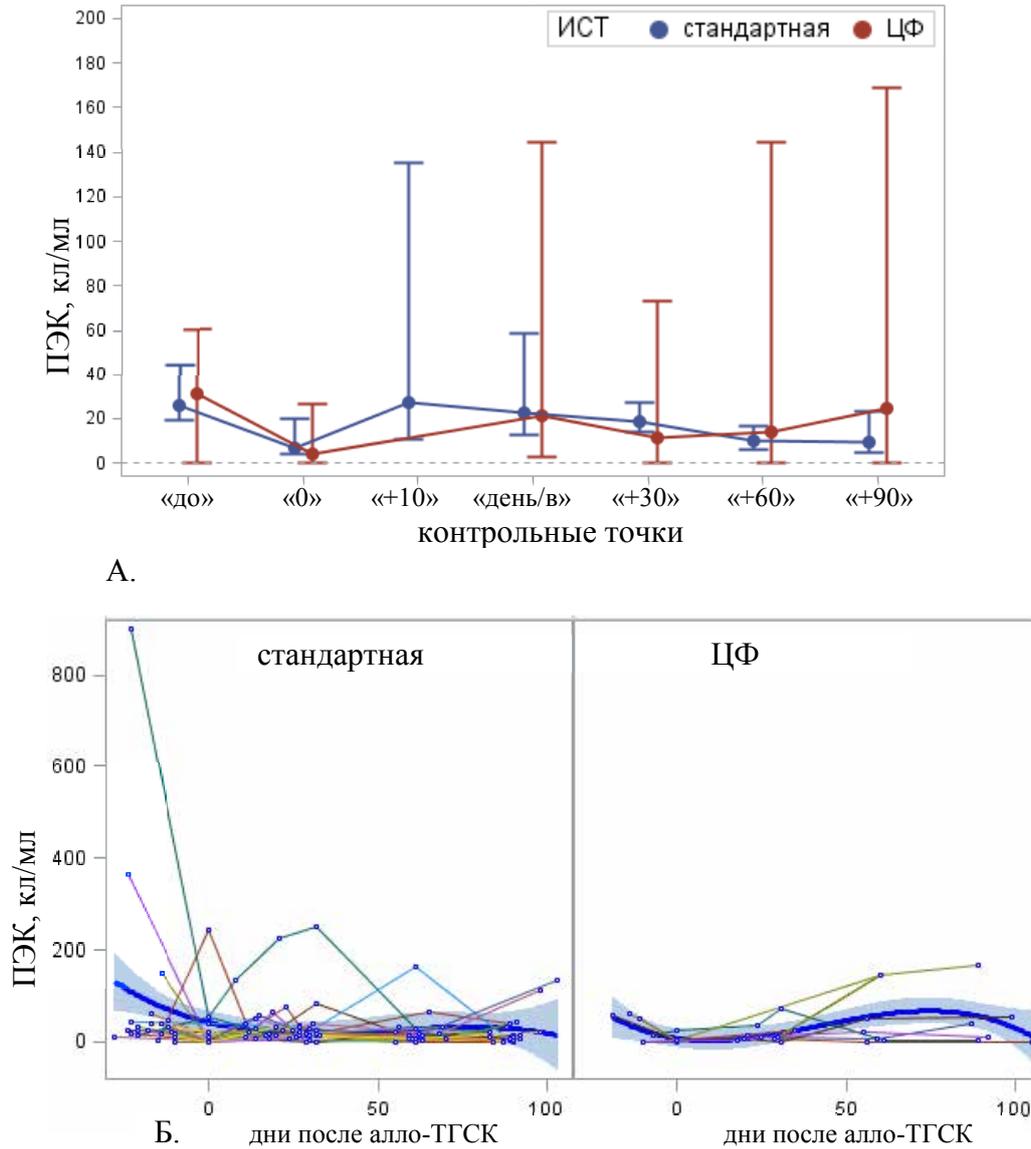


Рисунок 21 А, Б. Динамика ПЭК у пациентов после алло-ТГСК в зависимости от иммуносупрессивной терапии. А – по вертикальной оси отложены медианы с 95% доверительными интервалами, по горизонтальной – контрольные временные точки; Б – индивидуальные графики и усредненная регрессионная кривая третьего порядка.

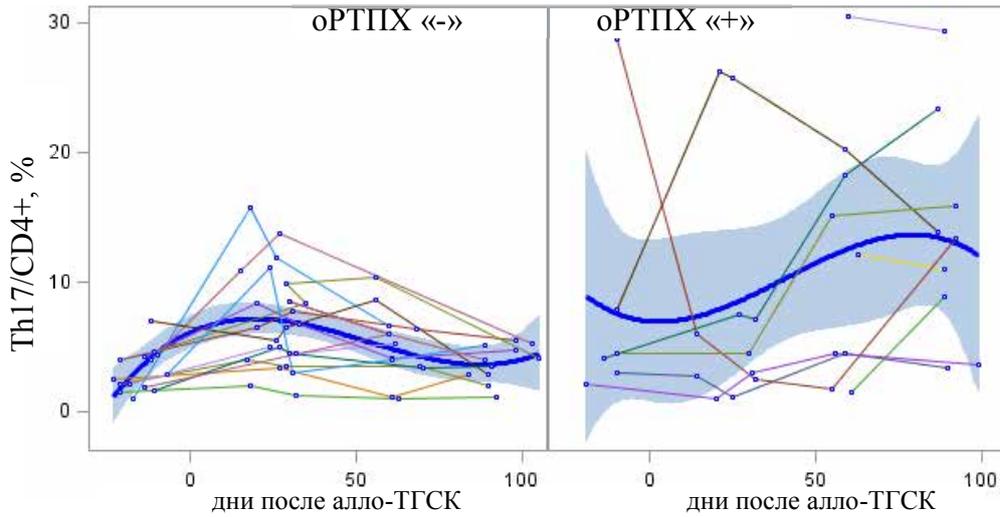


Рисунок 23. Индивидуальные графики и усредненная регрессионная кривая третьего порядка динамики Th17 популяции у пациентов после алло-ТГСК в зависимости от развития oRTPX.

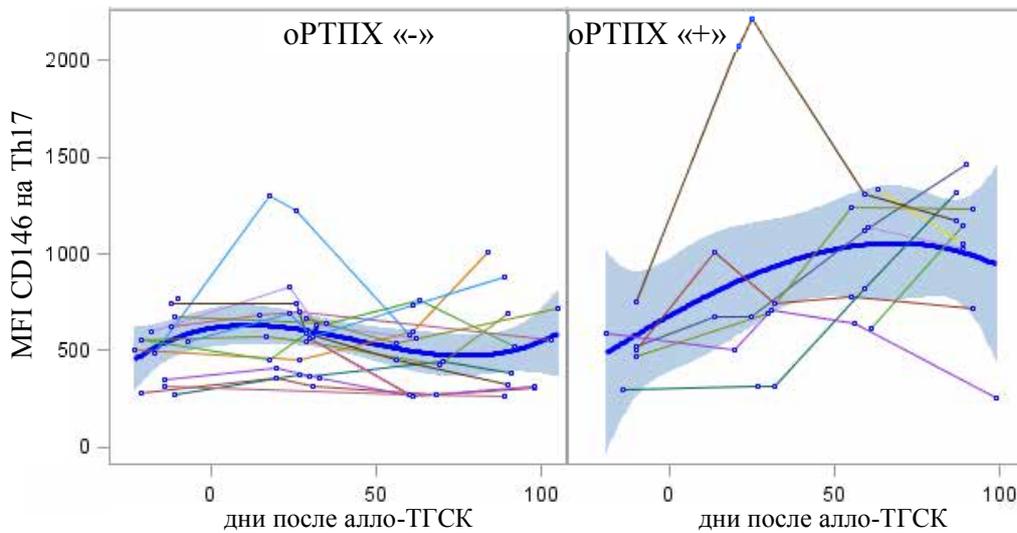


Рисунок 25. Индивидуальные графики и усредненная регрессионная кривая третьего порядка динамики MFI MSAM на поверхности Th17 у пациентов после алло-ТГСК в зависимости от развития oRTPX.

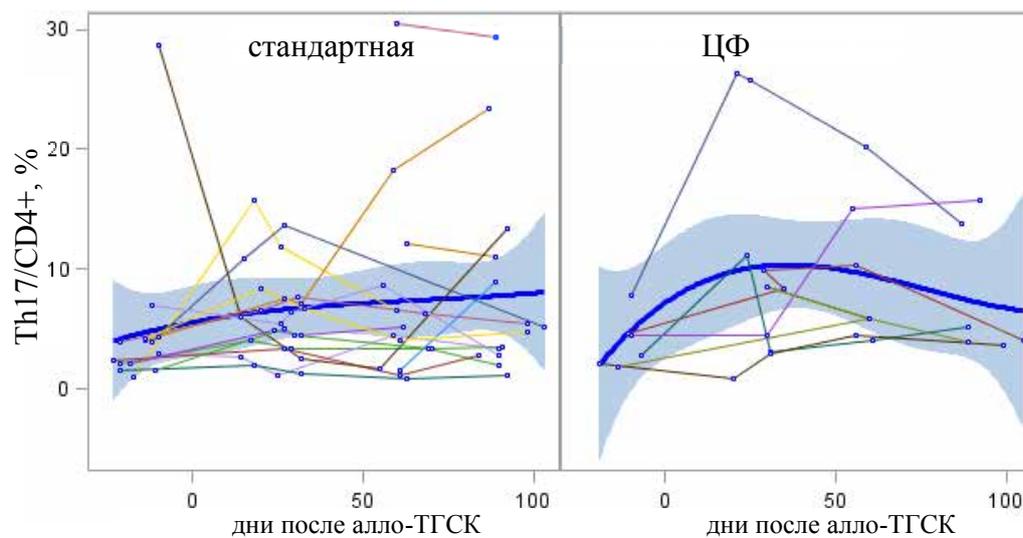
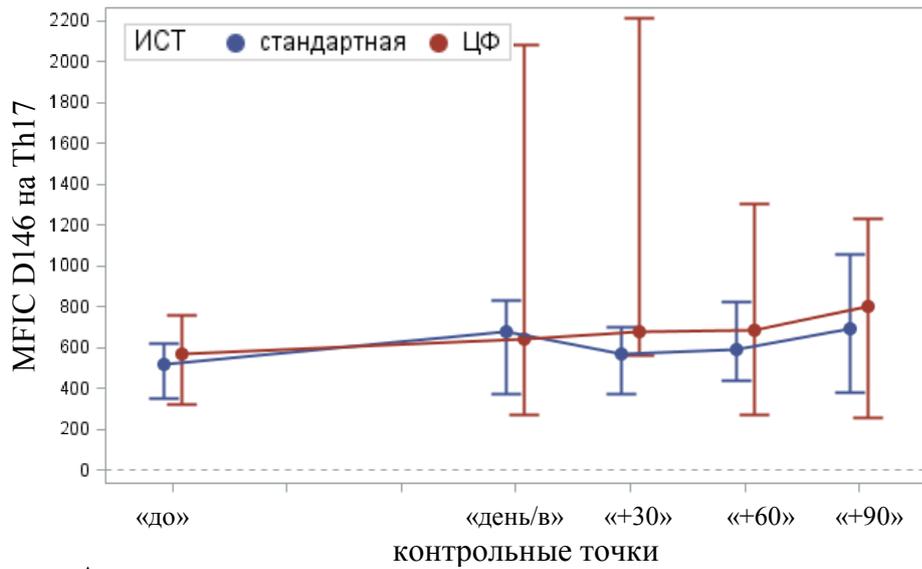
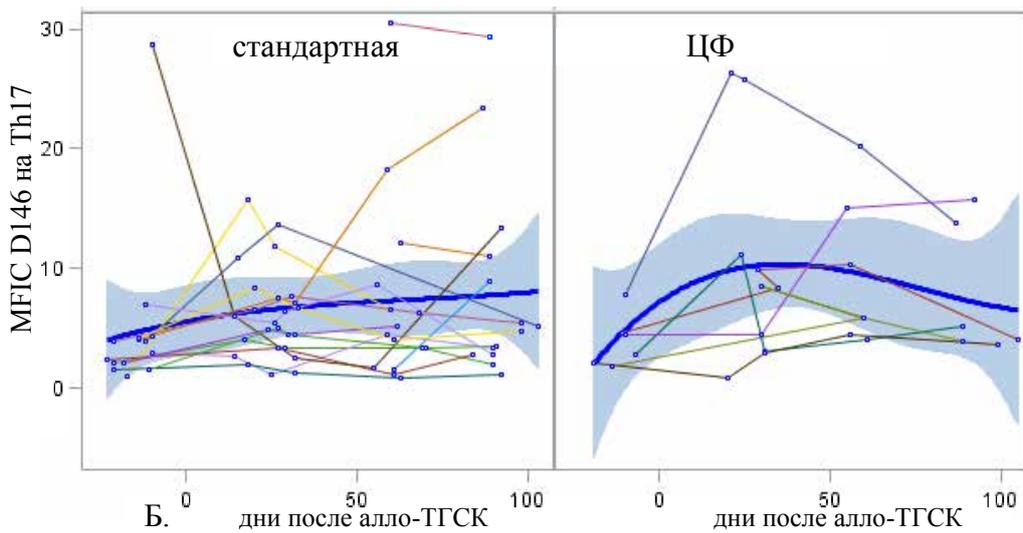


Рисунок 27. Индивидуальные графики и усредненная регрессионная кривая третьего порядка динамики Th17 популяции у пациентов после алло-ТГСК в зависимости от иммуносупрессивной терапии.



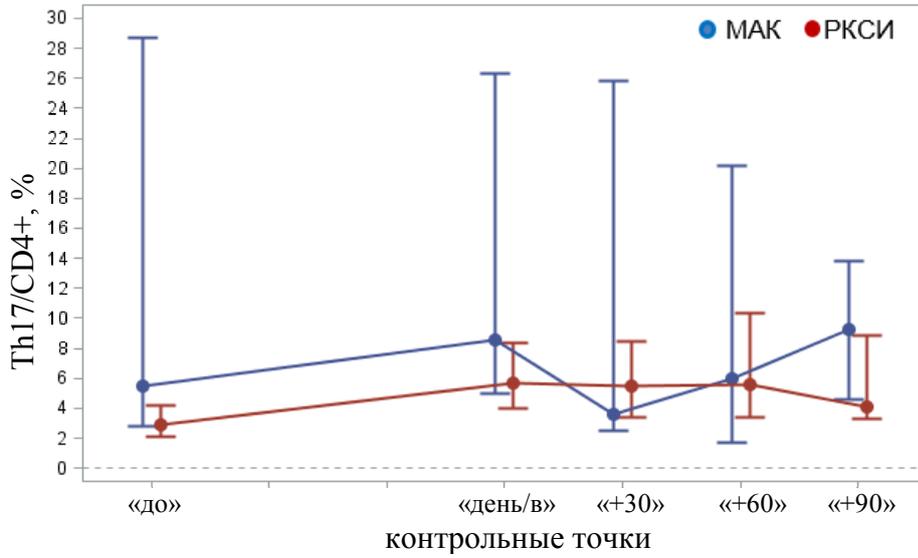
А.



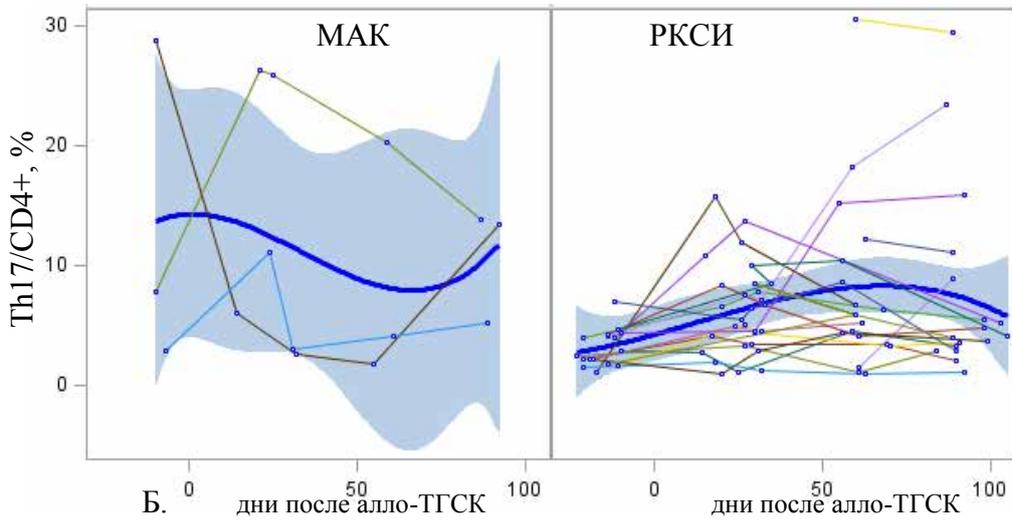
Б. дни после алло-ТГСК

дни после алло-ТГСК

Рисунок 28 А, Б. Динамика MFI МСАМ на поверхности Th17 у пациентов после алло-ТГСК в зависимости от иммуносупрессивной терапии. А – по вертикальной оси отложены медианы с 95% доверительными интервалами, по горизонтальной контрольные временные точки; Б – индивидуальные графики и усредненная регрессионная кривая третьего порядка.



А.



Б.

Рисунок 29 А, Б. Динамика Th17 популяции у пациентов после алло-ТГСК в зависимости от предтрансплантационного кондиционирования. А – по вертикальной оси отложены медианы с 95% доверительными интервалами, по горизонтальной – контрольные временные точки; Б – индивидуальные графики и усредненная регрессионная кривая третьего порядка.

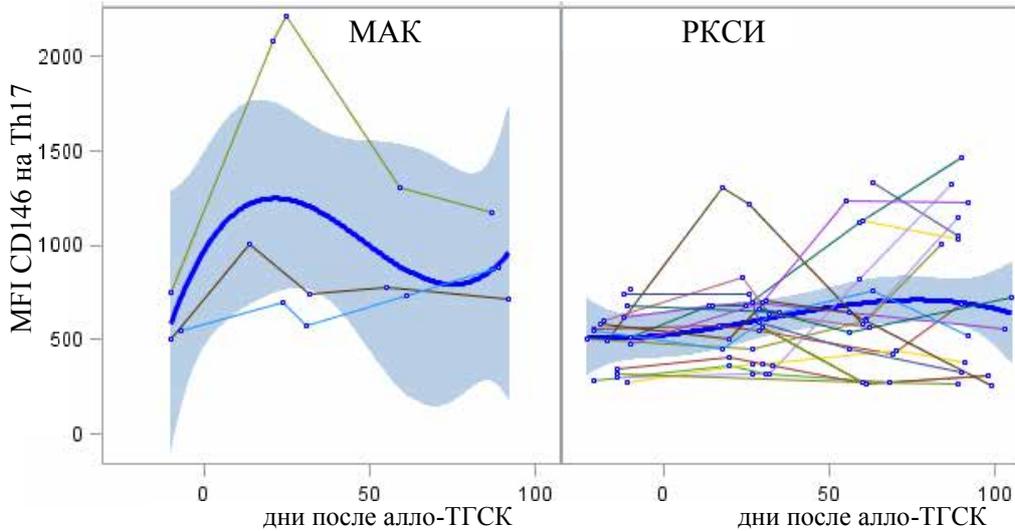


Рисунок 31. Индивидуальные графики и усредненная регрессионная кривая третьего порядка динамики MFI MSAM на поверхности Th17 у пациентов после алло-ТГСК в зависимости от предтрансплантационного кондиционирования.

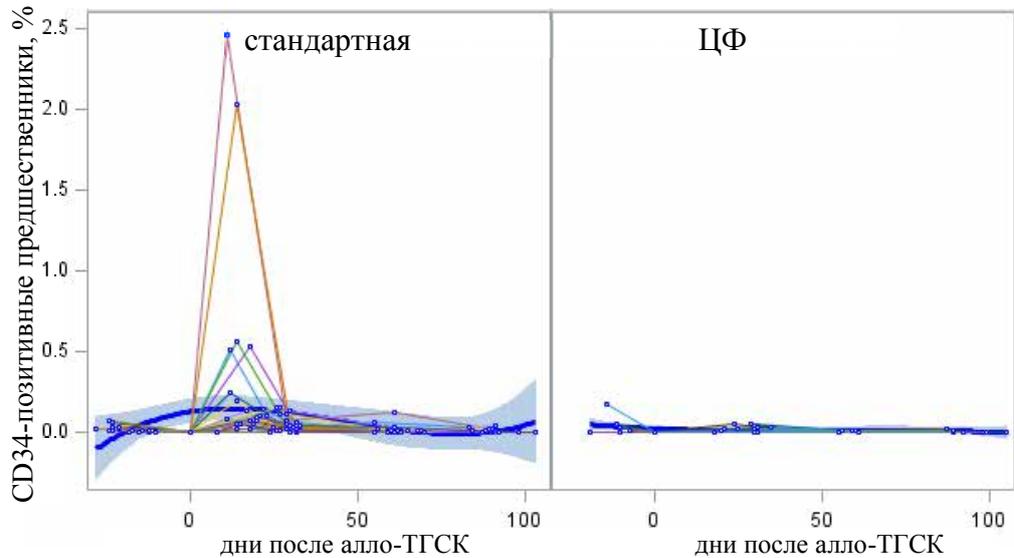


Рисунок 33. Индивидуальные графики и усредненная регрессионная кривая третьего порядка динамики CD34-позитивных предшественников (%), у пациентов после алло-ТГСК в зависимости от иммуносупрессивной терапии.

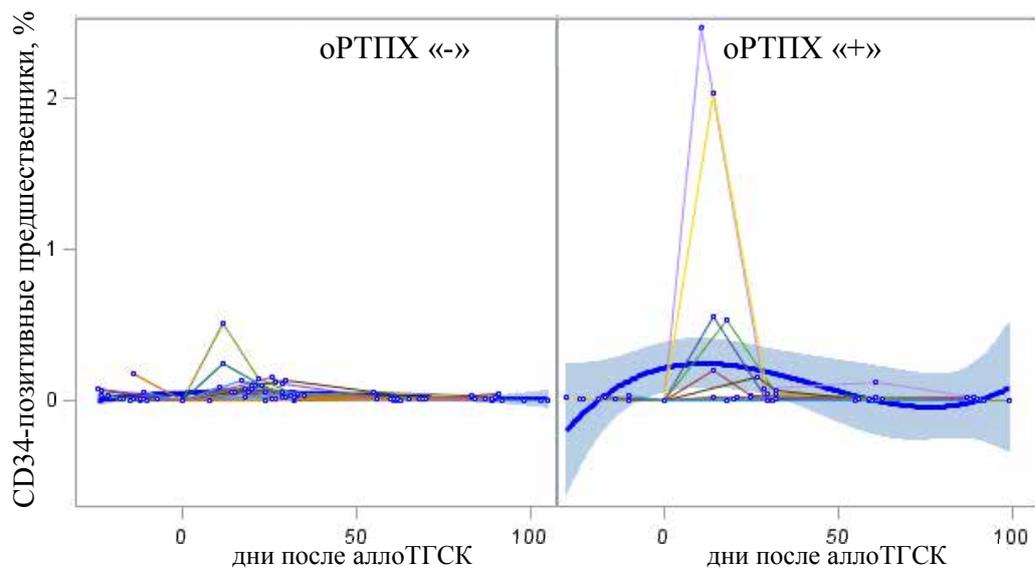
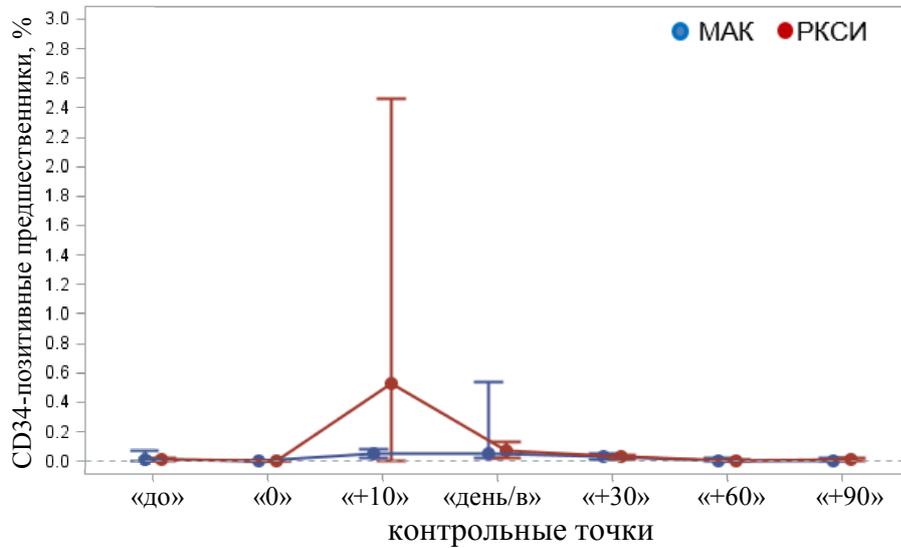


Рисунок 35. Индивидуальные графики и усредненная регрессионная кривая третьего порядка динамики CD34-позитивных предшественников (%), у пациентов после алло-ТГСК в зависимости от развития oRTPX.



А.

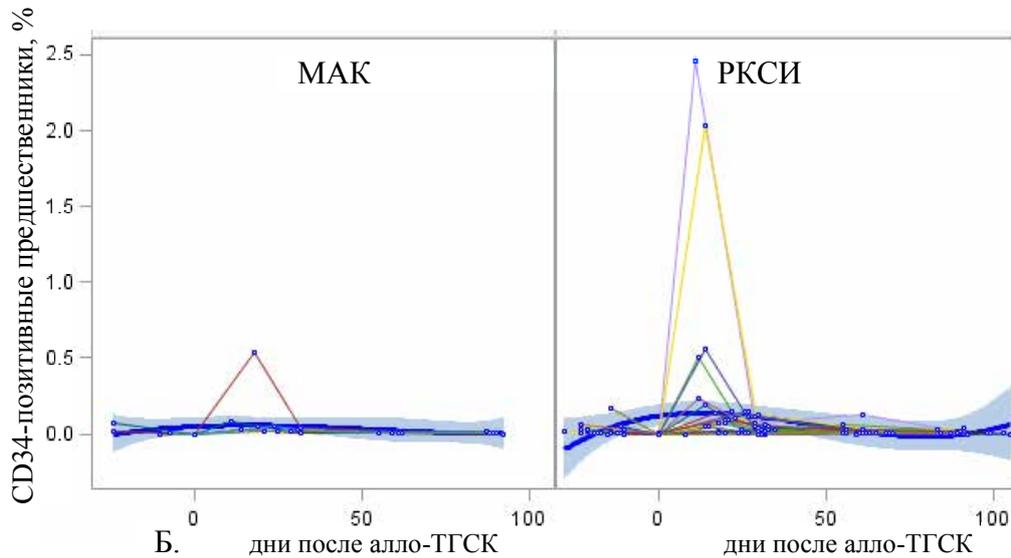


Рисунок 36 А, Б. Динамика CD34-позитивных предшественников (%), у пациентов после алло-ТГСК в зависимости от варианта предтрансплантационного кондиционирования. А – по вертикальной оси отложены медианы с 95% доверительными интервалами, по горизонтальной контрольные временные точки; Б – индивидуальные графики и усредненная регрессионная кривая третьего порядка.