

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный медицинский исследовательский центр гематологии»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

На правах рукописи

Дубняк Дарья Станиславовна

**Роль химеризма в субпопуляциях Т-хелперов у больных острыми лейкозами
после трансплантации аллогенных стволовых кроветворных клеток**

3.1.28 – гематология и переливание крови

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научные руководители:
доктор биологических наук Судариков Андрей Борисович
кандидат медицинских наук Дроков Михаил Юрьевич

Москва, 2023

Оглавление

Оглавление	2
Введение	5
Актуальность темы исследования.....	5
Степень разработанности темы исследования.....	6
Цель исследования.....	6
Задачи исследования	7
Научная новизна	7
Практическая значимость работы	8
Методология и методы исследования	8
Положения, выносимые на защиту.....	8
Степень достоверности и апробации результатов	9
Объем и структура диссертации	10
Глава 1. Обзор литературы	11
1.1 Общие сведения о трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток.....	11
1.2 История открытия Т-регуляторных клеток.....	12
1.3 Биология Т-регуляторных клеток	15
1.4 Иммунологическая толерантность.....	16
1.5 Центральная толерантность.....	17
1.6 Острая реакция «трансплантат против хозяина»	18
1.7 Профилактика острой реакции «трансплантат против хозяина»	20
1.8 Роль Т-регуляторных клеток в развитии острой реакции «трансплантат против хозяина»	23
1.9 Понятие и классификация видов химеризма	24
1.10 Методы исследования химеризма.....	26
1.11 Связь смешанного химеризма и рецидива заболевания	29
1.12 Применение высокодозного циклофосфамида и его влияние на развитие иммунологических осложнений.....	31
1.13 Заключение	34
Глава 2. Материалы и методы.....	35
2.1 Клиническая характеристика больных	35
2.2 Предтрансплантационное кондиционирование.....	36
2.3 Варианты трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток.....	36

2.4 Профилактика острой реакции «трансплантат против хозяина»	37
2.5 Пробоподготовка	39
2.6 Магнитная сепарация	40
2.7 Магнитная сепарация CD4 ⁺ CD25 ⁻ Т-клеток	41
2.8 Селекция CD4 ⁺ CD25 ⁺ Т-клеток	41
2.9 Позитивная селекция CD4 ⁺ CD25 ⁺ клеток	41
2.10 Многоцветная проточная цитометрия	42
2.11 Экстракция ДНК. Полимеразная цепная реакция с панелью праймеров к локусам коротких tandemных повторов (short tandem repeat) человека	44
2.12 Измерение концентрации выделенной ДНК.....	45
2.13 ПЦР амплификация и анализ STR-профилей методом капиллярного электрофореза.....	45
2.14 Определение доли геномной ДНК донора и реципиента в исследуемых образцах (мониторинг химеризма)	48
2.15 Статистическая обработка данных	53
Глава 3. Результаты исследования и обсуждения	55
3.1 Клинические результаты.....	55
3.2 Взаимосвязь значений химеризма в клетках костного мозга и различных популяциях Т-клеток периферической крови.....	57
3.3 Характеристика химеризма в костном мозге и субпопуляциях CD4 ⁺ CD25 ⁻ , CD4 ⁺ CD25 ⁺ Т-клеток после трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток у больных с различными вариантами острого лейкоза	59
3.4 Химеризм в костном мозге и в субпопуляциях CD4 ⁺ CD25 ⁻ , CD4 ⁺ CD25 ⁺ Т-клеток после трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток у больных с острыми лейкозами с различным статусом заболевания	62
3.5 Химеризм в костном мозге и в субпопуляциях CD4 ⁺ CD25 ⁻ , CD4 ⁺ CD25 ⁺ Т-клеток после трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток у больных с острыми лейкозами после кондиционирования различной интенсивности	66
3.6 Химеризм в костном мозге и в субпопуляциях CD4 ⁺ CD25 ⁻ , CD4 ⁺ CD25 ⁺ клеток в зависимости от вида донора	68
3.7 Характеристика химеризма в костном мозге, CD4 ⁺ CD25 ⁻ клетках, CD4 ⁺ CD25 ⁺ клетках в зависимости от источника трансплантата.....	70
3.8 Характеристика химеризма в костном мозге, CD4 ⁺ CD25 ⁻ клетках, CD4 ⁺ CD25 ⁺ клетках в зависимости от режима иммуносупрессивной терапии	74
3.9 Характеристика химеризма в костном мозге, CD4 ⁺ CD25 ⁺ клетках, CD4 ⁺ CD25 ⁻ клетках в зависимости от развития рецидива после трансплантации.....	77

3.10 Характеристика химеризма в костном мозге, CD4 ⁺ CD25 ⁺ клетках, CD4 ⁺ CD25 ⁻ клетках в зависимости от развития острой реакции «трансплантат против хозяина»	80
3.11 Влияние смешанного химеризма в костном мозге, CD4 ⁺ CD25 ⁺ клетках CD4 ⁺ CD25 ⁻ клетках на развитие острой реакции «трансплантат против хозяина», ассоциированной с отменой иммуносупрессивной терапии.....	82
3.12 Динамика химеризма в отдельных популяциях в зависимости от вида профилактики и сроков развития острой реакции «трансплантат против хозяина»	89
3.13 Оценка влияния клинического использования лошадиного	91
антитимоцитарного глобулина на вероятность развития острой реакции «трансплантат против хозяина» в сравнении с методами профилактики, основанными на посттрансплантационном циклофосфамиде	91
Глава 4. Обсуждение	99
Глава 5. Заключение.....	105
Глава 6. Выводы.....	107
Практические рекомендации.....	108
Список сокращений.....	109
Список литературы.....	111

Введение

Актуальность темы исследования

Трансплантация аллогенных гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК) является методом терапии, позволяющим достичь не только ремиссии заболевания, но и биологического излечения у пациентов с заболеваниями системы крови.

Острая реакция «трансплантат против хозяина» (оРТПХ), а также рецидив основного заболевания остаются главными из нерешенных проблем, приводящим к инвалидизации и смерти после алло-ТГСК. В последние годы отмечается уменьшение развития оРТПХ, что, вероятно, связано с улучшением режимов профилактики. По данным литературы приблизительно у 50% пациентов после алло-ТГСК развивается оРТПХ, в свою очередь оРТПХ III – IV степени констатируется приблизительно у 10% больных [142].

Рецидив заболевания после алло-ТГСК у больных с диагнозом острый лейкоз развивается у 30 – 40% пациентов и остается одной из ведущих причин гибели пациентов [25; 182].

В основе развития оРТПХ лежит иммунный ответ и его регуляция в том числе и специализированными Т-клетками – Т-регуляторными клетками (Т-рег). Несмотря на то, что Т-рег были открыты более 20 лет назад, до сих пор изучение этой клеточной популяции представляет широкий интерес в научном сообществе, а их клиническая значимость окончательно не определена. Как известно, по данным литературы Т-рег клетки играют важную роль в индукции и поддержании иммунологической толерантности. Они контролируют развитие оРТПХ при сохранении эффекта реакции «трансплантат против лейкоза» (РТПЛ) [33]. Развитие оРТПХ ассоциировано с уменьшением общего числа Т-рег [64; 141].

В ФГБУ «НМИЦ гематологии» МЗ РФ исследовали экспрессию гранзима В в CD4⁺ лимфоцитах и Т-рег у пациентов после алло-ТГСК [66]. Было доказано, что уменьшение доли гранзим В-позитивных Т-рег ассоциировано с развитием оРТПХ.

В большинстве случаев развитию отторжения/рецидива предшествует период нарастания кроветворения «хозяина» хотя бы в одной из клеточных популяций. Развитие же оРТПХ практически всегда происходит на фоне 100% донорского кроветворения [14].

В 2005 г. группой исследователей [112] было показано, что смешанный химеризм в CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетках на 7 и 10 дни после алло-ТГСК ассоциирован с развитием оРТПХ в первые 3 месяца после трансплантации.

Таким образом, проведенные исследования в данной области не отображают в полной мере химерный статус популяций, которые реализуют и регулируют иммунный ответ при развитии оРТПХ.

Степень разработанности темы исследования

В настоящее время представлено некоторое количество исследований, посвященных изучению клеточных популяций после алло-ТГСК, в том числе и Т-клеток. В отечественной литературе представлены единичные работы по оценке химеризма в субпопуляциях. В связи с этим представляется важным изучить химеризм в субпопуляциях Т-клеток для понимания биологии развития иммунологических осложнений и вероятности их развития.

Цель исследования

Проанализировать химеризм в субпопуляциях Т-хелперов у больных острыми лейкозами в первые 3 месяца после алло-ТГСК.

Задачи исследования

1. Сопоставить химеризм в клетках костного мозга и в субпопуляциях Т-хелперов периферической крови между собой на разных этапах после алло-ТГСК.
2. Проанализировать ассоциацию различных факторов, таких как источник трансплантата, совместимость донора и реципиента по человеческим лейкоцитарным антигенам (HLA), режим кондиционирования, схемы иммуносупрессивной терапии с химеризмом в субпопуляциях Т-хелперов периферической крови.
3. Оценить вероятность развития рецидива в зависимости от химеризма в различных субпопуляциях Т-хелперов периферической крови.
4. Исследовать связь между химеризмом в различных субпопуляциях Т-хелперов периферической крови и оРТПХ.
5. Ретроспективно оценить вероятность развития оРТПХ у больных с острыми лейкозами, которым алло-ТГСК была выполнена в период с 2014 по 2020 гг.

Научная новизна

Впервые изучено влияние применения лошадиного антитимоцитарного глобулина (лАТГ) 40 мг/кг в -4, -3, -2, -1 дни и посттрансплантационного циклофосфида (ПТ-ЦФ) в дозе 50 мг/кг/сут на +3, +4 дни после трансплантации на химеризм в популяциях Т-рег и Т-конвенциональных клеток (Т-кон). Изучены механизмы развития поздней оРТПХ при использовании лАТГ без сочетания с ПТ-ЦФ.

Практическая значимость работы

Прогнозирование развития оРТПХ и биологическое обоснование выбора протокола профилактики для предотвращения развития этого осложнения у реципиентов аллогенных гемопоэтических стволовых клеток.

1. Применение ПТ-ЦФ в качестве иммуносупрессивной терапии у всех пациентов после алло-ТГСК вне зависимости от HLA-совместимости донора.

2. У пациентов с донорским химеризмом менее 82,5% среди Т-рег значимо повышается риск развития поздней оРТПХ.

Методология и методы исследования

Перед началом исследования проведено планирование работы, создана электронная база данных для сбора информации о включенных больных. Проанализирован большой объем отечественных и зарубежных публикаций и исследований, посвященных изучению химеризма после алло-ТГСК.

При выполнении данной работы применялись иммунофенотипические и молекулярные методы исследования. Анализ полученных данных был осуществлен с использованием статистической обработки.

Положения, выносимые на защиту

1. При использовании ЛАТГ без сочетания с ПТ-ЦФ в качестве профилактики оРТПХ у пациентов с острыми лейкозами, не происходит адекватной лимфодеплеции, что впоследствии оказывает влияние на химеризм в популяции Т-рег и Т-кон.

2. Применение ПТ-ЦФ в дозе 50 мг/кг/сут на +3, +4 день после алло-ТГСК позволяет достичь полного донорского химеризма как в клетках костного мозга,

так и в отдельных популяциях Т-клеток периферической крови (Т-рег и Т-кон), что позволяет снизить риск реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ).

3. Смешанный химеризм как в костном мозге, так и в отдельных популяциях Т-клеток периферической крови (Т-рег и Т-кон) спустя 3 месяца после алло-ТГСК ассоциирован с развитием оРТПХ на фоне начала отмены иммуносупрессивной терапии.

Степень достоверности и апробации результатов

Достоверность полученных результатов основана на изучении достаточного объема научной литературы и примененной методологии исследования, многоступенчатого статистического анализа данных.

Апробация работы состоялась 05 декабря 2022 года на заседании проблемной комиссии ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России «Фундаментальные и клинические исследования в гематологии; проблемы клинической и производственной трансфузиологии» (протокол №12).

Анализ промежуточных результатов представлен в виде устных и постерных докладов на Российских и международных конференциях: XI и XIV Международных симпозиумах памяти Р.М. Горбачевой «Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток. Генная и клеточная терапия» (г. Санкт-Петербург, 2017 и 2020 гг.); IV, V и VI Конгрессах гематологов России (г. Москва, 2018, 2020, 2021 гг.), 23-м конгрессе Европейской гематологической ассоциации (г. Стокгольм, 2018г), 9-ом ежегодном собрании Общества гематологической онкологии (SOHO 2021г).

По теме диссертации опубликовано 15 работ, из них 2 статьи в журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Министерства образования и науки РФ. Одна статья опубликована в иностранном журнале, 12 тезисных сообщений.

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа изложена на 131 странице машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов собственных исследований, обсуждения, заключения, выводов, списка литературы. Работа иллюстрирована 24 рисунками, содержит 9 таблиц. Список литературы включает 194 литературных источников: 6 отечественных и 188 зарубежных источников.

Глава 1. Обзор литературы

1.1 Общие сведения о трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток

Алло-ТГСК является терапией выбора при многих заболеваниях системы крови. В настоящее время это единственный метод лечения, который позволяет достичь биологического излечения от заболевания [2].

При алло-ТГСК важную роль играет иммунологическая толерантность. Под толерантностью принято понимать состояние, при котором иммунная система не вырабатывает физиологический ответ на антигены реципиента после алло-ТГСК при том, что происходит ответ на бактериальные, вирусные и другие антигены [172]. Неразрывно понятие толерантности связано и с понятием химеризма. В последние десятилетия ведутся активные научные исследования в области трансплантации, которые направлены на изучение баланса между иммунологической толерантностью и стабильным химеризмом, позволяющего функционировать иммунной системе донора и реципиента [33; 170; 185].

Сама процедура трансплантации включает в себя предтрансплантационное кондиционирование и последующую трансфузию трансплантата, содержащего гемопоэтические клетки здорового донора. Однако трансплантат содержит не только гемопоэтические стволовые клетки, способные быстро восстанавливать гемопоэз, но также иммунокомпетентные клетки, включая Т-клетки [38]. Донорские Т-клетки на ранних этапах облегчают приживление гемопоэтических стволовых клеток за счет лимфокинов, необходимых для дифференциации и пролиферации донорских стволовых клеток [55; 95], а также защищают реципиентов от оппортунистических инфекций и выполняют задачу по элиминации остаточных опухолевых клеток реципиента через так называемый эффект «трансплантат против лейкоза» [7; 147].

Известно, что Т-клетки являются главными «игроками» в осуществлении иммунных реакций против собственных и чужеродных антигенов, а также в

поддержании иммунологического гомеостаза [177]. Негативным аспектом является то, что Т-клетки донора имеют способность вызывать иммуноопосредованное повреждение органов у реципиента – РТПХ, что, по сути, является нормальной физиологической реакцией на чужеродные антигены, однако представляет опасность с клинической точки зрения [12; 122; 134; 140].

Среди Т-клеток присутствуют и те, которые регулируют развитие и силу аллоиммунной реакции после алло-ТГСК. Т-рег – это субпопуляция Т-клеток хелперов, осуществляющая регуляцию иммунного ответа [152; 179].

Именно баланс между РТПЛ и РТПХ, т.е. регуляция аллоиммунных процессов остается одной из главных проблем в трансплантационной иммунологии.

1.2 История открытия Т-регуляторных клеток

В 1970 г. Gershon и Kondo впервые идентифицировали Т-супрессорные клетки. В их работе мышам после тимэктомии вводили эритроциты барана, что в итоге приводило к специфической толерантности, невосприимчивости к последующему введению антигена. Это являлось подтверждением, что при определенных условиях антиген, распознаваемый Т-клетками, индуцирует клетки способные подавлять иммунный ответ [65]. Однако дальнейшее исследование этих супрессорных Т-клеток было затруднено в связи с фенотипической схожестью с другими Т-клетками.

В 1975 г. было опубликовано исследование, подтверждающее роль клеток, происходящих из тимуса, участвующих в регуляции аутоиммунных реакций. В этой работе крысам выполняли тимэктомию с последующим рентгеновским облучением в объеме трех доз по 200 рад, что приводило к избирательной деплеции Т-клеток и впоследствии к развитию тяжелых тиреоидитов [124].

В 1982 г. Sakaguchi с коллегами продемонстрировали, что тимэктомия у новорожденных мышей на 3-й день приводила к аутоиммунному оофориту, однако

однократная внутрибрюшинная инъекция клеток селезенки или тимоцитов от мышей с тимусом предотвращало развитие данного аутоиммунного процесса [151]. Это позволило сделать предположение о существовании супрессорных Т-клеток, «уравновешивающих» аутореактивность. Дальнейшее изучение этой субпопуляции Т-клеток у мышей показало, что перенос мышам клеток селезенки, в которых было произведено селективное удаление этой популяции Т-клеток, приводило к органоспецифическим аутоиммунным заболеваниям, таким как тиреоидит, орхит, оофорит и гастрит [117].

Rowrie и Mason в 1990 г. продемонстрировали, что у мышей с синдромом тяжелого иммунодефицита при введении $CD4^+CD45RB^{high}$ Т-лимфоцитов развивалось тяжелое воспалительное заболевание кишечника, в то время как у животных, получавших $CD4^+CD45RB^{low}$ Т-лимфоциты или обе популяции, не развивалось аллоиммунного поражения кишечника [133].

Важной проблемой оставалось определение фенотипа Т-рег. В начале 2000-х годов было сделано открытие, что рецептор к интерлейкину-2 (IL-2 (CD25)) критически важен для развития и поддержания Т-рег [74]. У мышей с генетическим дефицитом IL-2, альфа-цепи рецептора интерлейкина-2 (IL-2R α) или бета-цепи рецептора интерлейкина-2 (IL-2R β) снижается количество Т-рег $CD4^+CD25^+$ в тимусе и на периферии, что в дальнейшем приводит к жизнеугрожающим аутоиммунным и воспалительным заболеваниям [74]. Как оказалось, IL-2 необходим не только для поддержания, но также и для активации и клональной экспансии $CD4^+CD25^+$ Т-рег [153].

Фундаментальным свойством, определяющим Т-рег, стало открытие способности к подавлению иммунных реакции как *in vivo*, так *in vitro* [80]. Несмотря на то, что CD25 был идентифицирован в качестве маркера Т-рег, впоследствии оказалось, что он не так специфичен, поскольку CD25 является маркером активации во всех Т-клетках, хотя его экспрессия высоко коррелирует с другими маркерами Т-рег [62; 74].

Были описаны и другие маркеры, экспрессия которых служила для определения и отбора популяции Т-рег, такие как изоформа CD45 – CD45RB,

антиген цитотоксических Т-лимфоцитов (CTLA-4, TNFRSF18) или GITR (ген, связанный с семейством рецепторов фактора некроза опухоли, индуцированный глюкокортикоидами), CD134 (OX40) и CD62L. Как и в случае с CD25, ни одна из этих молекул не экспрессируется исключительно на Т-рег [191].

Поиск специфического маркера Т-рег привел исследователей к тому, что в 2003 году был открыт специфический маркер Т-рег – транскрипционный фактор FoxP3, при дефиците которого у людей развивается тяжелое заболевание – Х-сцепленный синдром (иммунная дисрегуляция, энтеропатия и полиэндокринопатия, характеризующаяся диабетом, тиреоидитом, гемолитической анемией, гипер-Ig синдромом, дерматитом, спленомегалией, лимфаденопатией и цитокиновым штормом) [143; 194].

Таким образом, фенотип Т-рег был определен, как $CD3^+CD4^+CD25^{high}FoxP3^+$. В последующие годы была обнаружена отрицательная корреляция между экспрессией рецептора интерлейкина-7 (IL-7 (CD127)) и экспрессией FoxP3, что характеризовало Т-рег, как клетки с низкой экспрессией CD127 [32].

В 2007 г. Floess с коллегами опубликовали интересное исследование, в котором показали различие в экспрессии FoxP3 на Т-рег и Т-кон. Работа проводилась на мышах-самцах с целью избегания «артефактов», так как FoxP3 кодируется на X хромосоме. Исследователи брали $CD4^+CD25^+$ и $CD4^+CD25^-$ Т-клетки из вторичных лимфоидных органов мышей-самцов. Оказалось, что подавляющее большинство отсортированных $CD4^+CD25^+$ имели экспрессию FoxP3 в то время, как менее 1% $CD4^+CD25^-$ Т-клеток имели экспрессию FoxP3 [56].

Fontenot с коллегами продемонстрировали важную роль FoxP3 в образовании Т-рег. Исследователи проводили эксперименты с облученными мышами, которым вводили клетки костного мозга от мышей с дефицитом гена FoxP3 или диких мышей из контрольной группы. В результате было показано, что только клетки мышей из контрольной группы, экспрессирующие FoxP3, были способны генерировать Т-рег [63].

В работах по отслеживанию клеточных линий у мышей продемонстрировано, что от 4% до 15% Т-рег теряют стабильность в воспалительной среде, что

проявляется в потере экспрессии FoxP3, а в дальнейшем влечет за собой утрату их иммуносупрессивной способности [89; 163].

1.3 Биология Т-регуляторных клеток

Популяция Т-рег CD4⁺CD25⁺CD127^{low}FoxP3⁺ составляет от 5 до 15% периферических Т-клеток. На основе дифференциальной экспрессии поверхностных маркеров в настоящее время ее можно разделить на 22 различные популяции [126].

В зависимости от происхождения и механизма действия Т-рег разделяют на три основных типа: естественные Т-рег (nТрег) генерируемые тимусом, периферические индуцированные (pТрег), а также индуцированные *in vitro* Т-рег (iTрег) [145].

nТрег экспрессируют молекулы, ингибирующие активацию эффекторных Т-клеток: мембранный белок, клеточный рецептор – гликопротеин цитотоксических Т-лимфоцитов 4 (CTLA4), мембраносвязанный трансформирующий фактор роста бета (TGF-β), рецептор фактора некроза опухоли, индуцированный глюкокортикостероидами (GITR), ген активации гомологичных лимфоцитов 3 (LAG3), галектин-1, CD39 [184]. Большая часть естественных Т-рег постоянно экспрессирует высокие уровни CD25 (CD25^{high}) на периферии, но также среди Т-рег есть популяция клеток, имеющая низкую экспрессию CD25 (CD25^{low}). Поддержание CD4⁺CD25⁺ Т-рег критически зависит от действия 2 цитокинов – IL-2 и TGF-β [160].

Хотя CD4⁺CD25⁺ Т-рег не продуцируют IL-2, этот цитокин необходим для правильного развития CD4⁺CD25⁺ Т-рег в тимусе при помощи активации FoxP3 и CD25 [96], а также для поддержания гомеостаза на периферии [75]. В исследованиях на мышах, у которых был дефицит TGF-β, обнаружено, что TGF-β необходим для поддержания экспрессии FoxP3, регуляторной функции и размера

пула периферических Т-рег CD4⁺CD25⁺, но не требуется для развития Т-рег CD4⁺CD25⁺ в тимусе [155; 176].

Стоит отметить, что iTрег имеют нестабильную экспрессию FoxP3, приводящую к возвращению этих клеток в Т-кон или Т-клетки памяти при ослаблении сигналов IL-2 и TGF-β [89]. В другом исследовании было продемонстрировано, что опухолевые клетки могут преобразовывать CD4⁺ клетки в CD4⁺CD25⁺ клетки посредством выработки TGF-β, таким образом уклоняясь от иммунного ответа [187].

При многих злокачественных заболеваниях, таких как рак молочной железы, легких, поджелудочной железы был обнаружен высокий уровень Т-рег в микроокружении опухоли, что свидетельствует об их участии при предотвращении адекватного иммунного ответа, направленного на опухолевые клетки [97]. Также известна роль Т-рег в развитии некоторых аутоиммунных заболеваний, таких как рассеянный склероз, ревматоидный артрит и сахарный диабет I типа [98].

В последние годы была открыта ещё одна популяция Т-рег – резидентные (rТрег), находящаяся в мышечной ткани, в висцеральной жировой ткани и коже [183]. Однако изучение данной подгруппы Т-рег для понимания их функции и свойств еще только предстоит.

1.4 Иммунологическая толерантность

Иммунологическая толерантность – отсутствие специфического иммунологического ответа к аутоантигенам или чужеродным антигенам без длительного иммуносупрессивного воздействия, в частности после трансплантации [29].

Благодаря центральным и периферическим механизмам иммунологической толерантности иммунная система различает аутоантигены и чужеродные антигены (аллоантигены).

При успешной трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток развивается состояние иммунологической толерантности. Главный механизм, при помощи которого формируется толерантность – это клональная делеция предшественников Т-клеток в тимусе, а также зрелых Т-клеток на периферии [92]. Клинически это проявляется в виде стабильной функции трансплантата при отсутствии аллоиммунной реакции на другие ткани хозяина в виде РТПХ [37].

1.5 Центральная толерантность

Центральная толерантность – иммунологическая толерантность, основанная на элиминации аутореактивных иммунокомпетентных клеток, происходящая в центральных органах иммунной системы.

Механизм центральной толерантности осуществляется путем положительной и отрицательной селекции.

Т-лимфоциты возникают из циркулирующих предшественников, которые попали в организм реципиента при введении трансплантата. Для дальнейшего развития и дифференцировки Т-клетки мигрируют в тимус, где на их поверхности происходит появление Т-клеточного рецептора (ТКР) [174]. Дальнейшая жизнь Т-клеток зависит от их способности взаимодействовать с молекулами главного комплекса гистосовместимости (МНС) I и II классов. Большинство клеток не имеют специфичности к лиганду МНС и погибают – это так называемая «позитивная селекция» [165; 171]. Оставшиеся Т-клетки превращаются в CD4⁺ или в CD8⁺ Т-клетки в зависимости от способности взаимодействия с антигенами МНС на эпителиальных клетках коры тимуса (CD8⁺ связываются с молекулами МНС I класса, CD4⁺ – с МНС II класса). На этом этапе аутореактивные клетки также элиминируются – это «отрицательная селекция».

Периферическая толерантность – это процесс подавления функциональной активности и элиминации аутореактивных клонов, выживших после отрицательной

селекции. Механизм периферической толерантности в свою очередь отличается от центральной толерантности и обеспечивается благодаря следующим механизмам:

1. Активационный апоптоз - апоптоз аутореактивных Т-клеток, обусловленный взаимодействием FasL (CD178) и Fas (CD95).

2. Клональная анергия – отсутствие функционирования аутореактивных Т-клеток за счёт низкой экспрессии ТКР, корецепторов (CD4 или CD8), CD28, высокой экспрессии CTLA4.

3. Клональное игнорирование, при котором не происходит иммунного ответа со стороны лимфоцитов к аутоантигенам в низких концентрациях.

1.6 Острая реакция «трансплантат против хозяина»

В 1956г Barnes и Loutit продемонстрировали РТПХ у мышей. Грызунам, после предшествующего облучения, вводились аллогенные клетки селезенки и костного мозга, после чего отмечалось разрешение аплазии, но впоследствии у них развивались такие симптомы как, снижение массы тела, диарея, изменение кожных покровов, аномалии, связанные с работой печени [186].

В 1966 г. Billingham впервые описал РТПХ, как синдром, при котором Т-клетки донора распознают и повреждают ткани и органы реципиента [27].

При возникновении оРТПХ цитотоксические Т-клетки, принадлежащие донору, распознают ткань реципиента как чужеродную, вызывая массивное повреждение клеток и тканей [13].

Классифицируют два типа оРТПХ : классическая оРТПХ, которая включает в себя клинические признаки оРТПХ, развивающиеся в течение первых 100 дней после алло-ТГСК и поздняя имеющая клинические признаки оРТПХ через 100 дней и более [10].

оРТПХ возникает у 30–50% пациентов, перенесших алло-ТГСК [16] и остается одной из главных причин смертности после алло-ТГСК. Летальность при развитии оРТПХ составляет более 10% [121; 162; 166].

HLA-несовместимость донора и реципиента является основной причиной развития оРТПХ [5]. Также к факторам, предрасполагающим к развитию оРТПХ, относят пожилой возраст реципиента, несовпадение по полу (донор женщина – реципиент мужчина), реактивацию цитомегаловирусной инфекции, предшествующую аллоиммунизацию донора [28; 73; 148; 149].

Диагноз оРТПХ устанавливается на основании клинических проявлений, которые развиваются у пациентов, перенесших алло-ТГСК. К органам мишеням при оРТПХ относится кожа, печень, желудочно-кишечный тракт [41]. В настоящее время в клинической практике для классификации оРТПХ применяется классификация Glusberg 1974г, а также классификация, предложенная в 2005г Национальным институтом здравоохранения (НИИ). В критерии диагностики была включена оРТПХ, возникающая спустя 100 дней после алло-ТГСК, синдром перекреста, когда имеются клинические признаки оРТПХ и хронической РТПХ (хрРТПХ), а также введены новые определения поражения систем органов [36; 90].

В таблице №1 представлена классификация стадии и оценка активности оРТПХ.

Таблица 1 – Классификация оРТПХ

Стадия	Симптомы			
	Кожа	Печень	Верхние отделы ЖКТ	Нижние отделы ЖКТ
0 (нет РТПХ)	«Неяркая» (эритематозная) сыпь	<34,2 мкмоль/л	Нет или приходящая тошнота, рвота и/или анорексия	<500 мл/сут или <3 раз/сут жидкий стул
1	Макулопапулезная сыпь < 25%	34,2–51,3 мкмоль/л	Сохраняющаяся тошнота, рвота и/или анорексия	500–999 мл/сут или 3–4 раза/сут
2	Макулопапулезная сыпь 25–50%	51,3–102 мкмоль/л	–	1000–1500 мл/сут или 5–7 раз/сут
3	Макулопапулезная сыпь > 50%	102–256 мкмоль/л	–	>1500 мл/сут или >7 раз/сут
4	100% эритродермия и буллы, десквамация не менее 5% площади	>256 мкмоль/л	–	Интенсивные боли в животе, кровь в стуле, независимо от объема

1.7 Профилактика острой реакции «трансплантат против хозяина»

Для профилактики развития оРТПХ после алло-ТГСК применяются иммуносупрессивные препараты, обладающие способностью контролировать эффекторные Т-клетки донора и, тем самым, снижать аллореактивность. Одним из побочных воздействий иммуносупрессивной терапии (ИСТ) является то, что она неизбирательно воздействует на иммунную систему (супрессируются не только аллореактивные клоны, но и все остальные). Иммуносупрессивные препараты также оказывают прямое и косвенное воздействие на пул Т-рег, что может повлечь трудности на пути развития иммунологической толерантности [82].

Стандартная стратегия профилактики развития РТПХ в основном состоит в применении ингибиторов кальциневрина в монотерапии или в комбинации с другими иммунодепрессантами [9].

Ингибитором кальциневрина, который чаще всего применяется в клинической практике является циклоспорин А (ЦСА). Его действие опосредованно через ингибирование транскрипции цитокинов, в том числе ИЛ-2 [105]. Как известно, ИЛ-2 является регулятором пролиферации, выживания и созревания для всех подтипов Т-клеток, включая и Т-рег [34]. ЦСА блокирует не только активацию и пролиферацию Т-клеток, но также несколько толерогенных механизмов, включая регуляторную активацию и экспансию Т-клеток [40].

Многочисленные клинические исследования показали, что совместное применение ЦСА и метотрексата (МТХ) снижает частоту развития оРТПХ в отличие от монотерапии ЦСА. МТХ один из старейших антиметаболитов, который успешно применяется в терапии лейкемии и других опухолей, а также аутоиммунных заболеваний. МТХ связывается с дигидрофолатредуктазой ключевым ферментом в репликации клеток, ингибируя тем самым этот фермент от превращения фолиевой кислоты в тетрагидрофолат [78; 156]. В одной из работ было показано, что у пациентов, получавших комбинированную терапию

ЦСА+МТХ, частота оРТПХ составила 34% по сравнению с 73% у тех пациентов, кто получал монотерапию [44].

Другой ингибитор кальциневрина – такролимус, обладает схожим иммуносупрессивным действием с ЦСА. Были проведены исследовательские работы, по данным которых длительная терапия небольшими дозами такролимуса способствовала индукции специфичных донорских Т-рег [99; 100]. В одном из исследований было показано, что при профилактике РТПХ такролимусом по сравнению с профилактикой ЦСА снижался риск развития оРТПХ без увеличения частоты развития рецидивов заболевания у пациентов после алло-ТГСК от неродственного донора [125]. В другой работе продемонстрировано, что у пациентов после алло-ТГСК от родственных полностью совместимых доноров частота рецидивов была значительно выше, чем в группе пациентов, у которых применялся такролимус в сравнении с терапией ЦСА [173].

Сиролимус (рапамицин) является альтернативой ингибиторам кальциневрина при применении в качестве иммуносупрессивной терапии. Препарат ингибирует пролиферацию клеток в ответ на факторы роста, включая IL-2 [11; 132]. Иммуносупрессивное действие препарата основано на ингибировании серин/треонинкиназы (mTOR) и фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K). Активация Т-кон при блокировании передачи сигналов PI3K, mTOR приводит к индукции Т-рег *in vitro* [180]. Рапамицин применяется как в монотерапии, так и в комбинации с другими препаратами. При использовании комбинации рапамицина и такролимуса у пациентов после родственной и неродственной алло-ТГСК отмечалось снижение частоты оРТПХ [61].

По данным литературы, у пациентов, перенесших трансплантацию солидных органов, таких как легкие или почка, принимавших иммуносупрессивную терапию рапамицином отмечено увеличение количества nТрег по сравнению с группой, принимавшей ингибиторы кальциневрина [31; 86].

Еще один препарат, применяемый для профилактики РТПХ – микофенолата мофетил (ММФ). Его действие основано на подавлении пролиферации Т- и В-лимфоцитов, истощая гуанозин и дезоксигуанозинового нуклеотиды посредством

микофеноловой кислоты, которая является метаболитом и селективным ингибитором фермента инозинмонофосфатдегидрогеназы [76; 190]. Также стоит отметить, что терапия ММФ способствует преобладанию Т-рег над Т-хелперами 17 типа (Th-17) благодаря ингибированию экспрессии муцина-1 – белка, который обладает способностью к стимулированию дифференцировки Т-клеток в эффекторные клетки [83]. В настоящее время ММФ широко используется в сочетании с ингибиторами кальциневрина для профилактики оРТПХ [167]. Комбинация ММФ и ЦСА не показала лучшего эффекта в профилактике РТПХ, чем комбинация МТХ+ЦСА, но было отмечено снижение частоты и тяжести мукозитов на фоне терапии ММФ [9; 113].

Применение серотерапии перед введением трансплантата значительно снижает риск возникновения РТПХ [164]. В настоящее время доступны 3 препарата антиtimoцитарного глобулина (АТГ). лАТГ состоит из IgG, полученного из гипериммунных сывороток лошадей, иммунизированных клетками человека. Два других вида АТГ состоят из IgG, полученных из гипериммунных сывороток кролика, иммунизированных тимоцитами людей, перенесших оперативные вмешательства на сердце, или иммунизации кроликов гомогенной клеточной линией *Jurkat*.

После внутривенного введения АТГ происходит деплеция Т-клеток и антигенпрезентирующих клеток за счет комплемент-зависимого лизиса, антителозависимой клеточной цитотоксичности, апоптоза активированных Т-клеток [111].

Исследования с применением лАТГ продемонстрировали неэффективность препарата в предотвращении острой и хронической РТПХ у пациентов после HLA-идентичной алло-ТГСК в сравнении с АТГ полученным от кролика [46].

Антитимоцитарный глобулин кроличий (кАТГ), торговое название тимоглобулинTM десятилетиями использовался в качестве иммунного модулятора при различных клинических показаниях. В настоящее время кАТГ один из широко применяемых иммуносупрессивных препаратов после алло-ТГСК [23; 68], а также при лечении различных аутоиммунных заболеваний [127].

Терапия кАТГ эффективно элиминирует Т-клетки периферической крови. При детальном исследовании было установлено, что доля Т-рег FoxP3⁺CD4⁺ увеличивается на фоне терапии кАТГ [21].

У мышей, страдающих сахарным диабетом, было продемонстрировано, что при терапии кАТГ не происходит истощения пула CD4⁺FoxP3⁺ Т-рег, а наоборот происходит увеличение данной популяции по сравнению с контрольной группой [21].

В последние годы в клинической практике начал активно применяться ПТ-ЦФ с целью профилактики оРТПХ. Действие ПТ-ЦФ на Т-клетки заключается в том, что препарат вызывает апоптоз в отличие от глюкокортикостероидов, ингибиторов кальциневрина, ММФ, сиролимуса, которые ингибируют Т-клетки и не вызывают апоптоз [169].

1.8 Роль Т-регуляторных клеток в развитии острой реакции «трансплантат против хозяина»

Т-рег донорского происхождения предотвращают развитие РТПХ при сохранении эффекта РТПЛ [33].

Индуцированные TGF- β iTрег в отличие от натуральных nTрег не эффективны для предотвращения РТПХ [18], что, вероятно, связано с различиями в паттернах метилирования гена FoxP3 [51; 57; 88].

На практике инфузия селектированных и экспансированных Т-рег эффективно подавляет РТПХ как у мышей, так и у людей [52; 175].

Taylor и коллеги в своей работе показали, что у мышей снижение числа CD4⁺CD25⁺ Т-рег в трансплантате связано с увеличением частоты развития тяжелой оРТПХ, тогда как при инфузии донорских Т-рег значительно снижалась частота развития оРТПХ [175].

Rezvani с коллегами продемонстрировали, что даже несмотря на низкое содержание донорских Т-клеток в трансплантате (CD3⁺ Т-клетки 2×10^4 / кг веса реципиента), у половины пациентов, включенных в данное исследование,

развилась оРТПХ II–IV степени. Низкое количество Т-рег на 30-й день после трансплантации было связано с более высоким риском развития оРТПХ II–IV степени [70].

Другая группа исследователей (Wolf и коллеги) определили, что повышенное количество $CD4^+CD25^+$ Т-рег в трансплантате отрицательно коррелировало с частотой развития РТПХ без каких-либо различий в частоте рецидивов [144].

Эксперименты на мышинных моделях продемонстрировали, что инфузия выделенных *ex vivo* поликлональных Т-рег совместно с Т-кон в соотношении 1:1 предотвращает развитие летальной РТПХ [178]. У мышей с иммунодефицитами при совместном введении выделенных и экспансированных Т-рег и Т-кон происходило снижение активности проявлений РТПХ при сохранении РТПЛ [35].

В проспективном исследовании Magenau с коллегами сравнивали пациентов после алло-ТГСК с оРТПХ (n= 60) и без развития оРТПХ (n= 65) и пришли к выводу, что пациенты в дебюте развития оРТПХ имели более низкое соотношение Т-рег/Т-кон, а также значительно меньшее количество Т-рег в периферической крови [64].

Другие исследователи изучили группу детей со злокачественными заболеваниями системы крови и пришли к выводу, что меньшее количество Т-рег в трансплантате было связано с развитием оРТПХ II – IV степени [193].

В ФГБУ «НМИЦ гематологии» в 2021 г. было показано, что повышенный уровень Т-кон, содержащих гранзим В на +30 день после алло-ТГСК, ассоциирован с риском развития рецидива. Это связано с тем, что Т-клетки с высокой экспрессией гранзима В не выполняют эффекторную функцию, следовательно отсутствует эффект РТПЛ [71].

1.9 Понятие и классификация видов химеризма

Сосуществование клеток не одного генетического происхождения в одном индивидууме называется биологической химерой [43]. Оценка доли ДНК,

принадлежащей донору и реципиенту, после ТГСК получила название химеризм. Так, в случае успешной алло-ТГСК гемопоэтические клетки, включая иммунокомпетентные, будут аллогенного (донорского) происхождения, в то время как остальные клетки генетически принадлежат реципиенту. Таким образом, основной задачей в трансплантационной иммунологии является формирование иммунологической толерантности, которая при трансплантации аллогенных гемопоэтических клеток реализуется без длительной (пожизненной) иммуносупрессивной терапии.

Открытие феномена «химеризм» принадлежит Рэю Оуэну, который в 1945 г. впервые продемонстрировал смешанный гемопоэтический химеризм у дизиготных телят-близнецов. Он доказал, что у телят-близнецов в крови циркулируют эритроциты друг друга [120]. В дальнейшем Питер Медавар предположил, что выживание аллогенных клеток крови у этих разнородных близнецов в отсутствие иммуносупрессии указывает на существование иммунологической толерантности. Для подтверждения данной гипотезы Медавар и коллеги пересадили кожные трансплантаты у дизиготных телят-близнецов, отметив приживление трансплантатов, что подтвердило наличие иммунологической толерантности [181].

Основной целью мониторинга химеризма является определение наличия или отсутствия остаточных клеток-хозяина.

Оценка химеризма проводится в костном мозге или в периферической крови реципиента в различные промежутки времени после алло-ТГСК, но чаще всего начиная с 30 дня после трансплантации.

При регистрации полного донорского химеризма речь идет о почти полной замене клеток реципиента донорским лимфогематопоезом, более 95% клеток имеют донорское происхождение. Смешанный химеризм – это присутствие 5 – 95% клеток, имеющих генотип реципиента, в костном мозге, периферической крови [24].

Под расщепленным химеризмом понимают состояние, когда среди общей популяции клеток костного мозга, периферической крови наблюдается полный

донорский химеризм, а в различных клеточных популяциях – смешанный химеризм [20; 45].

1.10 Методы исследования химеризма

Для мониторинга химеризма после алло-ТГСК было разработано много методов, которые претерпевали изменения в течение времени. В 1970–1980 гг. были опубликованы первые отчеты по исследованию химеризма в периферической крови, костном мозге и других тканях. Ginsburg с соавторами [118] исследовали химеризм в клеточных субпопуляциях: В-, Т- и миелоидных клетках с использованием RFLP (полиморфизм длин рестрикционных фрагментов) у пациентов с несостоятельностью трансплантата и рецидивами.

Применение флюоресцентной гибридизации *in situ* (fluorescence *in situ* hybridization – FISH) позволило более чувствительно оценивать приживание трансплантата, однако, этот метод диагностики не подходит всей когорте реципиентов, так как данное исследование невозможно применять у пациентов и доноров, совпадающих по полу [8].

Такие методы как фенотипическое исследование эритроцитов или цитогенетический анализ в настоящее время в рутинной практике практически не применяются в виду низкой чувствительности. Они имеют скорее историческое значение [42; 107].

Первые исследования, в которых применялась полимеразная цепная реакция (ПЦР) для анализа химеризма, опубликовал Roth совместно с коллегами [188]. В частности, в начале 1990-х годов метод ПЦР для определения химеризма начинает активно включаться в практическую деятельность [19; 60; 85].

В настоящее время ПЦР является наиболее распространенным методом для мониторинга химеризма и предполагает амплификацию определенных фрагментов ДНК. Метод основан на анализе амплификации tandemных повторов с переменным числом (VNTR) или коротких tandemных повторов (STR) [158]. Данные методы

позволяют обнаруживать остаточные клетки реципиента с чувствительностью около 1–5% [136].

Вариабельные по числу тандемные повторы (VNTR) представляют повторяющиеся фрагменты ДНК с длиной повтора 10–100 пар нуклеотидов (п.н.) Преимущество применения данного метода состоит в том, что не наблюдаются артефакты ПЦР (так называемые «пики заикания ПЦР»). Однако данный метод недостаточно информативен ввиду того, что аллели донора и реципиента могут иметь существенные различия в размерах. Вследствие этого возможна преимущественная амплификация более короткого аллеля, что усложняет количественную оценку [59; 93; 189]. Наиболее часто используемый тип оценки полиморфизма генов – короткие тандемные повторы (STR) с длиной повтора 2 – 6 пар нуклеотидов. Тетрануклеотидные короткие тандемные повторы очень полиморфны. Именно поэтому они нашли свое широкое применение в тестировании на отцовство, судебной медицине, а также в исследовании химеризма [15].

Развитие и активное внедрение проточной цитометрии с использованием клеток, меченных флуоресцентными антителами, дальнейшая иммуномагнитная сортировка клеток расширили область применения ПЦР, увеличили чувствительность данного метода исследования. Однако этот уровень чувствительности может быть недостаточным при ранней оценке возможных иммунологических осложнений. В таком случае, при исследовании химеризма в определенных обогащенных субпопуляциях лейкоцитов, выделенных при помощи метода магнитной сепарации, чувствительность метода может достигать 0,1–0,01% [79].

В начале 2000 гг. для анализа химеризма начала применяться количественная ПЦР в реальном времени (qПЦР) [139]. Alizadeh и соавторы в 2002 году опубликовали нуклеотидные последовательности панели праймеров для мониторинга химеризма, которые в настоящее время применяются в большинстве лабораторий [137]. Маркерами химеризма для qПЦР выбраны однонуклеотидные полиморфизмы и короткие вставки/делеции с высокой аллельной нагрузкой в

популяции (до 50% носителей полиморфизма). Чувствительность метода составляет 0,1% [49].

При сравнении STR-ПЦР и qПЦР методов определения донорского химеризма было показано, что анализ полиморфизма STR-локусов более информативен при рутинном мониторинге значений химеризма донора от 5 до 95 %. При помощи qПЦР целесообразно оценивать остаточные гемопоэтические клетки, которые в дальнейшем способны инициировать развитие рецидива заболевания [1].

В 2020 г. группа ученых из Испании сравнила чувствительность и способность количественной оценки STR-ПЦР и qПЦР на образцах пациентов после алло-ТГСК. Проспективно наблюдали 57 пациентов, у которых был констатирован полный донорский химеризм при помощи STR-ПЦР. При помощи qПЦР у двадцати семи пациентов (59%) с полным донорским химеризмом выявили 0,1–1% ДНК реципиента в пунктате костного мозга. Оба метода продемонстрировали хорошую производительность с более высокой чувствительностью qПЦР [161].

Существует метод с ещё более высокой чувствительностью – это цифровая капельная полимеразная цепная реакция (digital ПЦР или dПЦР). Чувствительность метода составляет 0,01% минорной ДНК [47; 48]. Суть метода dПЦР основывается на разделении всей смеси ПЦР на тысячи идентичных ячеек реакционной смеси, в результате чего каждая ячейка содержит одну или несколько ДНК-мишеней или не содержит вовсе. Все компартменты параллельно амплифицируются и успешная амплификация определяется с помощью анализа конечных точек на основе детекции флуоресценции [48]. У данного метода исследования есть существенный недостаток – это потребность в адекватной клеточности образца для анализа: минимальное количество ДНК ~50 –75 нг [84].

1.11 Связь смешанного химеризма и рецидива заболевания

Прогнозирование развития раннего рецидива после проведенной алло-ТГСК является важным аспектом в клинической практике врача с целью применения предупреждающих воздействий для снижения риска развития рецидива.

Смешанный химеризм у пациентов с злокачественными заболеваниями крови ассоциирован с более низкой безрецидивной и общей выживаемостью пациентов [3; 6].

Желнова Е.И. в своей диссертационной работе показала, что обнаружение смешанного химеризма хотя бы в одной клеточной популяции у пациентов после алло-ТГСК связано с развитием рецидива заболевания в течение первого года после трансплантации ($p = 0,005$) [4].

Lee с соавторами, проанализировав пострасплантационный химеризм в периферической крови в большой гомогенной когорте пациентов с диагнозами острый миелобластный лейкоз (ОМЛ) и миелодиспластический синдром (МДС), пришли к выводу, что существует связь между Т-клеточным химеризмом на 100-й день и рецидивом после миелоаблативного кондиционирования (МАС). Донорский химеризм в Т-клетках $\leq 85\%$ был связан с развитием рецидива после алло-ТГСК ($p = 0,02$) [110].

Van Besien с коллегами продемонстрировали, что смешанный химеризм в костном мозге/периферической крови после алло-ТГСК не связан с развитием рецидива заболевания, однако, уменьшение донорского кроветворения более чем на 15% между 30-м и 180-м днями после трансплантации являлось предиктором рецидива заболевания [123].

Е. Nikolousis в своем исследовании показал, что на развитие рецидива не влияет химеризм: у пациентов, включенных в исследование (с рецидивом и без), разницы между химеризмом на +90, +180 дни после алло-ТГСК выявлено не было [129].

Bader и коллеги [109] в своей работе описали 30 детей с гемобластозами после алло-ТГСК. Пациенты со смешанным химеризмом имели более высокую вероятность развития рецидива по сравнению с пациентами со стабильным полным донорским химеризмом. В группе пациентов с нарастающим химеризмом были также пациенты, не развившие рецидив заболевания, а в когорте пациентов с полным химеризмом у троих пациентов был констатирован рецидив заболевания [109].

В таблице №2 показан алгоритм наблюдения за химеризмом при различных клинических проявлениях.

Таблица 2 – Алгоритм наблюдения за химеризмом (Almudena-Bailon,2020)

Цель	Клеточные популяции	Метод	Временные промежутки
Оценка приживления	Периферическая кровь (Т-клетки, В-клетки, НК-клетки)	STR–ПЦР	С +15 дня алло-ТГСК, далее через каждые 7 дней до констатации полного химеризма
РТПХ	Пунктат костного мозга	STR–ПЦР	На +30 день алло-ТГСК
	Т-клетки периферической крови	STR–ПЦР	Каждые 14 дней до наступления полного химеризма
После приживления у пациентов с незлокачественными заболеваниями крови	Пунктат костного мозга.	STR–ПЦР	+90, +180, +365 дни алло-ТГСК
	Периферическая кровь	STR–ПЦР	
Полный химеризм у пациентов с маркером МРБ	Пунктат костного мозга.	STR–ПЦР	Контроль 1 раз в 3 месяца Ежемесячно в течение 1 года, далее 1 раз в 3 месяца
	Периферическая кровь	STR–ПЦР	
Полный химеризм у пациентов без МРБ маркера	Пунктат костного мозга.	qПЦР	Контроль 1 раз в 3 месяца Ежемесячно в течение 1 года, далее 1 раз в 3 месяца
	Периферическая кровь	qПЦР	

1.12 Применение высокодозного циклофосфида и его влияние на развитие иммунологических осложнений

В 1963 г. Verenbaum [26] впервые сообщил, что у мышей отмечается лучшее приживление кожных аллотрансплантатов после введения циклофосфида спустя 1–3 дня после трансплантации.

Циклофосфамид – это алкилирующий препарат, который метаболизируется печеночным цитохромом Р450 в метаболиты: фосфорамидный иприт и акролеин. Наиболее выраженный алкилирующий эффект циклофосфида проявляется в фазе G1 и S клеточного цикла [54; 128].

Механизм действия циклофосфида основан на селективном удалении быстро пролиферирующих аллореактивных Т-клеток. Гемопоетические стволовые клетки устойчивы к циклофосфамиду, так как богаты альдегиддегидрогеназой, ферментом помогающим превращаться фосфорамидному иприту в неактивный метаболит карбоксициклофосфамид [17; 79; 106]. В течение последних лет широкое применение получила трансплантация от гаплоидентичного донора. Это стало возможным в том числе и благодаря использованию режимов профилактики с ПТ-ЦФ [104; 116].

Самые первые исследования применения ПТ-ЦФ в качестве профилактики РТПХ проводились в Университете Джона Хопкинса в Балтиморе O'Donnell с коллегами. В исследование была включена небольшая группа пациентов, однако главным выводом этой работы послужило то, что ПТ-ЦФ безопасен в условиях гаплоидентичной трансплантации [115].

При применении ПТ-ЦФ в ранние сроки после алло-ТГСК происходит селективное уничтожение преимущественно только пролиферирующих аллореактивных Т-клеток на +3 и +4 дни после инфузии трансплантата [150]. Благодаря этому происходит более быстрое восстановление донорской иммунной системы, что способствует защите реципиента от инфекционных осложнений. В дальнейшем, в течение нескольких месяцев после алло-ТГСК Т-рег играют важную

роль в регуляции остаточных аллореактивных Т-клеток. Было показано, что аллореактивные Т-клетки имеют зависимую от времени чувствительность к циклофосфамиду. При инфузии трансплантата происходит быстрая пролиферация аллореактивных Т-клеток в ответ на антигенную стимуляцию. ПТ-ЦФ элиминирует делящиеся Т-клетки донорского и хозяйского происхождения при введении на +3,+4 дни, что ведет к снижению риска развития реакции «трансплантат против хозяина» [104]. При этом также снижается число аллореактивных конвенциональных CD4⁺ клеток, в то время как CD4⁺CD25⁺ Т-клетки выживают за счет высокой экспрессии альдегиддегидрогеназы [17].

Все это ведет к тому, что при использовании ПТ-ЦФ меньше частота именно тяжелой оРТПХ III–IV степени, что, вероятно, связано с механизмами периферической толерантности, которое опосредуется именно благодаря Т-рег [67; 91].

Luznik с коллегами [72] проводили исследование, в котором сравнивали пациентов с прогрессирующими гемобластомами после гапло-ТГСК, получавших одно или два введения ПТ-ЦФ на 3-й или 3-й и 4-й дни совместно с такролимусом и ММФ. Смертность, связанная с лечением, составила 15%, частота рецидивов спустя один год – 51%. Двухлетняя общая выживаемость – 36%, а выживаемость без событий – 26%. У 34% пациентов развилась оРТПХ II – IV степени, а у 6% – III – IV степени. Единственным различием между двумя группами была тенденция к более низкой частоте развития хрРТПХ (5% против 25%; $p < 0,05$) у пациентов, получавших 2 дозы циклофосфамида. Данная работа показала хороший результат на фоне применения ПТ-ЦФ у пациентов из группы неблагоприятного прогноза после режима кондиционирования в режиме пониженной интенсивности (RIC).

Для предотвращения фатальной РТПХ необходима доза ПТ-ЦФ 10–50 мг/кг/сутки на +3, +4 дни. В то время как доза препарата вне данного диапазона оказалась неэффективной [131].

Малые дозы ПТ-ЦФ (10 мг/кг/сутки) вполне достаточны для значимого снижения частоты развития оРТПХ у мышей за счет эффекта быстрого восстановления Т-рег. Применение малых доз ПТ-ЦФ 10 мг/кг/сутки у мышей

после трансфузии 1×10^7 миелокариоцитов и 4×10^7 спленоцитов показало низкую вероятность развития оРТПХ. Хороший эффект в виде уменьшения развития оРТПХ у мышей при комбинации малых ПТ-ЦФ с АТГ ($p = 0,02$), что, видимо, обусловлено возможностью циклофосфида усиливать защитный эффект против РТПХ [102].

В 2019 г. опубликовано исследование, в котором для снижения риска РТПХ без ущерба для приживления и вероятности развития рецидива заболевания использовался ПТ-ЦФ в низких дозах (14,5 мг/кг на +3, +4 дни, трансплантация гемопоэтических стволовых клеток от гаплоидентичного донора) в сочетании со стандартными дозами кАТГ в сравнении с монотерапией кАТГ. Оказалось, что частота оРТПХ III–IV степени, как и безрецидивная выживаемость в группе АТГ–ПТ-ЦФ была значительно ниже, чем в группе пациентов, получавших АТГ (5% против 18%; $p = 0,003$; и 6% против 15%; $p = 0,045$). Кроме того, безрецидивная выживаемость без РТПХ была значительно выше в группе АТГ-ПТ-ЦФ (63% против 48%; $p = 0,039$) [101].

ПТ-ЦФ играет важную роль не только при выполнении гаплоидентичных трансплантаций, но и при проведении HLA-совместимых родственных/неродственных трансплантаций в качестве единственной профилактики развития РТПХ. В пилотном исследовании [69] на большой когорте пациентов ($n = 117$) с гематологическими злокачественными заболеваниями после кондиционирования МАС, смертность связанная с лечением составила 17%. оРТПХ II – IV степени наблюдалась у 43% пациентов, частота хрРТПХ – 10%. Kanakry с коллегами [130] в своем исследовании показали похожие результаты у пациентов с гемобластомами после алло-ТГСК от HLA-идентичных доноров. В качестве профилактики РТПХ применялся ПТ-ЦФ. оРТПХ II–IV степени составила 51%, в то время как III-IV степени – 15%. В этом исследовании также отмечалась низкая частота хрРТПХ – 14%.

1.13 Заключение

Во всем мире ежегодно растет количество проводимых трансплантаций. Важнейшей основой для улучшения долгосрочных результатов алло-ТГСК является понимание принципов регуляции аллоиммунных осложнений, прежде всего таких как ОРТПХ. Учитывая, что Т-регуляторные клетки играют фундаментальную роль в процессе иммунорегуляции в том числе и развитии ОРТПХ, наше исследование было посвящено изучению именно этой субпопуляции Т-клеток хелперов.

Глава 2. Материалы и методы

2.1 Клиническая характеристика больных

В проспективное исследование включено 42 пациента с острыми лейкозами после алло-ТГСК за период с 2016 по 2018 гг. Все пациенты, включенные в данное исследование, наблюдались в отделении интенсивной высокодозной химиотерапии и трансплантации костного мозга с круглосуточным и дневным стационарами ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава РФ (руководитель отдела, д.м.н. Паровичникова Е.Н., заведующая отделением, к.м.н. Кузьмина Л.А.).

Перед выполнением трансплантации всем больным проводилось предтрансплантационное обследование, включающие морфологическое (клиническая лаборатория, зав. лаб., к.м.н. Двирных В.Н.), гистологическое (патологоанатомическая лаборатория, зав. лаб., проф., д.б.н Ковригина А.М.), молекулярное (лаборатория молекулярной гематологии, зав. лаб., д.б.н Судариков А.Б.), цитогенетическое (лаборатория кариологии, зав. лаб., к.м.н. Обухова Т.Н.), иммунофенотипическое (лаборатория иммунофенотипирования клеток крови и костного мозга, зав. лаб., д.м.н. Гальцева И.В.) исследования костного мозга.

Медиана возраста пациентов, включенных в исследование, составила 35,5 лет (19 – 66). Из них женщин – 23, мужчин – 19 человек. У 32 пациентов был установлен диагноз острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) и у 10 пациентов – острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ). На момент предтрансплантационного кондиционирования 29 пациентов находились в первой полной ремиссии, у 11 больных была установлена вторая ремиссия, и у 2 пациентов был констатирован рецидив заболевания.

2.2 Предтрансплантационное кондиционирование

Всем пациентам, включенным в исследование, перед проведением алло-ТГСК было выполнено предтрансплантационное кондиционирование. Режим МАС использовали у 16 пациентов, RIC у 26 больных. Молодым больным (медиана возраста составила 27 лет) без сопутствующей патологии алло-ТГСК была выполнена в миелоаблативном режиме. Для этого использовали классический режим BuSu: бусульфан 4 мг/кг/сут в -6, -5, -4 дни (суммарно 12 мг/кг), циклофосфамид 60 мг/кг/сут в -3, -2 дни (суммарно 120 мг/кг). В остальных случаях применялся RIC. У 24 пациентов (медиана возраста составила 41 год) использовали классический режим FluBu: флударабин 30 мг/м²/сут в -10, -9, -8, -7, -6, -5 дни (суммарно 180 мг/м²), бусульфан 4 мг/кг/сут в -6, -5 дни (суммарно 8 мг/кг). У одного из пациентов вне ремиссии был использован блок циторедукции – НАМ перед проведением ему кондиционирования по схеме FluBu. Одному пациенту перед алло-ТГСК проводили кондиционирование по схеме TreoMelFlu: треосульфан 14 г/м²/сут в -5, -4 -3 дни (суммарно 42 г/м²), мелфалан 70 мг/м²/сут в -3, -2 дни (суммарно 140 мг/м²), флударабин 30 мг/м²/сут в -6, -5, -4, -3, -2 дни (150 мг/м²). Один пациент получил комбинацию флударабин 180 мг/м² и мелфалан 140 мг/м².

2.3 Варианты трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток

Алло-ТГСК от родственного HLA-идентичного донора была выполнена 14 пациентам, от родственного частично-совместимого/гаплоидентичного донора 3 пациентам. От неродственного HLA-идентичного донора проведена 15 пациентам, от неродственного частично-совместимого донора – 10.

После окончания предтрансплантационного кондиционирования в день 0 всем пациентам была выполнена трансфузия аллогенных гемопоэтических

стволовых клеток. Стволовые клетки крови (СКК) в качестве источника трансплантата были использованы у 18 пациентов, костный мозг у 24 пациентов.

2.4 Профилактика острой реакции «трансплантат против хозяина»

Все пациенты, включенные в исследование, получали иммуносупрессивную терапию с целью профилактики развития РТПХ.

У 21 пациента после алло-ТГСК от полностью совместимого родственного ($n = 8$) или неродственного HLA-идентичного донора ($n = 13$) применялся режим иммуносупрессивной терапии, который включал в себя лАТГ в суммарной дозе 40 мг/кг (по 10 мг/кг в -4, -3, -2, -1 дни), ЦСА в стартовой дозе 3 мг/кг/сут с -1 дня, малые дозы МТХ – в +1 день 15 мг/м²; в +3, +6, +11 – по 10 мг/м²/сут, ММФ с +1 дня – 2 г/сут – при алло-ТГСК от родственного HLA-идентичного донора, 3 г/сут – при алло-ТГСК от неродственного HLA-идентичного.

У 4 пациентов с родственным HLA-идентичным донором проводилась иммуносупрессивная терапия в виде ЦСА в стартовой дозе 3 мг/кг/сут, малые дозы МТХ – в +1 день 15 мг/м²; в +3, +6, +11 – по 10 мг/м²/сут.

Если трансплантация аллогенных гемопоэтических клеток проводилась от частичного совместимого или гаплоидентичного донора, то тогда использовали альтернативный вариант иммуносупрессивной терапии, который включал в себя ПТ-ЦФ в дозе 50 мг/кг/сут на +3, +4 день в сочетании с лАТГ в суммарной дозе 40 мг/кг (по 10 мг/кг в -4, -3, -2, -1 дни), ЦСА в стартовой дозе 3 мг/кг/сут с -1 дня, ММФ с +1 дня – 3г/сут ($n = 12$).

У троих пациентов в режиме иммуносупрессивной терапии применялся кроличий антиtimoцитарный глобулин: кАТГ 7,5 мг/кг + ПТ-ЦФ + ЦСА + ММФ при алло-ТГСК от неродственного частично-совместимого донора; кАТГ 7,5 мг/кг + ЦСА + МТХ + ММФ 2 г/сутки при алло-ТГСК от родственного HLA-совместимого донора; кАТГ 7,5 мг/кг + ЦСА + МТХ + ММФ 3 г/сутки при алло-ТГСК от неродственного HLA-совместимого донора.

В случае, если алло-ТГСК проводилась в рецидиве заболевания ($n = 2$), то в схему иммуносупрессивной терапии был включен ПТ-ЦФ в монорежиме в дозе 50 мг/кг/сут на +3, +4 день ($n = 1$), либо в сочетании с лАТГ. В дальнейшем, учитывая схемы профилактики РТПХ, все пациенты были разделены на 3 группы: группа ПТ-ЦФ (режимы профилактики на основе ПТ-ЦФ), группа АТГ (режимы профилактики на основе лАТГ), другие режимы профилактики РТПХ (в эту группу был отнесен препарат кАТГ, без включения лАТГ и ПТ-ЦФ). Пациенты, у которых применялся кАТГ не включены в группу пациентов с лАТГ в связи с тем, что несмотря на общие свойства этих препаратов, они применяются в разных дозах и имеют различия в иммуносупрессивном действии.

В таблице №3 подробно указаны схемы иммуносупрессивной терапии и группы, к которым они были отнесены.

Таблица 3 – Схемы иммуносупрессивной терапии

Группа режима профилактики	Режим иммуносупрессивной терапии	Количество пациентов, включенных в исследование
лАТГ ($n=21$)	лАТГ+ЦСА+МТХ+ММФ (АТГ - 40 мг/кг с -4 по -1 день; ЦСА - 3 мг/кг с -1 дня; МТХ- 15мг/м ² на +1 день, 10 мг/м ² на +3, +6, +11 дни; ММФ - 2 г/сут с +1 дня)	8
	лАТГ+ ЦСА +МТХ+ММФ (АТГ - 40 мг/кг с -4 по -1 день; ЦСА - 3 мг/кг с -1 дня; МТХ- 15мг/м ² на +1 день, 10 мг/м ² на +3, +6, +11 дни; ММФ - 3 г/сут с +1 дня)	13
ПТ-ЦФ ($n=14$)	лАТГ+ЦФ (АТГ - 40 мг/кг в -4 по -1 день; ЦФ - 50+50 мг/кг на +3, +4 дни)	1
	лАТГ+ЦФ+ЦСА+ММФ (АТГ - 40 мг/кг с -4 по -1 день; ЦФ – 50+50 мг/кг на +3, +4 день; ЦСА - 3 мг/кг с -1 дня; ММФ - 3 г/сут с +1 дня)	12
	моно-ЦФ (ЦФ - 50+50 мг/кг на +3, +4 дни)	1

Продолжение таблицы 3

Группа режима профилактики	Режим иммуносупрессивной терапии	Количество пациентов, включенных в исследование
Другие режимы ИСТ (n=7)	кАТГ+ЦСА+МТХ+ММФ (кАТГ - 7,5 мг/кг с -3 по -1 день; ЦСА - 3 мг/кг с -1 дня; МТХ- 15мг/м ² на +1 день, 10 мг/м ² на +3, +6, +11 дни; ММФ - 2 г/сут с +1 дня)	1
	кАТГ+ЦСА+МТХ+ММФ (кАТГ- 7,5 мг/кг с -3 по -1 день; ЦСА - 3 мг/кг с -1 дня; МТХ- 15мг/м ² на +1 день, 10 мг/м ² на +3, +6, +11 дни; ММФ - 3 г/сут с +1 дня)	1
	кАТГ+ЦФ+ЦСА+ММФ (кАТГ - 7,5 мг/кг с -3 по -1 день; ЦФ - 50+50 мг/кг на +3, +4 день; ЦСА - 3 мг/кг с -1 дня; ММФ - 3 г/сут с +1 дня)	1
	ЦСА+МТХ (ЦСА - 3 мг/кг с -1 дня; МТХ- 15мг/м ² на +1 день, 10 мг/м ² на +3, +6, +11 день)	4

2.5 Пробоподготовка

Первый этап исследования выполняли в лаборатории иммунофенотипирования клеток крови и костного мозга (зав. лабораторией, д.м.н. Гальцева И.В.). Проводили выделение мононуклеаров с использованием градиента плотности фиколла (1,077 г/л) [30].

У больных в контрольные сроки на +30, +60, +90 дни после алло-ТГСК выполняли забор периферической крови в пробирку с ЭДТА (для предотвращения свертывания). Используя градиент плотности фиколла, из периферической крови выделяли фракцию мононуклеаров. Для этого объем крови довели до 10 мл фосфатно-солевым буфером с азидом натрия pH 7,2 (Cell Wash, США). Далее, в пробирку, содержащую 4 мл фиколла (Cedarlane Lab. Ltd. Канада), постепенно наслаивали разведенную суспензию клеток. Кровь оставалась над раствором фиколла и не смешивалась с ним. В дальнейшем проводили центрифугирование

при комнатной температуре в течение 45 мин на центрифуге (Hermle Z326K (HERMLE Labortechnik GmbH, Германия)) с горизонтальным ротором при ускорении в 400 g. После центрифугирования интерфазное кольцо, содержащее мононуклеарные клетки, собирали в отдельную пробирку и производили подсчет клеток на гематологическом анализаторе.

2.6 Магнитная сепарация

Далее в этой же лаборатории проводилась магнитная сепарация с использованием CD4⁺CD25⁺ Regulatory T Cell Isolation Kit (Milteney Biotec, Германия).

В нашем исследовании CD4⁺CD25⁺ клетки расценивались как Т-регуляторные, а клетки CD4⁺CD25⁻ как Т-конвенциональные.

Для их изучения, полученные на предыдущем этапе клетки в количестве 1 млн центрифугировали в течение 10 минут при ускорении 300g. После этого надосадочная жидкость удалялась и полученный клеточный осадок ресуспендировался в 90 мкл фосфатно-солевого буфера «Cell Wash». Далее к клеточной взвеси добавляли 10 мкл антитела CD4⁺, конъюгированного с биотином (Milteney Biotec, Германия). После перемешивания проводилась инкубация в холодильнике при температуре 2–8 °С в течение 10 минут. Спустя это время в пробирку добавляли 20 мкл моноклональных антител к биотину, которые были конъюгированны с оксидом железа. Далее после перемешивания проводилась инкубация в холодильнике в течение 15 минут при температуре 2–8 °С. В дальнейшем клетки ресуспендировались в 1–2 мл буфера «Cell Wash», и далее пробирка центрифугировалась в течение 10 минут при 300g. Надосадочная жидкость удалялась, и к клеткам добавляли буферный раствор «Cell Wash» в объеме 500 мкл.

2.7 Магнитная сепарация CD4⁺CD25⁻ Т-клеток

Для проведения магнитной сепарации использовали магниты серии MACS (Milteneу Biotec, Германия). Колонка для магнитной сепарации помещалась в магнитное поле. Смачивалась 2 мл буфера «Cell Wash», после чего в колонку вносилась клеточная суспензия. Благодаря магнитному полю клетки, на которых были зафиксированы антитела (все клетки за исключением CD4⁺), конъюгированные с оксидом железа задерживались. После чего в нижестоящей пробирке собиралась фракция немеченых клеток – CD4⁺ клеток. Далее колонка промывалась буферным раствором «Cell Wash» 2 раза.

2.8 Селекция CD4⁺CD25⁺ Т-клеток

Полученная клеточная взвесь CD4⁺ клеток центрифугировалась при ускорении 300 g в течение 10 минут. Далее полностью аспирировали супернатант. Клеточный осадок ресуспендировали в 90 мкл буферного раствора и добавляли 10 мкл антител к CD25 конъюгированных с оксидом железа. Пробирку перемешивали, а затем инкубировали в холодильнике в течение 15 минут при температуре 2–8°C.

2.9 Позитивная селекция CD4⁺CD25⁺ клеток

После этапа выделения CD4⁺ клеток выполнялась позитивная селекция CD4⁺CD25⁺ клеток при помощи колонки для магнитной сепарации. Для этого колонку помещали в магнитное поле магнита серии MACS и подготавливали ее, промыв 500 мкл буферного раствора «Cell Wash». Далее клеточная суспензия проходила через колонку. Колонка трехкратно промывалась буферным раствором

«Cell Wash» по 500 мкл, проводился забор немеченых клеток. После прохождения материала через колонку, в нижестоящей пробирке оставались немеченые клетки – $CD4^+CD25^-$. После чего колонка снималась с сепаратора, добавлялся 1 мл буферного раствора «Cell Wash». Далее поршнем выдавливалась фракция, задержанная ранее магнитом – $CD4^+CD25^+$ фракция (Т-регуляторные клетки).

2.10 Многоцветная проточная цитометрия

Далее проводился контроль чистоты обогащенной популяции при помощи метода многоцветной проточной цитометрии (проточный цитофлуориметр BD FACSCanto II (BD Biosciences, США). Для этого были использованы моноклональные антитела, конъюгированные с флюорохромами.

Для мононуклеарных клеток образцов периферической крови, полученных от пациентов, которые были включены в исследование, нам удалось добиться достаточного обогащения $CD4^+$. Чистота в итоговой фракции $CD4^+CD25^-$ клеток составляла 85,95% (71,6 – 98,5%). Учитывая малое количество целевых клеток, рутинный контроль чистоты $CD4^+CD25^+$ клеток не выполнялся. Однако, по данным проведенного на предварительных этапах исследования, а также информации от производителя ожидаемая чистота составляет более 80%. Определение популяции $CD4^+$, $CD4^+CD25^+$ методом проточной цитометрии продемонстрировано на рисунке 1, 2.

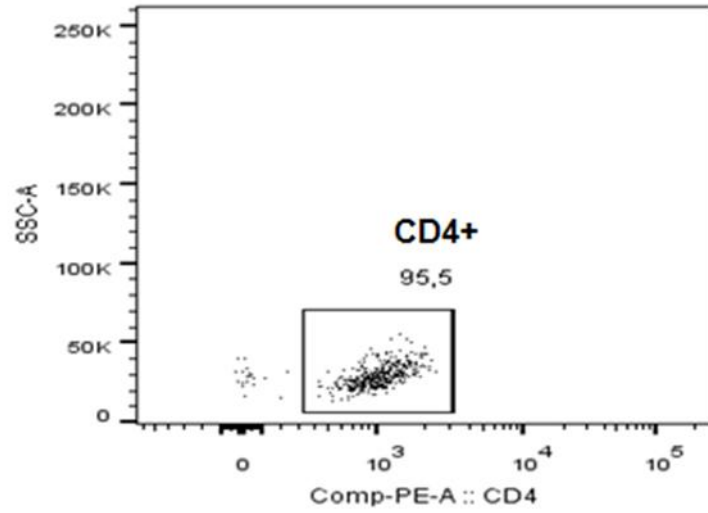


Рисунок 1 – Определение популяции CD4⁺ клеток методом проточной цитометрии.

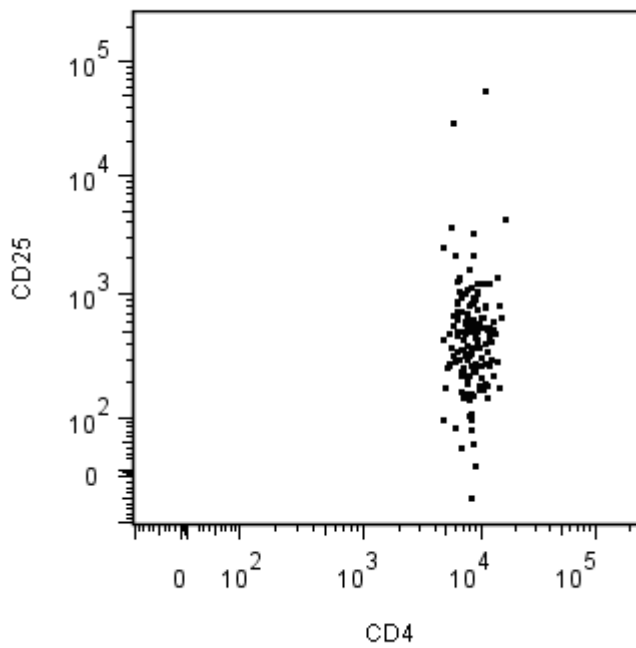


Рисунок 2 – Определение популяции CD4⁺CD25⁺ методом проточной цитометрии (данные предварительных экспериментов).

2.11 Экстракция ДНК. Полимеразная цепная реакция с панелью праймеров к локусам коротких tandemных повторов (short tandem repeat) человека

Следующий этап нашего исследования проводился в лаборатории молекулярной гематологии (зав. лаб, д.б.н Судариков А.Б.).

Из полученной клеточной суспензии $CD4^+CD25^-$, $CD4^+CD25^+$, а также пунктата костного мозга проводилась экстракция ДНК с использованием наборов для выделения ДНК/РНК «Ампли Прайм РИБО-преп» согласно инструкции. Прогревали лизирующий раствор при температуре $65^{\circ}C$ до полного растворения кристаллов.

1. Вносили в подготовленные пробирки по 10 мкл ВКО комплексного (внутренний контрольный образец).
2. Далее ресуспендировали сорбент универсальный, интенсивно перемешивая пробирки на вортексе. В каждую пробирку вносили по 20 мкл ресуспендированного сорбента универсального, после чего вносили 300 мкл ресуспендирующего раствора.
3. В пробирку с ВКО, лизирующим раствором и сорбентом универсальным вносили по 100 мкл исследуемой суспензии ($CD4^+CD25^-$, $CD4^+CD25^+$, пунктат костного мозга).
4. Пробирки тщательно перемешивали на вортексе. Далее пробирки помещались в термостат при температуре $65^{\circ}C$ в течение 5 минут. Пробирки перемешивали на вортексе и отстаивали при комнатной температуре в течение 2 минут.
5. Пробирки центрифугировали на микроцентрифуге в течение 30 сек при 7000g.
6. Не захватывая сорбент, проводилось удаление надосадочной жидкости в каждой пробирке отдельным наконечником без фильтра на 200 мкл, используя вакуумный отсасыватель.
7. В пробирки добавляли по 1 мл отмывочного раствора, перемешивали на вортексе до полного ресуспендирования сорбента.
8. Далее повторяли пункты 5,6.

9. С открытыми крышками пробирки помещались в термостат с температурой 65⁰С в течение 5 минут для подсушивания сорбента.
10. Далее в пробирки добавляли по 100 мкл буфера для элюции В. Пробирки перемешивали на вортексе до полного ресуспендирования сорбента, а затем перемещали в термостат на 5 минут с температурой 65⁰С.
11. Центрифугировали пробирки на микроцентрифуге в течение 1 минуты при 10000 g.
12. Надосадочную жидкость, содержащую очищенную ДНК, переносили в новые пробирки и хранили при температуре = -20⁰С до использования.

2.12 Измерение концентрации выделенной ДНК

Предварительно концентрацию ДНК измеряли на спектрофотометре Genesys 10 UV (Thermo Scientific), внося в кюветы для спектрофотометра объемом 300 мкл по 3 мкл ДНК, разведенной в 300 мкл воды (в 100 раз). Измерение поглощения при 260 нм проводят в кювете с длиной оптического пути 1 мм, используя воду в качестве референса. Значение концентрации ДНК в исходном растворе (мкг/мкл) находили, умножая значение поглощения при длине волны 260 нм на $K=50$. В случае селективированных образцов с низкой клеточностью (10 – 40 тысяч клеток в образце) определение концентрации ДНК не проводили, избегая расхода ДНК.

2.13 ПЦР амплификация и анализ STR-профилей методом капиллярного электрофореза

Амплификация проводилась при помощи лиофилизированного мультиплексного набора для амплификации 19 полиморфных STR-маркеров и локуса амелогенина X, амелогенина Y человека (Cordis plus, ГОРДИЗ, Москва).

В каждую пробирку, содержащую лиофилизованные компоненты реакционной ПЦР-смеси, вносили 5 мкл активатора. Затем вносили до 20 мкл

раствора исследуемой геномной ДНК в количестве до 100 нг. Рекомендация производителя состоит в использовании 0,2 – 2 нг ДНК на пробу, этого достаточно для получения STR-профилей реципиента и донора до трансплантации гемопоэтических стволовых клеток и выбора маркеров химеризма, но недостаточно для выявления примеси минорной ДНК (от 2%) при мониторинге химеризма после алло-ТГСК. Поэтому количество вносимой нами в пробы ДНК, выделенной из костного мозга после алло-ТГСК и селектированных популяций клеток, было увеличено. В итоге реакционная смесь содержала матричную ДНК, панель праймеров к 19 локусам STR и к расположенному на половых хромосомах локусу амелогенина, меченых четырьмя вариантами флуоресцентных красителей, ДНК-полимеразу, четыре типа нуклеотидов. После денатурации и отжига праймеров ДНК-полимераза начинает добавлять dNTP в растущие цепи ДНК. Повторяемые циклически этапы денатурации, отжига и элонгации праймеров позволяют наработать детектируемые количества исследуемых мишеней ДНК в одной пробирке. (СОП 0В определение посттрансплантационного химеризма методом STR-профилирования, ЛГМ-А-011/01лаб. Лаборатория молекулярной гематологии ФГБУ «НМИЦ гематологии» МЗ РФ).

Реакционную смесь тщательно перемешивали до гомогенного состояния 5–8-кратным пипетированием. Циклы амплификации проводили с соблюдением температурного режима.

С каждой серией исследуемых образцов проводилась амплификация одного положительного контроля (0,5 мкл контрольной ДНК) и одного отрицательного контроля (деионизированная вода вместо ДНК).

При постановке ПЦР соблюдался режим амплификации, заявленный производителем Cordis plus:

94 °C 3 мин

98 °C 30 сек

59 °C 120 сек, 4 цикла

72 °C* 90 сек

94 °C 30 сек

59 °C 120 сек, 6 циклов

72 °C* 90 сек

90 °C 30 сек

59 °C 120 сек, 18 циклов

72 °C* 75 сек

68 °C 10 мин

15 °C ∞

* Рекомендуемая скорость нагрева с 59°C до 72°C - не более 0,3°C/1 сек

Аmplификацию проводили на автоматическом термоциклере DNAEngine (BioRad, США).

Последующий фрагментный анализ был выполнен на генетическом анализаторе ABI 3130 (Thermofisher Scientific, USA). Пробоподготовка к капиллярному электрофорезу включала в себя добавление 5 мкл ПЦР-продукта к смеси 20 мкл Hi-DiTM формамида и 1 мкл размерного стандарта S550 (набора фрагментов ДНК разной длины, меченых пятым флуоресцентным красителем). После тщательного пипетирования смесь вносили в лунки планшета для капиллярного электрофореза, загружали планшет в прибор и проводили капиллярный электрофорез. Под воздействием высокого напряжения фрагменты ДНК мигрируют в тонком капилляре и разделяются по длине. При прохождении окна детекции флуоресценции под воздействием лазера меченые ПЦР-продукты флуоресцируют каждый на своей длине волны, детектор флуоресценции регистрирует интенсивность сигнала от каждого ампликона, а добавление в пробы размерного стандарта позволяет затем с помощью программного обеспечения получить STR-профиль, состоящий из ряда ампликонов вычисленной длины. Интенсивность свечения флуорофорной метки ампликона определенной длины пропорциональна доле ДНК, содержащей данный уникальный STR-маркер, что позволяет вычислить по этим маркерам доли ДНК реципиента/донора в образце, отражающие долю ядерных клеток реципиента/донора в исследуемом материале пациента после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (СОП 0В определение посттрансплантационного химеризма методом STR-профилирования,

ЛГМ-А-011/01, лаб. молекулярной гематологии ФГБУ «НМИЦ гематологии» МЗ РФ)

2.14 Определение доли геномной ДНК донора и реципиента в исследуемых образцах (мониторинг химеризма)

Полученные электрофореграммы анализировали с помощью программного обеспечения GeneMapper™ Software v4.0, Applied Biosystems™. Предварительно были проанализированы электрофореграммы STR-профилей донора и реципиента до трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток. Из 20 маркеров, распределенных по четырем каналам детекции флуоресценции, были выбраны несовпадающие или частично совпадающие аллельные варианты маркеров химеризма для последующего мониторинга. На рисунке 3 представлена электрофореграмма STR-профилей донора и реципиента до трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток, обозначены маркеры реципиента, отсутствующие у донора.

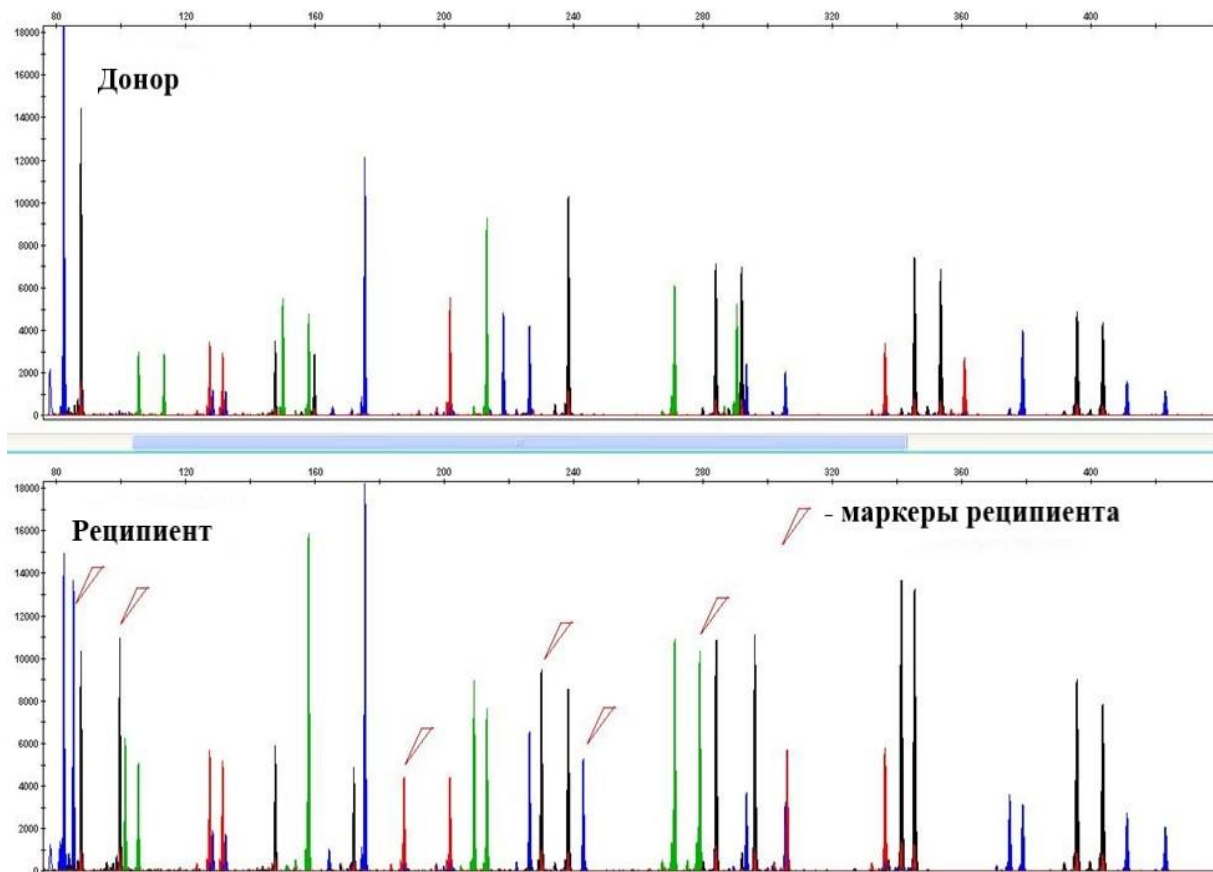


Рисунок 3 – Электрофореграмма STR–профилей донора и реципиента до алло-ТГСК (ось X — длины ампликонов, рассчитанные автоматически относительно стандарта длины S550, ось Y — интенсивность флуоресценции ампликонов, измеряемая в условных единицах флуоресценции).

Долю геномной ДНК донора и реципиента в исследуемых образцах рассчитывали по соотношению высот пиков флуоресценции ПЦР-продуктов информативных маркеров. Расчет проводили с помощью стандартных формул, учитывающих варианты аллельности (гомо/гетерозигота) и возможные частичные совпадения маркеров донора и реципиента в информативных STR-локусах. Чувствительность метода от 1% обеспечивалась соблюдением следующих условий: минорный пик флуоресценции ампликона вдвое выше порогового значения шума, установленного программой, мажорный пик в 200 и более раз выше порогового значения, при этом не выходит из рабочего диапазона 8000 относительных единиц интенсивности флуоресценции (для генетического

анализатора ABI 3130). На рисунке 4 приведены формулы для расчёта химеризма [94].

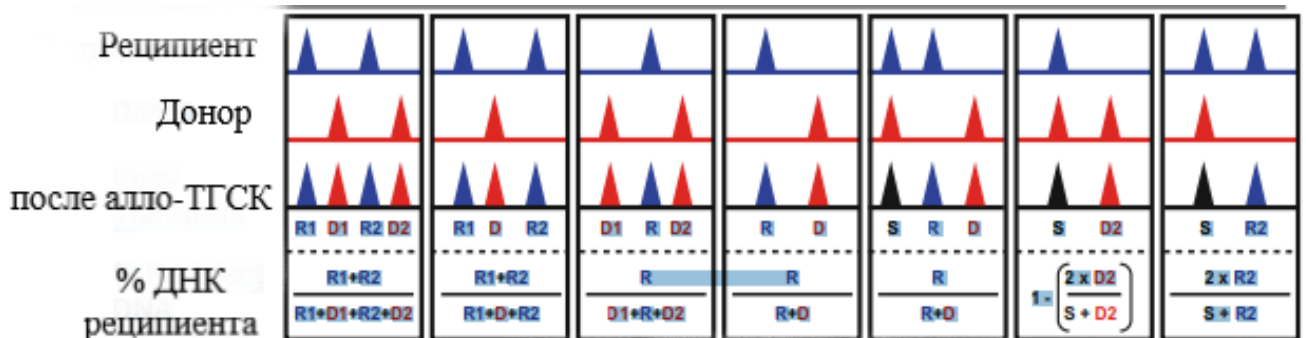
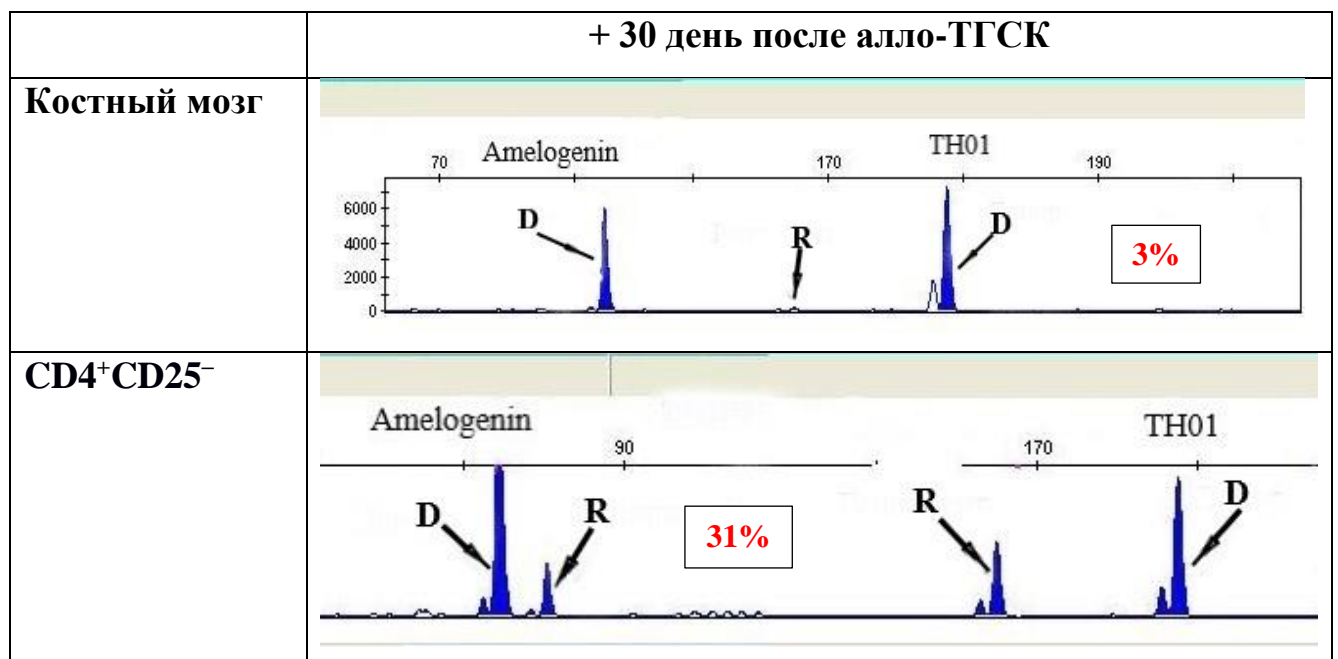


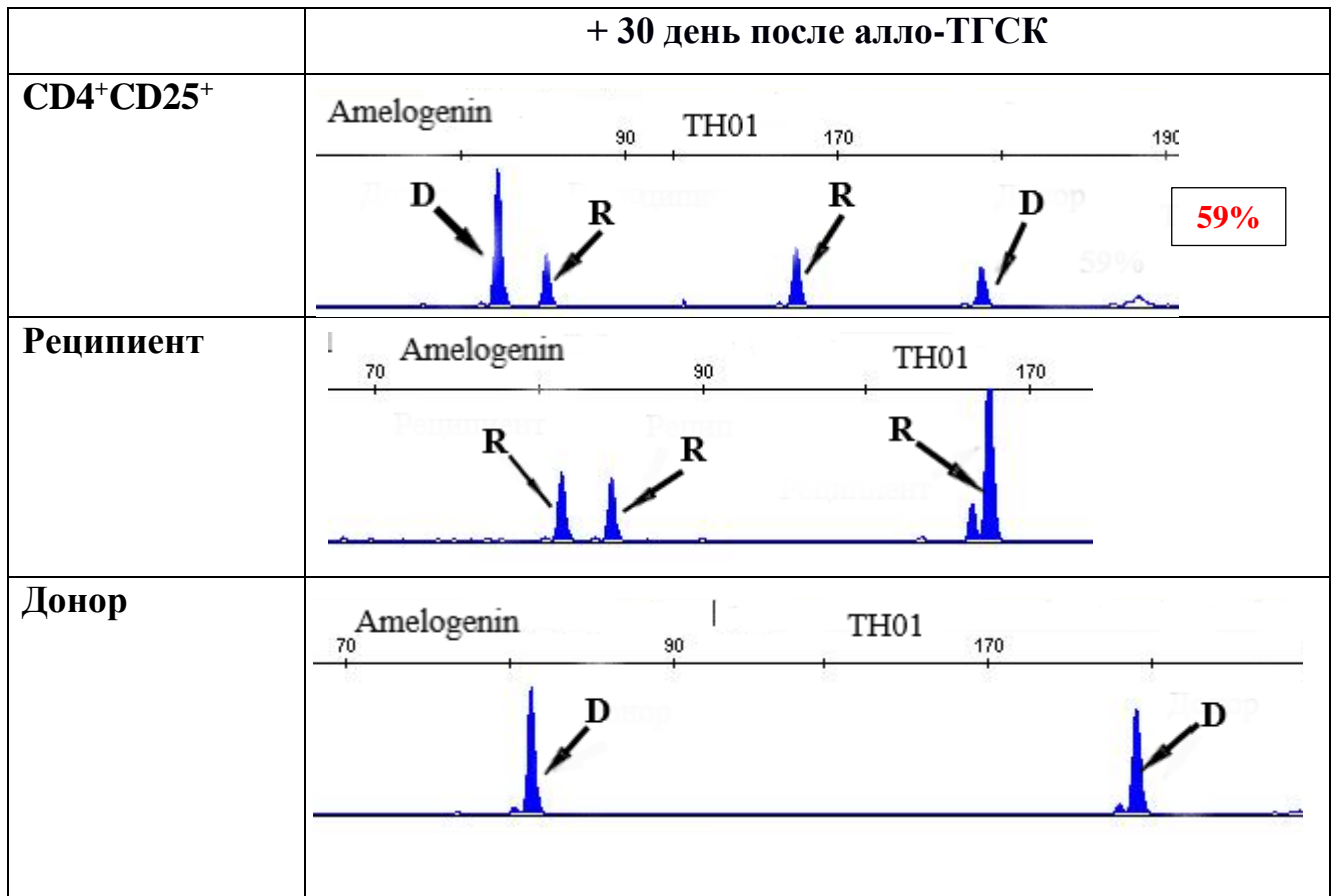
Рисунок 4 – Формулы для расчёта химеризма (R – реципиент, D – донор).

Далее приведены типичные примеры данных, анализ которых производился для определения химеризма. В таблице 4 продемонстрирована электрофореграмма пациента, включенного в исследование на сроке +30 день алло-ТГСК, где отражается динамика химеризма в различных клеточных субпопуляциях.

Таблица 4 – Динамика химеризма в костном мозге, периферической крови ($CD4^+CD25^-$, $CD4^+CD25^+$ клетках) на +30 день алло-ТГСК



Продолжение таблицы 4




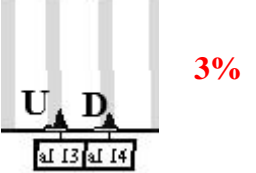
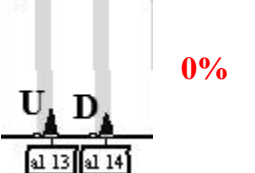
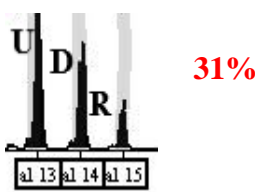

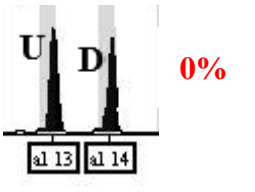
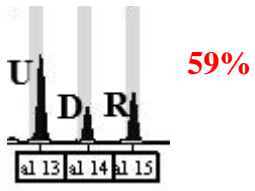
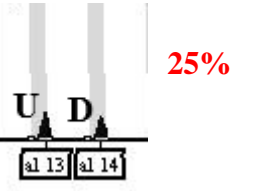
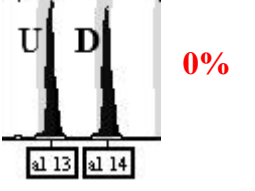
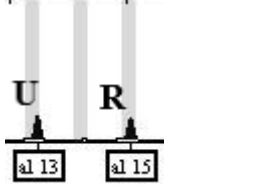
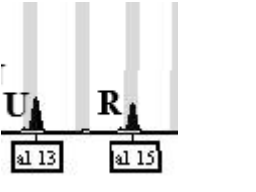
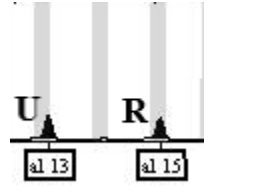



STR-маркеры: amelogenin X, amelogenin Y, TH01.

D – донор, R – реципиент.

Поскольку данный пациент мужчина, а его донор женщина, маркер амелогенина Y подходит для мониторинга химеризма. STR маркер TH01 представлен у донора и реципиента уникальными гомозиготными аллельными вариантами, что тоже удобно для мониторинга химеризма. Процент клеток хозяйского генотипа в костном мозге 3%, в периферической крови среди Т-кон – 31%, среди Т-рег – 59%, совпадающий по двум молекулярным маркерам (amelogenin Y, TH01).

В таблице 5 продемонстрирована электрофореграмма пациента, представленного ранее в таблице 4 на сроке +30, +60, +90 дни после алло-ТГСК.

Таблица 5 – Динамика химеризма в костном мозге, периферической крови (CD4⁺CD25⁻, CD4⁺CD25⁺ клетках) на +30, +60, +90 дни после алло-ТГСК

	Дни после алло-ТГСК		
	+ 30 день	+ 60 день	+ 90 день
Костный мозг	 3%	 3%	 0%
CD4 ⁺ CD25 ⁻	 31%	 9%	 0%
CD4 ⁺ CD25 ⁺	 59%	 25%	 0%
Реципиент	 al 13 al 15	 al 13 al 15	 al 13 al 15
Донор	 al ? al 14	 al ? al 14	 al ? al 14

Информативный маркер D8S1179. U – неинформативный маркер, R – реципиент, D – донор, al – аллель.

Процент клеток хозяйского генотипа в костном мозге на +30 день – 3%, на +60 день после алло-ТГСК – 3%, на +90 день алло-ТГСК – 0%. Процент клеток хозяйского генотипа среди конвенциональных Т-хелперов составил на +30 день после алло-ТГСК – 31%, на +60 день – 9%, на +90 день – 0%. Процент клеток хозяйского генотипа среди Т-регуляторных клеток на +30 день после алло-ТГСК – 59%, на +60 день алло-ТГСК – 25%, на +90 день – 0% клеток хозяйского генотипа.

2.15 Статистическая обработка данных

Статистический анализ данных проводился с использованием статистического пакета R 4.1 и графической оболочки RStudio и пакетов ggplot2, survival, survminer, cmprsk, dplyr (США). С целью проверки нормальности распределения исследуемых выборок был использован критерий Шапиро-Уилка. Учитывая распределение отличное от нормального, для дальнейшей оценки различий между тремя и более независимыми выборками использовался критерий Краскела — Уоллиса, между двумя независимыми выборками - U-критерий Манна-Уитни. Учитывая малые выборки и распределение отличное от нормального, для анализа повторных измерений (динамики) был использован критерий Фридмана. Для анализа таблиц сопряжённости использовался критерий хи-квадрат, для таблиц 2 x 2 применялся точный тест Фишера.

В работе были использованы методы описательной статистики. Данные представлены посредством медианы, межквартильного интервала – разницы между 1-м и 3-м квартилями (то есть между 25-м и 75-м перцентилями). Графические данные представлены в виде «боксов с усами», на которых обозначены медиана, 25 перцентиль и 75 перцентиль, «усами» показаны значения 25-го и 75-го перцентиль $\pm 1,5$ величины межквартильного размаха. Точками на графиках отображены «выбросы» – значения, попадающие в интервал 1,5–3-х величин межквартильного размаха. Для оценки корреляции был использован коэффициент Спирмана, а для оценки силы связи была использована шкала Чеддока: 0 – 0,3 очень слабая, 0,3 – 0,5 слабая, 0,5 – 0,7 средняя, 0,7 – 0,9 высокая, 0,9 – 1 очень высокая. Для демонстрации динамики был использован линейный график, на котором отражены медианы исследуемых групп. Анализ общей и безрецидивной выживаемости проводился с использованием метода Каплан-Мейера, для сравнения двух кривых выживаемости применялся log-ранк тест. При оценке вероятности развития оРТПХ был использован метод конкурирующих рисков. В качестве конкурирующего риска рассматривалась смерть и несостоятельность трансплантата (первичная или

вторичная несостоятельность), для сравнения двух кривых был использован тест Грея.

Глава 3. Результаты исследования и обсуждения

3.1 Клинические результаты

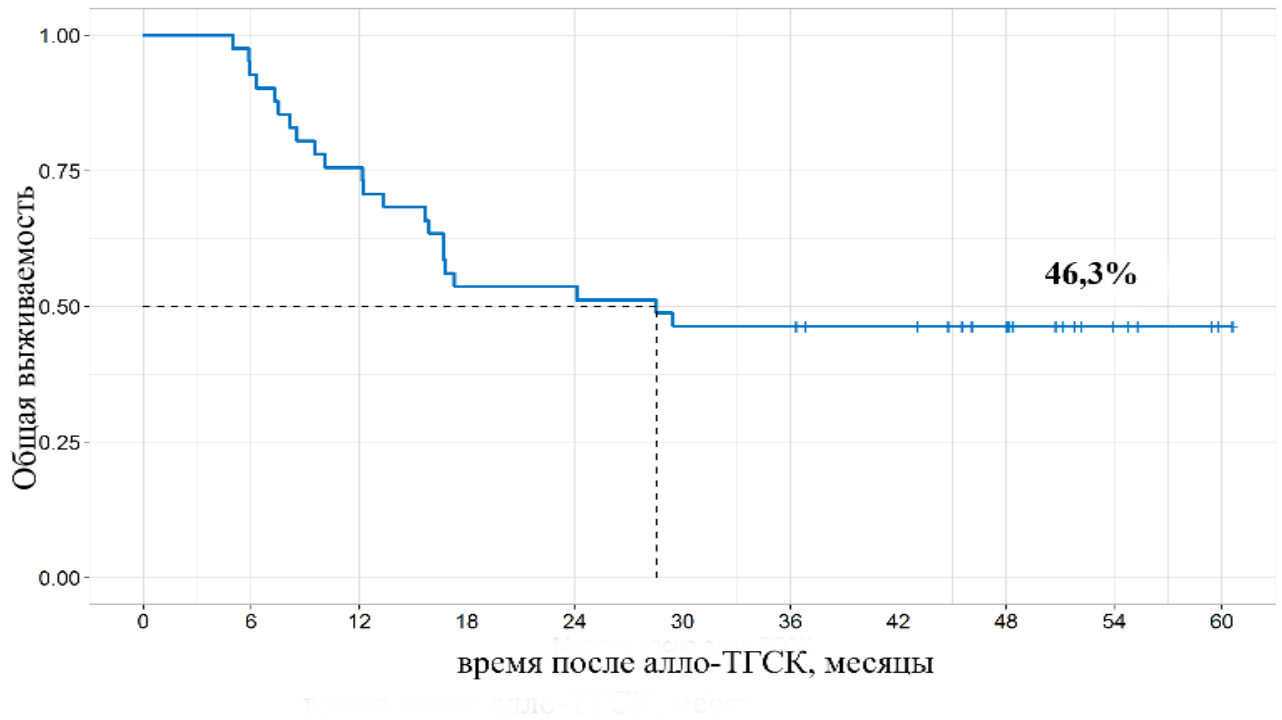
В исследование, посвященное анализу химеризма у пациентов после алло-ТГСК, было включено 42 пациента с острыми лейкозами (ОМЛ – 32, ОЛЛ – 10). Из них в ремиссии заболевания 40 пациентов (в первой ремиссии находилось 29 пациентов, вторая ремиссия установлена у 11), двоим пациентам трансплантация аллогенных гемопоэтических стволовых клеток выполнялась вне полной ремиссии заболевания.

У 38,1% больных (n = 16) была диагностирована оРТПХ. В этой группе у 50% больных (n = 8) оРТПХ развилась вследствие отмены иммуносупрессивной терапии и/или последующей трансфузии лимфоцитов донора в результате нарастания смешанного кроветворения. оРТПХ I степени составила – 9,5% (n = 4), оРТПХ II степени – 9,5% (n = 4), оРТПХ III степени – 19% (n = 8). Медиана времени развития оРТПХ составила 88,5 (16–267) дней.

Рецидив острого лейкоза после алло-ТГСК констатирован у 13 из 42 (31%) пациентов.

Общая выживаемость (ОВ) в течение 60 месяцев в нашей исследовательской работе, также как и безрецидивная выживаемость (БРВ) составила 46,3% (рисунок 5, А – Б)

А



Б

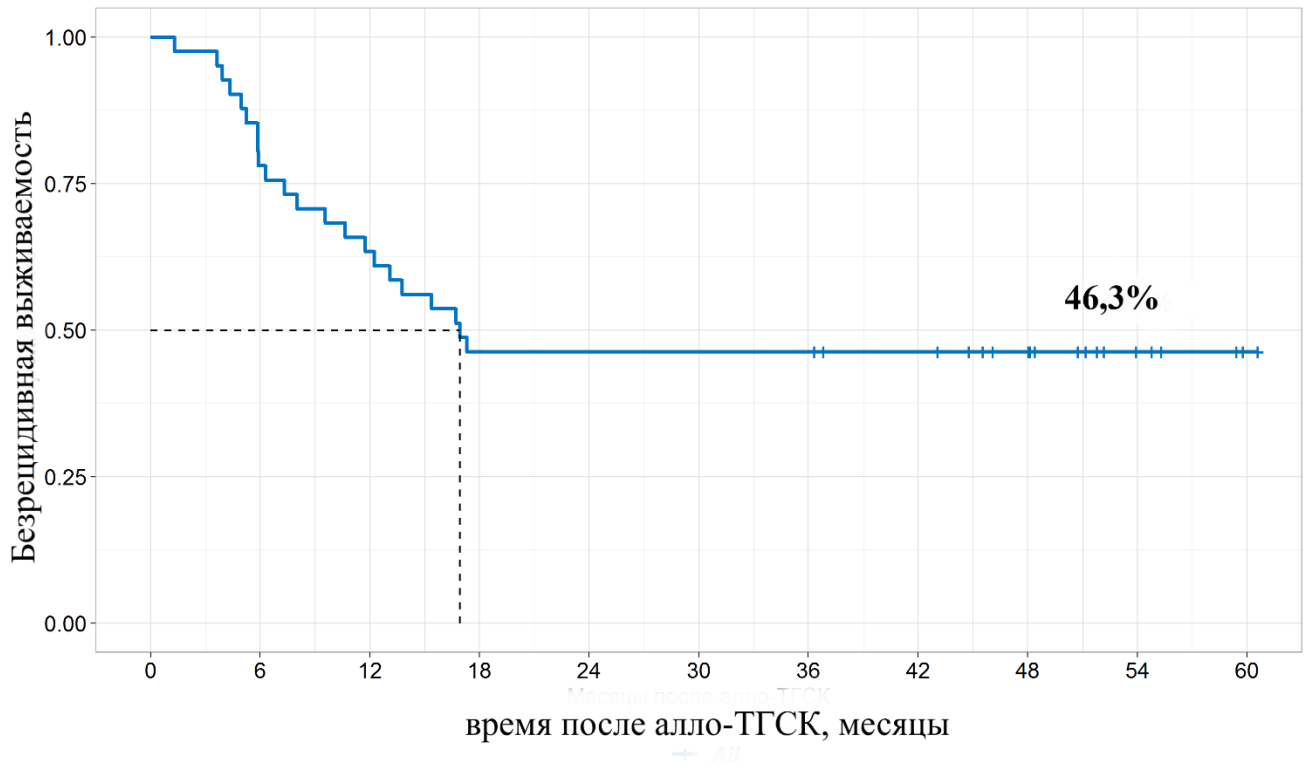


Рисунок 5 – Результаты алло-ТГСК у пациентов, включенных в исследование.
 А – 5-летняя общая выживаемость. Б – 5-летняя безрецидивная выживаемость.

3.2 Взаимосвязь значений химеризма в клетках костного мозга и различных популяциях Т-клеток периферической крови

В работе был проведён анализ взаимосвязи химеризма в костном мозге и Т-хелперах периферической крови. Стоит отметить, что на всех сроках после трансплантации имеется корреляция между химеризмом в костном мозге и отдельными популяциями Т-клеток хелперов (Т-конвенциональные и Т-регуляторные клетки). Детальная информация о силе связи химеризма в отдельных популяциях с оценкой представлена в таблице 6.

Таблица 6 – Коэффициенты корреляции между значениями химеризма на различные сроки после алло-ТГСК в различных популяциях

		+30 день			+60 день			+90 день		
		КМ	CD4 ⁺ CD25 ⁻	CD4 ⁺ CD25 ⁺	КМ	CD4 ⁺ CD25 ⁻	CD4 ⁺ CD25 ⁺	КМ	CD4 ⁺ CD25 ⁻	CD4 ⁺ CD25 ⁺
+30 день	КМ	—	0,643**	0,437**	0,524**	0,637**	0,427*	0,293	0,275	0,308
	CD4 ⁺ CD25 ⁻	0,643**	—	0,816**	0,589**	0,781**	0,609**	0,393*	0,505**	0,561**
	CD4 ⁺ CD25 ⁺	0,437**	0,816**	—	0,664**	0,652**	0,808**	0,179	0,240	0,480*
+60 день	КМ	0,524**	0,589**	0,664**	—	0,798**	0,728**	0,543**	0,536**	0,524**
	CD4 ⁺ CD25 ⁻	0,637**	0,781**	0,652**	0,798**	—	0,809**	0,466*	0,671**	0,655**
	CD4 ⁺ CD25 ⁺	0,427*	0,609**	0,808**	0,728**	0,809**	—	0,275	0,620**	0,742**
+90 день	КМ	0,293	0,393*	0,179	0,543**	0,466*	0,275		0,461**	0,380*
	CD4 ⁺ CD25 ⁻	0,275	0,505**	0,240	0,536**	0,671**	0,620**	0,461**	—	0,916**
	CD4 ⁺ CD25 ⁺	0,308	0,561**	0,480*	0,524**	0,655**	0,742**	0,380*	0,916**	—

** – корреляция значима на уровне 0,01; * – корреляция значима на уровне 0,05

При сравнении химеризма на сроке +30 день алло-ТГСК мы наблюдали статистически достоверные различия в проценте клеток с хозяйским генотипом между исследуемыми клетками костного мозга и Т-кон (p = 0,0012), между клетками костного мозга в сравнении с Т-рег (p = 0,0016) (Рисунок 6).

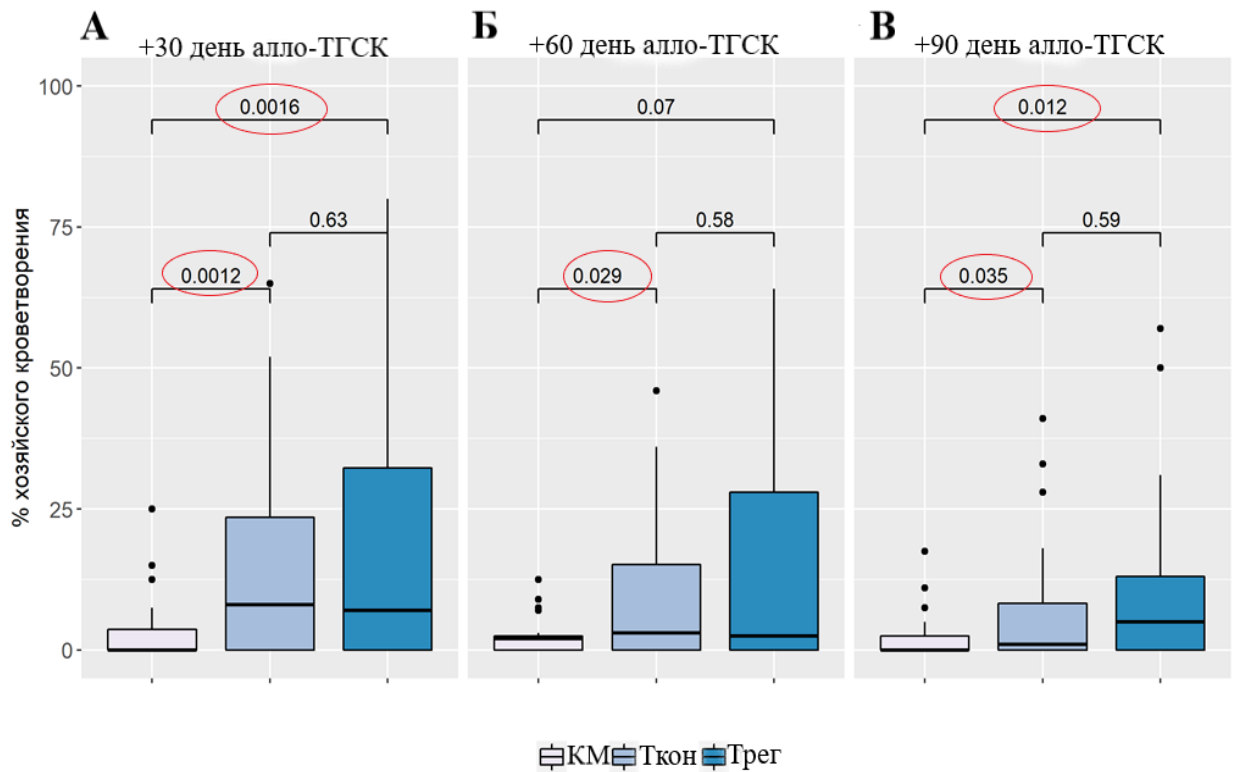


Рисунок 6 – Сравнение химеризма в пунктате костного мозга и среди Т-кон и Т-рег периферической крови в зависимости от сроков после алло-ТГСК. А – химеризм на сроке +30 день алло-ТГСК. Б – химеризм на сроке +60 день алло-ТГСК. В – химеризм на сроке +90 день алло-ТГСК.

При сравнении хозяйского химеризма среди Т-рег и Т-кон на +30 день алло-ТГСК статистически значимой разницы не выявлено ($p = 0,63$). В клетках костного мозга доля клеток с хозяйским генотипом составила 0% (0 – 4%), в периферической крови в Т-регуляторных клетках доля клеток с хозяйским генотипом была 7% (0 – 33,5%), в Т-конвенциональных клетках доля клеток с хозяйским генотипом составила 8% (0 – 25%).

Стоит отметить, что, сравнивая показатели химеризма на +60 день алло-ТГСК, мы выявили достоверные различия в примеси хозяйского кроветворения в клетках костного мозга и среди Т-кон ($p = 0,029$). Статистически значимой разницы между хозяйским химеризмом в костном мозге и среди Т-рег ($p = 0,07$) не обнаружено.

Также мы не получили достоверной разницы химеризма между Т-кон и Т-рег на этом сроке ($p = 0,58$). В костном мозге доля клеток, принадлежавших реципиенту, составила 2% (0 – 2,5%), в Т-рег доля клеток хозяина была 2,5% (0 – 28%) и в Т-кон – 3% (0 – 16%).

Исследуя химеризм на +90 день алло-ТГСК, мы обнаружили статистически достоверные различия в показателях химеризма в клетках костного мозга и среди Т-кон ($p=0,035$), в клетках костного мозга в сравнении с Т-рег ($p=0,012$). Между Т-рег и Т-кон разницы получено не было ($p=0,59$). В клетках костного мозга доля хозяйского кроветворения составила 0% (0 – 2,5%), среди Т-рег доля клеток с хозяйским генотипом была 5% (0 – 13%) и среди Т-кон примесь клеток реципиента составила 1% (0 – 10%).

Таким образом, можно сделать заключение, что химеризм в костном мозге ниже, чем в отдельных популяциях Т-хелперов периферической крови на всех сроках в первые 100 дней после трансплантации.

3.3 Характеристика химеризма в костном мозге и субпопуляциях $CD4^+CD25^-$, $CD4^+CD25^+$ Т-клеток после трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток у больных с различными вариантами острого лейкоза

При исследовании химеризма в костном мозге на +30 день доля клеток с хозяйским генотипом в костном мозге у пациентов с ОЛЛ составила 0% (0 – 2,5%), а у пациентов с ОМЛ 1,0% (0 – 4,5%), различие между этими группами было статистически незначимым ($p = 0,26$) (Рисунок 7).

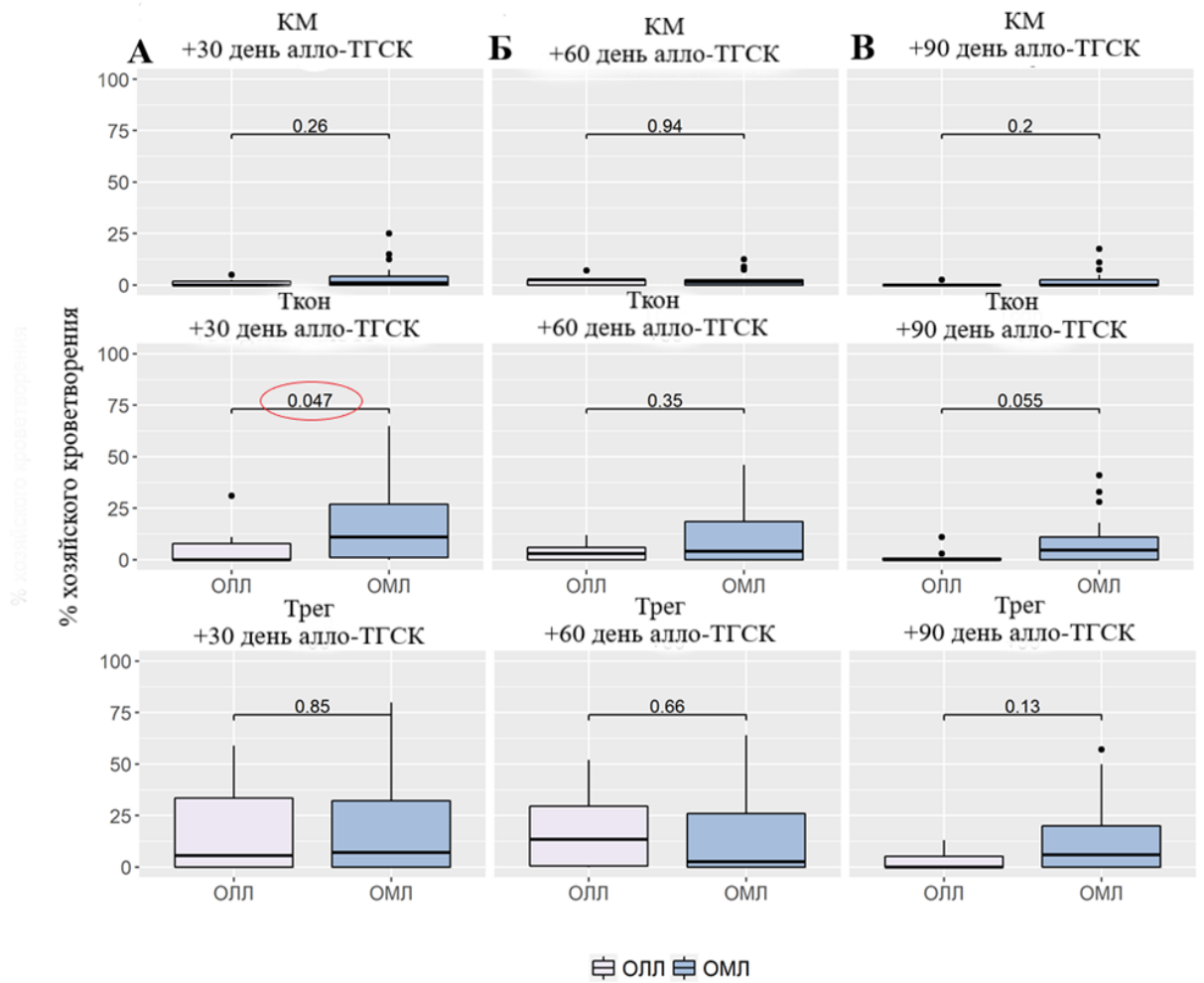


Рисунок 7 – Химеризм в пунктате костного мозга и среди Т-кон, Т-рег периферической крови на +30, +60, +90 дни после трансплантации в зависимости от варианта острого лейкоза. А – химеризм на сроке +30 день алло-ТГСК. Б – химеризм на сроке +60 день алло-ТГСК. В – химеризм на сроке +90 день алло-ТГСК.

Мы наблюдали высокий процент клеток с хозяйским генотипом на +30 день среди Т-регуляторных клеток периферической крови: у больных с ОЛЛ доля Т-рег с хозяйским генотипом составляла 5,5% (0 – 36%), у пациентов с диагнозом ОМЛ – 7% (0 – 33,5%), различие между этими группами также оказалось статистически незначимым ($p = 0,85$). Среди Т-кон на сроке +30 день алло-ТГСК получены значимые различия между группами пациентов с ОЛЛ и ОМЛ ($p = 0,047$). Доля

клеток с хозяйским генотипом у пациентов с ОЛЛ составила 0 % (0 – 8%), у больных с диагнозом ОМЛ – 11% (1– 27%) соответственно.

При исследовании химеризма на +60 день после алло-ТГСК не было получено статистической разницы у пациентов с диагнозом ОЛЛ и ОМЛ. В костном мозге, у пациентов с ОЛЛ доля клеток с хозяйским генотипом составила – 2,5% (0 – 2,5%), с ОМЛ – 1,5% (0 – 2,50%), $p = 0,94$. В популяции Т-рег периферической крови отмечалось следующее: доля клеток с хозяйским генотипом у пациентов с ОЛЛ составляла 13,5% (0 – 31%), у больных с диагнозом ОМЛ доля клеток, принадлежавших реципиенту, была 2,5% (0 – 28%), $p = 0,66$. Среди Т-кон на сроке +60 день алло-ТГСК процент клеток с хозяйским генотипом у пациентов с ОЛЛ составил 3% (0 – 9,0%), у пациентов с диагнозом ОМЛ – 4,0% (0 – 20%), $p = 0,35$.

На сроке +90 день после алло-ТГСК в костном мозге не получена значимая разница химеризма у пациентов с острыми лейкозами ($p = 0,2$), практически одинаковая доля клеток с хозяйским генотипом в обеих группах 0% (0 – 2,5%) и 0% (0 – 0%) для ОМЛ и ОЛЛ соответственно, чего нельзя сказать при исследовании клеток хозяйского генотипа среди субпопуляций Т-лимфоцитов. Химеризм среди Т-рег на этом сроке у больных с ОЛЛ составил 0% (0 – 5,5%), у пациентов с диагнозом ОМЛ – 6% (0 – 20%), $p = 0,13$. У больных с ОЛЛ отмечалась тенденция к уменьшению доли клеток с хозяйским генотипом среди Т-кон до 0% (0 – 1,5%), у пациентов с диагнозом ОМЛ доля клеток с хозяйским генотипом среди Т-кон составляла 4,6% (0 – 12%), однако статически значимой разницы не обнаружено ($p = 0,055$).

Таким образом, было показано, что различия химеризма у пациентов с ОЛЛ и ОМЛ имеются только среди Т-кон на сроке +30 день алло-ТГСК.

3.4 Химеризм в костном мозге и в субпопуляциях CD4⁺CD25⁻, CD4⁺CD25⁺ Т-клеток после трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток у больных с острыми лейкозами с различным статусом заболевания

На +30 день доля клеток с хозяйским генотипом в костном мозге у пациентов в первой ремиссии (ПР1) составила 2,5% (0 – 5,0%), во второй полной ремиссии (ПР2) – 0% (0 – 0%), $p = 0,036$. В группе ПР1 трансплантация от родственного полностью совместимого донора была выполнена в 38% случаях, в то время как в группе ПР2 лишь в 9,1%. Полученные результаты объясняются более частым применением родственного HLA-идентичного донора и режимов с лАТГ у пациентов в ПР1, в то время как пациенты во ПР2 чаще трансплантируются от неродственных и других доноров. У пациентов, у которых трансплантация была выполнена в развернутом рецидиве заболевания доля клеток с хозяйским генотипом составляла 1,25% (0 – 2,5%). При сравнении химеризма у пациентов в ПР1 и рецидиве заболевания не получены достоверные различия ($p = 0,64$), также как в группе пациентов в ПР2 и рецидиве заболевания ($p = 0,5$) (Рисунок 8).

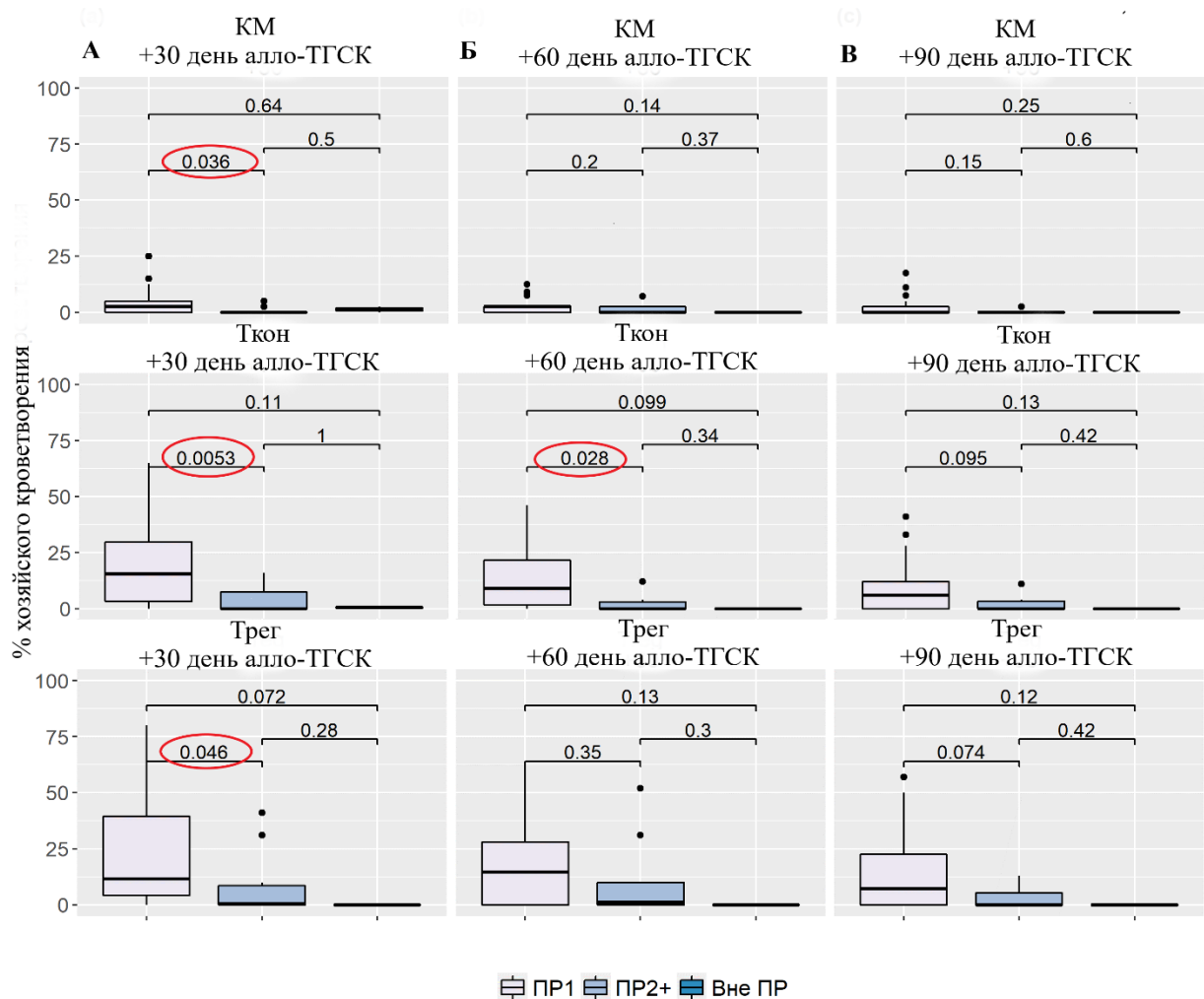


Рисунок 8 – Химеризм в пунктате костного мозга и среди Т-кон, Т-рег периферической крови в зависимости от статуса заболевания. А – химеризм на сроке +30 день алло-ТГСК. Б – химеризм на сроке +60 день алло-ТГСК. В – химеризм на сроке +90 день алло-ТГСК.

Среди Т-кон на сроке +30 день алло-ТГСК мы наблюдали 15,5% (3 – 30%) клеток с хозяйским генотипом у пациентов в ПР1, у больных в ПР2 – 0% (0 – 8%). У пациентов, которым трансплантация была выполнена в рецидиве заболевания доля клеток с хозяйским генотипом составляла 0,5% (0 – 1%). У пациентов в ПР1 и ПР2 среди Т-конвенциональных клеток были получены статистически значимые различия ($p = 0,0053$).

При оценке химеризма среди Т-рег на +30 день алло-ТГСК мы наблюдали большую примесь клеток с хозяйским генотипом. У больных в ПР1 отмечался смешанный химеризм в Т-рег: доля клеток с хозяйским генотипом составляла 11,5% (3,5 – 40%); у пациентов в ПР2 доля клеток, принадлежавших реципиенту, составляла 0,5% (0 – 10%), $p = 0,046$. Если алло-ТГСК выполнялась в рецидиве заболевания, то доля клеток с хозяйским генотипом среди Т-рег составляла 0% (0 – 0%). Мы получили значимые различия химеризма среди Т-рег на +30 день алло-ТГСК у пациентов в ПР1 и ПР2 ($p = 0,046$). Достоверных различий химеризма у больных в ПР1 и рецидиве ($p = 0,072$) не выявлено, также как не обнаружено различия химеризма среди Т-рег у пациентов в ПР2 и рецидиве заболевания ($p = 0,28$). Полученные результаты могут быть обусловлены тем, что в большинстве случаев алло-ТГСК выполняется в ремиссии заболевания и группа больных в рецидиве немногочисленная, однако стоит отметить, что у пациентов в рецидиве не обнаружено Т-рег с хозяйским генотипом.

При исследовании химеризма в костном мозге на +60 день после алло-ТГСК не было получено статистической разницы между показателями химеризма у пациентов в зависимости от статуса заболевания до алло-ТГСК. У пациентов в ПР1 доля клеток с хозяйским генотипом в костном мозге составляла 2,5% (0 – 2,75%), у больных в ПР2 доля клеток, принадлежавших реципиенту, составляла 0% (0 – 2,5%), у больных в рецидиве заболевания примеси клеток с хозяйским генотипом в костном мозге не выявлено 0% (0 – 0%).

При оценке химеризма на +60 день алло-ТГСК среди Т-кон доля клеток с хозяйским генотипом в ПР1 составляла 9% (0 – 23%), во ПР2 – 0% (0 – 3%), у пациентов в рецидиве заболевания клеток с хозяйским генотипом среди Т-кон не обнаружено 0% (0–0%). Мы получили значимые результаты при сравнении химеризма у больных в ПР1 и ПР2 ($p = 0,028$).

При оценке химеризма среди Т-рег у пациентов с различным статусом заболевания перед алло-ТГСК, не были получены достоверные различия на сроке +60 день после трансплантации. Доля клеток с хозяйским генотипом среди Т-рег у пациентов в ПР1 составляла 14,5% (0 – 28%), у пациентов в ПР2 заболевания – 1%

(0 – 17%), у пациентов в рецидиве заболевания примесь клеток с хозяйским генотипом среди Т-рег не обнаружена – 0% (0 – 0%).

На сроке +90 день после алло-ТГСК в костном мозге значимые различия в показателях химеризма в зависимости от статуса заболевания не получены. Примесь клеток с хозяйским генотипом в костном мозге в группе пациентов в первой ремиссии и во второй ремиссии заболевания 0% (0 – 2,5%) и 0% (0 – 0%), соответственно ($p = 0,15$). У пациентов, трансплантированных вне ремиссии заболевания, процент клеток с хозяйским генотипом в костном мозге составил 0% (0–0%). Статически значимой разницы при сравнении с группой пациентов в ПР1 ($p = 0,25$) и с группой пациентов в ПР2 ($p = 0,6$) не отмечено.

При оценке химеризма среди Т-кон на +90 день алло-ТГСК у пациентов в ПР1 доля клеток с хозяйским генотипом составляла 6% (0–12%), у больных в ПР2 доля клеток, принадлежавших реципиенту, составляла 0% (0 – 3,5%), у пациентов в рецидиве заболевания клеток, принадлежавших реципиенту, не было обнаружено 0% (0 – 0%). Мы не наблюдали значимых различий в химеризме среди Т-кон на сроке +90 день алло-ТГСК у пациентов с различным статусом заболевания.

При исследовании химеризма среди Т-рег на +90 день алло-ТГСК у пациентов в ПР1 доля клеток с хозяйским генотипом составляла 7% (0 – 25%), у больных в ПР2 – 0% (0 – 5,5%), в рецидиве заболевания – 0% (0 – 0%). При сравнении показателей химеризма во всех трех группах, достоверных различий получено не было.

По полученным данным видно, что у пациентов, которым трансплантация была выполнена в ПР1 имеется более высокий процент клеток с хозяйским генотипом в Т-регуляторных клетках, чем у пациентов в ПР2 и рецидиве заболевания. По всей видимости, это связано с большим числом трансплантаций от родственного полностью совместимого донора (время до проведения трансплантации сильно зависит от доступности донора, и именно поэтому в ПР1 чаще всего трансплантируются пациенты с родственным HLA-идентичным донором, так как не тратится время на поиск неродственных доноров), где применялся ЛАТГ в качестве профилактики РТПХ, в то время как для ПР2

характерно большее использование частично-совместимых доноров и применение ПТ-ЦФ соответственно.

3.5 Химеризм в костном мозге и в субпопуляциях CD4⁺CD25⁻, CD4⁺CD25⁺ Т-клеток после трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток у больных с острыми лейкозами после кондиционирования различной интенсивности

При исследовании химеризма на +30 день в костном мозге у пациентов с кондиционированием в миелоаблативном режиме доля клеток с хозяйским генотипом составляла 0% (0 – 3,75%), у пациентов с кондиционированием в режиме пониженной интенсивности – 0% (0 – 4%). Мы не получили достоверных различий химеризма в костном мозге у пациентов с различными видами кондиционирования ($p = 0,99$). В этот же срок среди Т-рег процент клеток с хозяйским генотипом у пациентов с кондиционированием MAC составляла 8,5% (1 – 25%), в группе пациентов после кондиционирования в режиме RIC – 6% (0 – 41%), что также оказалось статистически незначимым результатом ($p = 0,96$). При оценке химеризма среди Т-кон доля клеток с хозяйским генотипом у пациентов с кондиционированием MAC – 8% (0 – 22%), RIC – 8,5% (0 – 28,5%), ($p = 0,83$) (Рисунок 9).

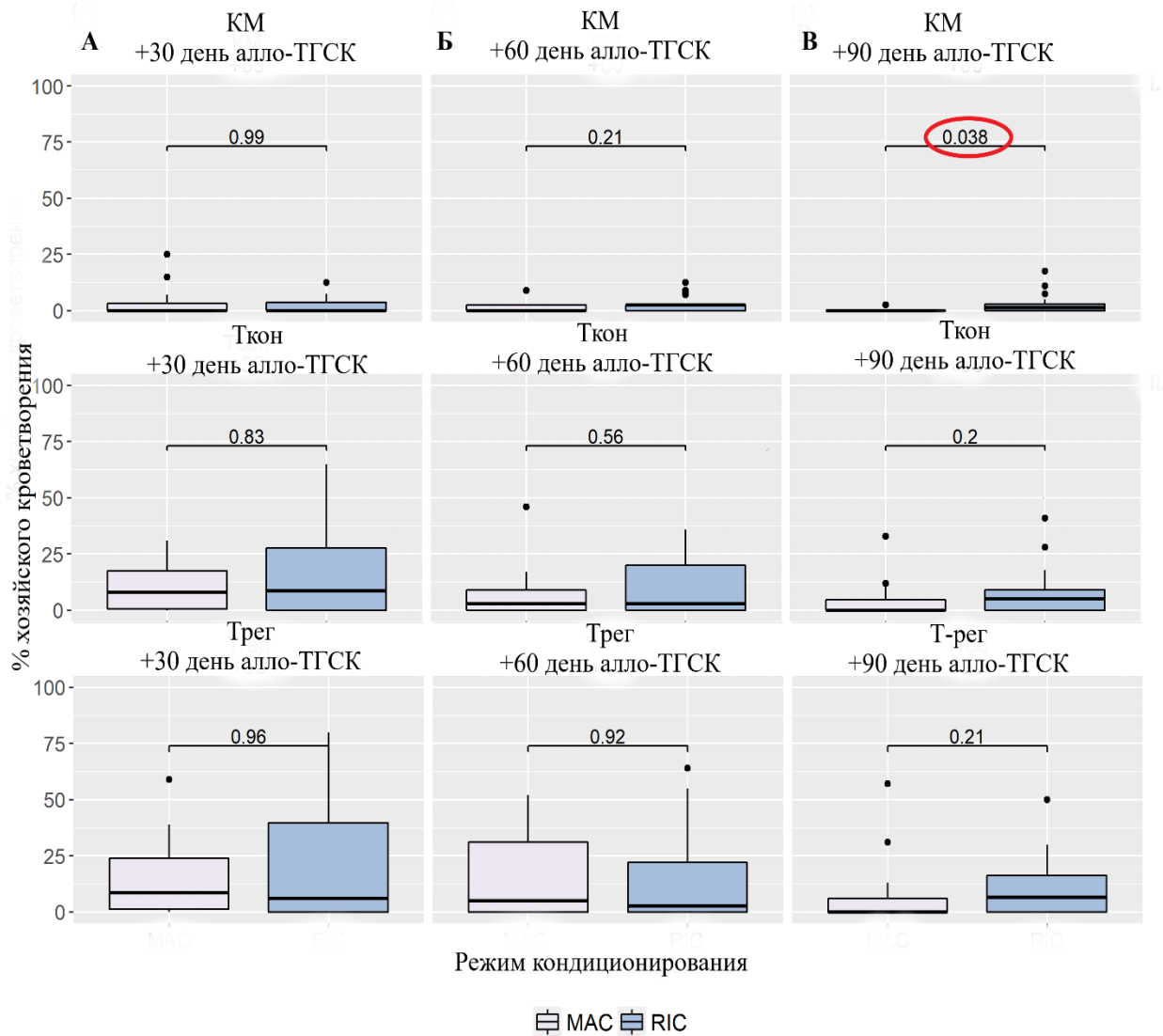


Рисунок 9 – Химеризм в пунктате костного мозга и среди Т-кон, Т-рег периферической крови в зависимости от режима кондиционирования. А – химеризм на сроке +30 день алло-ТГСК. Б – химеризм на сроке +60 день алло-ТГСК. В – химеризм на сроке +90 день алло-ТГСК.

При исследовании химеризма на +60 день после алло-ТГСК не было получено статистической разницы у пациентов с различным кондиционированием. В костном мозге доля клеток, принадлежавших реципиенту, после кондиционирования MAC составляла 0% (0 – 2,5%), после кондиционирования в режиме RIC – 2,5 (0 – 2,5%), $p = 0,21$. Среди Т-рег процент клеток с хозяйским генотипом у пациентов после кондиционирования MAC составил 5% (0 – 34%),

после RIC доля клеток с хозяйским генотипом среди Т-рег составляла 2,5% (0 – 24%), ($p = 0,92$). Доля клеток с хозяйским генотипом среди Т-кон у пациентов с кондиционированием MAC составляла 3% (0 – 9%), у пациентов с RIC – 3% (0 – 20%), ($p = 0,56$).

На сроке +90 день после алло-ТГСК мы получили достоверные различия в костном мозге у пациентов с кондиционированием различной интенсивности ($p = 0,038$). При оценке химеризма в костном мозге доля клеток с хозяйским генотипом у пациентов после MAC составляла 0% (0 – 0%), после режима RIC – 1,25% (0 – 3%). Мы отметили, что на +90 день после алло-ТГСК уменьшается процент клеток с хозяйским генотипом среди Т-рег. У пациентов, которым проводилось кондиционирование в режиме MAC, процент клеток с хозяйским генотипом среди Т-рег составил 0% (0 – 6%), в группе пациентов с кондиционированием в режиме пониженной интенсивности – 6,5 (0 – 17,5%), однако различия были статистически не значимы. При оценке химеризма среди Т-кон на +90 день алло-ТГСК доля клеток с хозяйским генотипом у пациентов с MAC составляла 0% (0 – 4,6%), у пациентов с кондиционированием в режиме RIC 5% (0 – 10%), $p = 0,2$.

В нашей работе мы получили результаты, которые свидетельствуют, что интенсивность кондиционирования не влияет на химеризм у пациентов после алло-ТГСК.

3.6 Химеризм в костном мозге и в субпопуляциях $CD4^+ CD25^-$, $CD4^+ CD25^+$ клеток в зависимости от вида донора

В таблице 7 представлены результаты по исследованию химеризма в костном мозге, среди Т-рег, Т-кон периферической крови у пациентов после алло-ТГСК в зависимости от вида донора (совместимости по системе HLA между парой донор-реципиент).

Таблица 7 – Процент клеток с хозяйским генотипом в костном мозге, CD4⁺CD25⁻, CD4⁺CD25⁺ клетках периферической крови в зависимости от вида донора

	День после алло-ТГСК	Полностью совместимый родственный донор	Родственный гаплоидентичный донор	Полностью совместимый неродственный донор	Частично-совместимый неродственный донор	Р-значение
КМ	+30	5% (2,5 – 7,5%)	0% (0 – 2%)	0% (0 – 2,5%)	0% (0 – 0%)	0,001
	+60	2,5% (0 – 3%)	0% (0 – 0%)	2,5% (0 – 2,5%)	0% (0 – 2,5%)	0,473
	+90	0 (0 – 4%)	0% (0 – 0%)	0% (0 – 2,5%)	0% (0 – 0%)	0,265
CD4 ⁺ CD25 ⁻	+30	21,5% (8 – 31%)	0% (0 – 30%)	8% (0 – 16%)	0% (0 – 2,5%)	0,034
	+60	12,5% (3 – 20%)	0% (0 – 0%)	5,5% (1,5 – 14,5%)	0% (0 – 1,5%)	0,091
	+90	4,5 (0 – 17,5%)	0% (0 – 0%)	4% (0 – 6,5%)	1% (0 – 1%)	0,647
CD4 ⁺ CD25 ⁺	+30	11% (5 – 39%)	0% (0 – 58%)	14% (2,5 – 36%)	0% (0 – 16,5%)	0,244
	+60	14,5% (1 – 26,5%)	0% (0 – 0%)	10% (0 – 52%)	0% (0 – 10%)	0,216
	+90	6% (0 – 15%)	0% (0 – 0%)	5% (0 – 13%)	1,5% (0 – 14%)	0,69

При оценке химеризма в клетках костного мозга на +30 день в зависимости от вида донора нами были получены статистически значимые различия ($p = 0,001$). При попарном сравнении различия были отмечены лишь при сравнении групп с алло-ТГСК от родственного полностью совместимого донора и полностью совместимого неродственного ($p = 0,003$), частично-совместимого неродственного

($p = 0,0016$) и гаплоидентичного донора ($p = 0,035$). В остальные сроки эти различия исчезали.

Эти же отличия наблюдались и при сравнении значений химеризма в Т-кон на +30 день. Парно при трансплантации от неродственного частично-совместимого и родственного полностью совместимого донора ($p = 0,009$).

Несмотря на недостаточную статистическую значимость данных нами была отмечена тенденция к большему числу хозяйских Т-рег среди пациентов, которым трансплантация была выполнена от родственных и неродственных полностью совместимых доноров в сравнении с частично-совместимыми и гаплоидентичными донорами. А учитывая, что фундаментальным различием этих видов трансплантаций является прежде всего использование ЛАТГ при трансплантации от родственного и неродственного полностью совместимого донора и ПТ-ЦФ при трансплантации от частично-совместимого и гаплоидентичного донора, то в дальнейшем мы также провели анализ в зависимости от вида профилактики ОРТПХ.

Несмотря на маленькую выборку пациентов, мы провели многофакторный анализ с включением химеризма на +90 день, вида донора и источника трансплантата, статистически значимых результатов не получено.

3.7 Характеристика химеризма в костном мозге, CD4⁺ CD25⁻ клетках, CD4⁺CD25⁺ клетках в зависимости от источника трансплантата

При исследовании химеризма в костном мозге на +30 день алло-ТГСК доля клеток с хозяйским генотипом у пациентов, у которых в качестве трансплантата использовался костный мозг составляла 2,5% (0 – 6%), у пациентов, которым была выполнена трансплантация аллогенных гемопоэтических стволовых клеток крови процент клеток с хозяйским генотипом составил 0% (0 – 2,5%), отличие между этими группами оказалось статистически значимым ($p = 0,049$). В этот же срок мы

наблюдали повышенную долю клеток с хозяйским генотипом среди Т-рег у пациентов, которым была выполнена трансплантация костного мозга. Химеризм в этой группе составил 11% (2,5 – 48,5%), в то же время, у пациентов после трансфузии стволовых клеток крови процент клеток с хозяйским генотипом – 2% (0 – 21%), однако не было получено значимых различий при сравнении этих групп ($p = 0,095$). При оценке химеризма среди Т-кон на сроке +30 день алло-ТГСК у пациентов с источником трансплантата костный мозг доля клеток, принадлежавших реципиенту, составляла 11% (3 – 31%), у пациентов, которым была поведена трансплантация гемопоэтических стволовых клеток крови процент клеток составил 0% (0 – 10%). Мы получили достоверные различия в разнице хозяйского химеризма среди Т-конвенциональных клеток между пациентами с различными источниками трансплантата ($p = 0,0065$) (Рисунок 10).

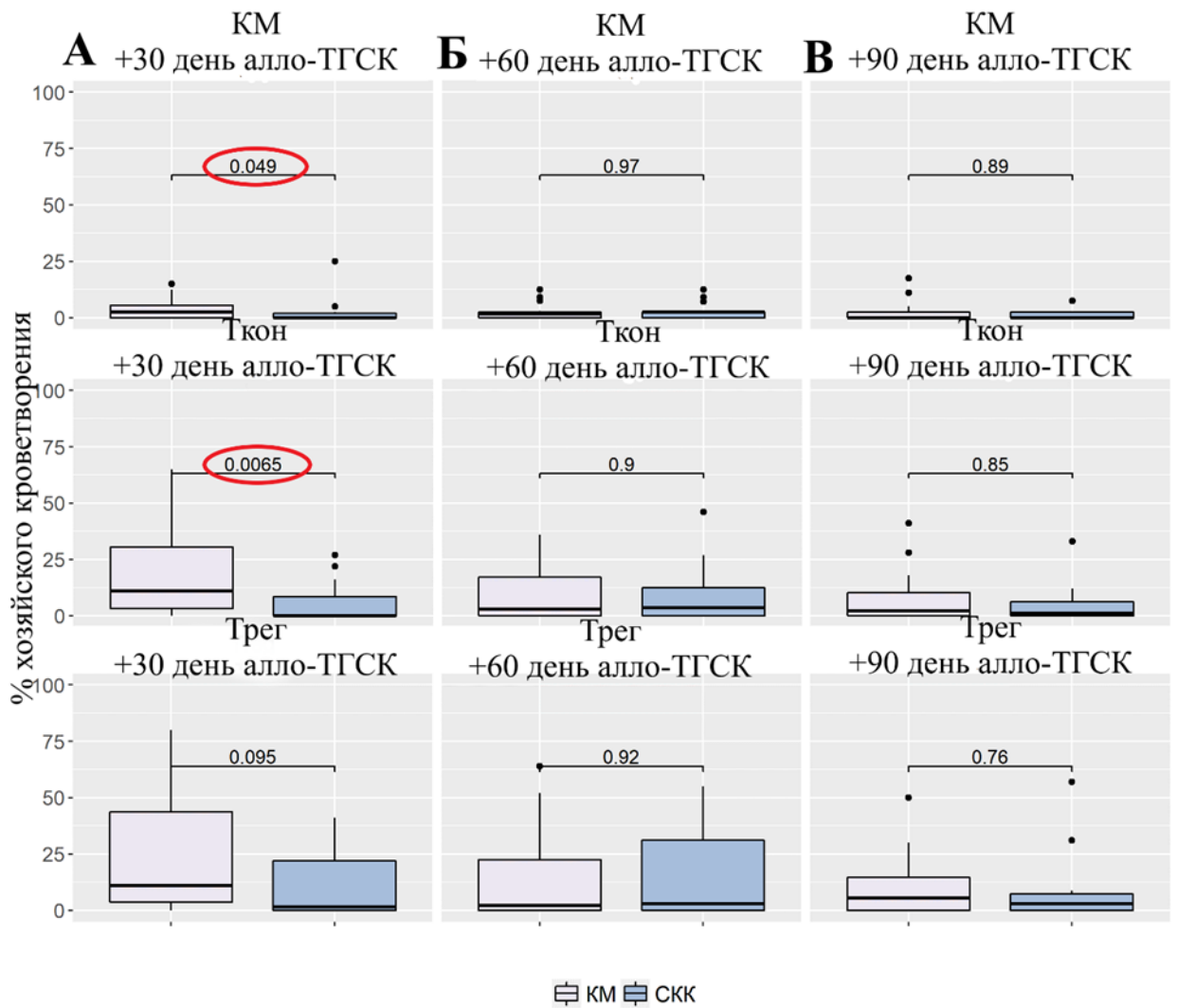


Рисунок 10 – Химеризм в пунктате костного мозга и среди Т-кон, Т-рег периферической крови в зависимости от источника трансплантата. А – химеризм на сроке +30 день алло-ТГСК. Б – химеризм на сроке +60 день алло-ТГСК. В – химеризм на сроке +90 день алло-ТГСК.

При исследовании химеризма в костном мозге на +60 день после алло-ТГСК не было получено статистической разницы в доле клеток хозийского генотипа у пациентов в зависимости от вида источника трансплантата (костный мозг, стволовые клетки крови), $p = 0,97$. Доля клеток с хозийским генотипом у пациентов, которым была выполнена трансплантация костного мозга составляла 1,5% (0 – 2,5%), у пациентов, которым была выполнена трансплантация гемопоэтических

стволовых клеток крови процент клеток с хозяйским генотипом в костном мозге составил 2,5% (0 – 2,5%). В популяции Т-рег на сроке +60 день алло-ТГСК отмечалось следующие: доля клеток с хозяйским генотипом у пациентов после трансплантации костного мозга составляла 2,0% (0 – 25%), стволовых клеток крови – 3,0% (0 – 31%), группы не различались по этому признаку ($p = 0,92$). В этот же срок, при оценке химеризма среди Т-кон, у пациентов после трансплантации костного мозга процент клеток с хозяйским генотипом составил 3% (0 – 18%), после трансплантации стволовых клеток крови 3,5% (0 – 12,5%), значение $p = 0,9$.

При исследовании химеризма в костном мозге на сроке +90 день после алло-ТГСК не получена значимая разница химеризма у пациентов в зависимости от источника трансплантата ($p = 0,89$), одинаковая доля клеток с хозяйским генотипом среди клеток костного мозга в обеих группах 0% (0–2,5%). При исследовании химеризма среди Т-рег достоверной разницы в зависимости от источника трансплантата не отмечено ($p = 0,76$), доля клеток с хозяйским генотипом у пациентов после трансплантации костного мозга составляла 5,5% (0 – 15%), после трансплантации стволовых клеток крови – 3% (0 – 8,6%). Исследуя динамику химеризма среди Т-кон, на этом сроке, мы наблюдали уменьшение клеток с хозяйским генотипом по сравнению с более ранними сроками алло-ТГСК. У пациентов после трансплантации костного мозга доля клеток с хозяйским генотипом среди Т-кон составляла 2% (0 – 10,5%), после трансплантации стволовых клеток крови – 1% (0 – 6,5%), однако статистически значимых различий не получено ($p = 0,85$).

Полученные на ранних сроках различия, по всей видимости, связаны с большим объемом Т-клеток переливаемых при трансплантации с использованием периферических стволовых клеток крови.

3.8 Характеристика химеризма в костном мозге, CD4⁺ CD25⁻ клетках, CD4⁺CD25⁺ клетках в зависимости от режима иммуносупрессивной терапии

При оценке химеризма в костном мозге на +30 день алло-ТГСК мы получили достоверные различия в зависимости от режима иммуносупрессивной профилактики. Доля клеток с хозяйским генотипом в костном мозге у пациентов после иммуносупрессивной терапии антитимоцитарным глобулином составляла 0% (0 – 5%), у пациентов, получавших ПТ-ЦФ – 0% (0 – 2%). У пациентов с другими видами иммуносупрессивной терапии процент клеток с хозяйским генотипом составил – 5% (2,5 – 7%). Достоверные различия мы получили при сравнении других видов иммуносупрессивной терапии с ПТ-ЦФ ($p = 0,0043$). На сроке +30 день в костном мозге мы не наблюдали статистической значимой разницы при использовании АТГ в сравнении с ПТ-ЦФ ($p = 0,1$), АТГ в сравнении с другими видами ИСТ ($p = 0,18$).

В этот же срок, при оценке химеризма среди Т-рег, мы наблюдали большее число клеток с хозяйским генотипом в группе пациентов с АТГ 11% (4 – 41%), с другими видами ИСТ 25% (10,5 – 49%), в отличие от группы пациентов с ПТ-ЦФ, в этой группе доля клеток, принадлежавших реципиенту, составляла 0% (0 – 2%). Стоит отметить, что достоверные различия мы получили за счет применения ПТ-ЦФ: другие виды ИСТ в сравнении с ПТ-ЦФ ($p = 0,023$), ПТ-ЦФ в сравнении с АТГ ($p = 0,015$).

Похожие результаты мы наблюдали при оценке химеризма в Т-кон. При применении в составе иммуносупрессивной терапии АТГ доля клеток с хозяйским генотипом среди Т-кон составляла 12% (4,65 – 29%), при применении ПТ-ЦФ – 0% (0 – 2%), других видов ИСТ 18% (8 – 29%). Статистически значимые различия мы обнаружили также при применении ПТ-ЦФ: другие виды ИСТ в сравнении с ПТ-ЦФ ($p = 0,029$), терапия АТГ в сравнении с ПТ-ЦФ ($p = 0,0055$) (Рисунок 11).

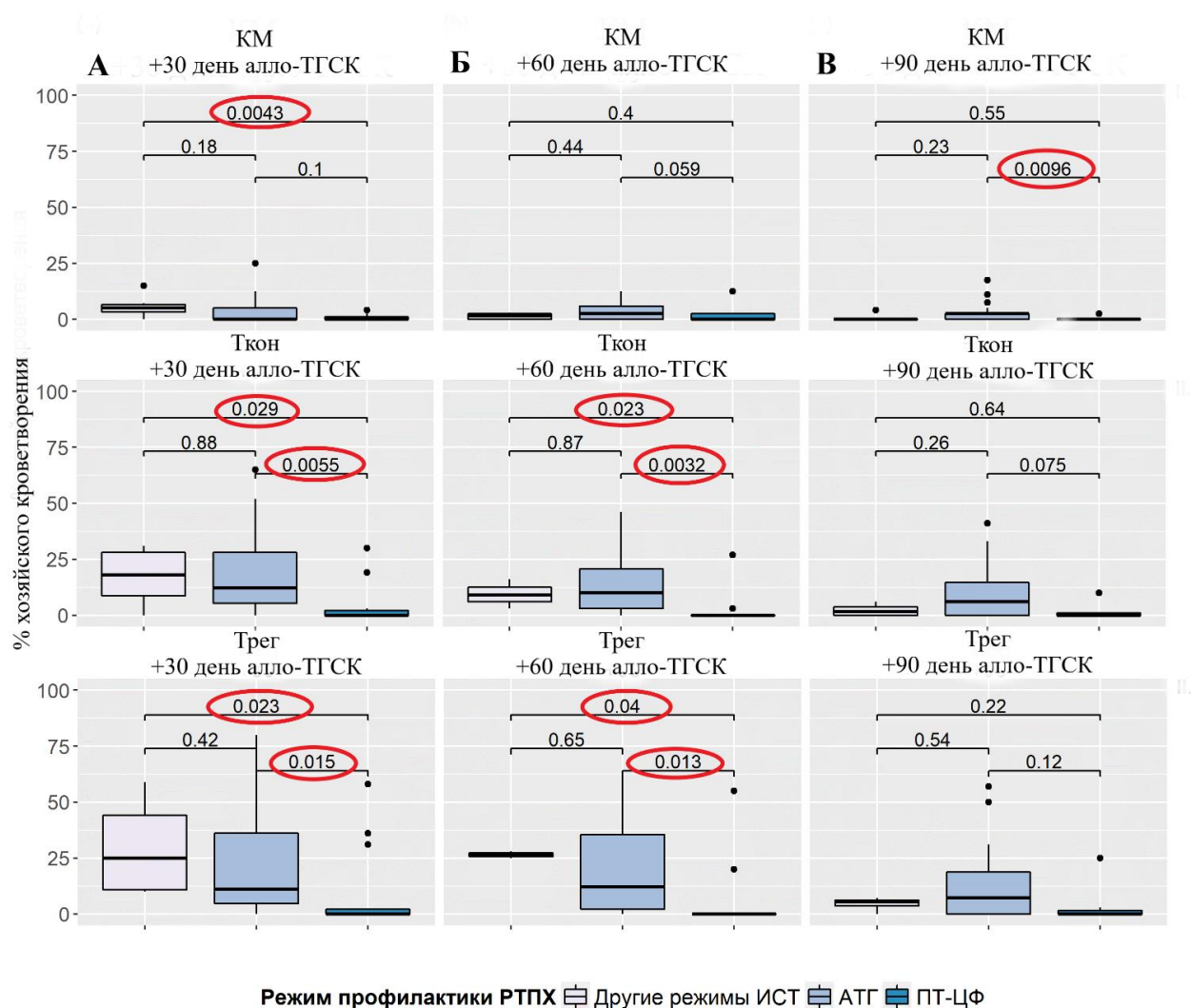


Рисунок 11 – Химеризм в пунктате костного мозга и среди Т-кон, Т-рег периферической крови в зависимости от режима иммуносупрессивной терапии. А – химеризм на сроке +30 день алло-ТГСК. Б – химеризм на сроке +60 день алло-ТГСК. В – химеризм на сроке +90 день алло-ТГСК.

При оценке химеризма в костном мозге на сроке +60 день алло-ТГСК мы не получили значимых различий у пациентов с различными видами иммуносупрессивной терапии

При исследовании влияния режима иммуносупрессивной терапии на химеризм среди Т-рег на сроке +60 день алло-ТГСК доля клеток с хозяйским генотипом в группе пациентов с АТГ составляла 2,5% (0 – 7%), в группе пациентов

с ПТ-ЦФ – 0% (0 – 2,5%), в группе с другими режимами ИСТ – 1,5% (0 – 2,5%). Получены достоверные статистические различия при сравнении режима АТГ с ПТ-ЦФ ($p = 0,013$), а также при сравнении других режимом ИСТ с ПТ-ЦФ ($p = 0,04$).

При оценке химеризма в Т-кон на этом же сроке в группе пациентов с АТГ доля клеток с хозяйским генотипом составляла 10% (3 – 21,5%), у пациентов с ПТ-ЦФ – 0% (0 – 0%), у пациентов с другими режимами ИСТ – 9% (3 – 16%). Стоит отметить, что достоверные различия мы получили при применении ПТ-ЦФ: другие виды ИСТ в сравнении с ПТ-ЦФ ($p = 0,023$), ПТ-ЦФ в сравнении с АТГ ($p = 0,0032$).

На сроке +90 день после алло-ТГСК в костном мозге получена значимая разница химеризма у пациентов в группе АТГ в сравнении с ПТ-ЦФ ($p = 0,0096$). В остальных группах достоверную разницу мы не обнаружили. В группе с АТГ 2,5% (0 – 2,5%), группе ПТ-ЦФ и других видах ИСТ клетки с хозяйским генотипом не были выявлены.

При исследовании динамики показателей химеризма среди Т-рег достоверной разницы влияния режима иммуносупрессивной терапии не обнаружено. Доля клеток с хозяйским генотипом у пациентов после режима иммуносупрессивной терапии с АТГ составляла 7,3% (0 – 20%) в группе ПТ-ЦФ – 0% (0 – 3%), у пациентов, которым применялись другие виды ИСТ – 5,5% (2,5 – 6,5%).

При оценке химеризма в Т-конвенциональных клетках на этом же сроке, мы наблюдали уменьшение доли клеток с хозяйским генотипом по сравнению с более ранними сроками алло-ТГСК. У пациентов с АТГ доля клеток с хозяйским генотипом составляла 6% (0 – 17%), в группе ПТ-ЦФ – 0% (0 – 1%), у пациентов которым применялись другие виды ИСТ – 1,5% (0 – 4,5%). Достоверных различий влияния режимов иммуносупрессивной терапии на химеризм мы не наблюдали ($p = 0,26$; $p = 0,64$; $p = 0,0759$).

Высказанные ранее предположения о влиянии режима иммуносупрессивной терапии были подтверждены полученными результатами. Было показано, что применение лАТГ создает предпосылки к развитию нестабильности химеризма в исследованных субпопуляциях Т-клеток периферической крови (Т-регуляторных

клетках и Т-конвенциональных клетках), в то время как применение ПТ-ЦФ не сопровождалось такими изменениями. Сравнение с другими режимами ИСТ сложно трактовать, так как данная группа крайне немногочисленна и представлена крайне гетерогенной группой режимов профилактики РТПХ. В дальнейшем полученные данные были использованы для оценки развития оРТПХ в различные сроки.

3.9 Характеристика химеризма в костном мозге, CD4⁺CD25⁺ клетках, CD4⁺CD25⁻ клетках в зависимости от развития рецидива после трансплантации

На +30 день доля клеток с хозяйским генотипом в костном мозге у пациентов, у которых развился в будущем рецидив заболевания составляла 0% (0 – 5%), без рецидива заболевания – 0% (0 – 2,5%), различие статистически не значимо ($p = 0,7$) (Рисунок 12).

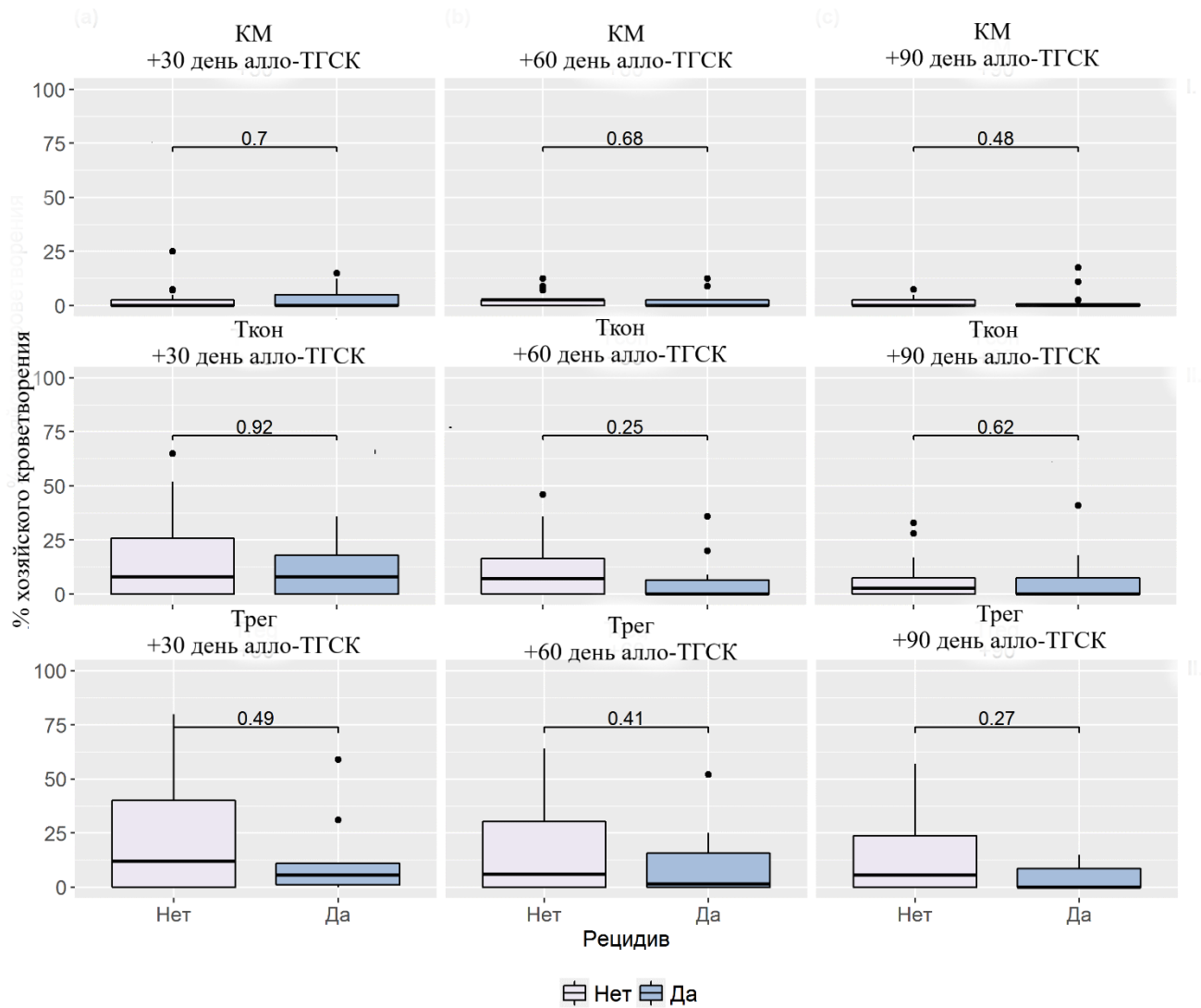


Рисунок 12 – Химеризм в пунктате костного мозга и среди Т-кон, Т-рег периферической крови в зависимости от развития рецидива заболевания. А – химеризм на сроке +30 день алло-ТГСК. Б – химеризм на сроке +60 день алло-ТГСК. В – химеризм на сроке +90 день алло-ТГСК.

В этот же срок мы наблюдали увеличение доли клеток с хозяйским генотипом среди Т-рег: у пациентов, у которых развился рецидив заболевания 5,5% (1 – 11%), без рецидива заболевания – 12% (0 – 41%), однако, мы не получили достоверной разницы при сравнении химеризма в этой точке исследования ($p = 0,49$).

При оценке химеризма среди Т-кон на сроке +30 день алло-ТГСК у пациентов с рецидивом заболевания доля клеток с хозяйским генотипом составляла 8% (0 –

18%), в группе пациентов без рецидива заболевания 8% (0 – 27%), т.о, достоверных различий не получено ($p = 0,92$).

Так при исследовании химеризма в костном мозге, на +60 день после алло-ТГСК не было получено статистически значимой разницы химеризма в зависимости от развития рецидива заболевания ($p = 0,68$). Процент клеток с хозяйским генотипом у пациентов с развившимся в будущем рецидивом заболевания составил 0% (0 – 2,75%), без рецидива заболевания – 2,5% (0 – 2,5%).

При оценке химеризма среди Т-рег на сроке +60 день алло-ТГСК доля клеток с хозяйским генотипом у пациентов с рецидивом заболевания составляла 1,5% (0 – 17%), без рецидива заболевания – 6% (0 – 31%), полученные результаты статистически незначимы ($p = 0,41$).

При анализе химеризма среди Т-кон на +60 день алло-ТГСК у пациентов с рецидивом заболевания доля клеток с хозяйским кроветворением составляла 0% (0–9%), без рецидива заболевания – 7% (0 – 17%), значение $p=0,25$.

На сроке +90 день после алло-ТГСК в костном мозге не получена значимая разница химеризма у пациентов в зависимости от развития рецидива заболевания ($p= 0,48$), доля клеток с хозяйским генотипом у пациентов с рецидивом заболевания – 0% (0 – 1,25%), без рецидива заболевания – 0% (0 – 2,5%).

При исследовании химеризма среди Т-рег достоверной разницы влияния развития рецидива заболевания на химеризм не отмечено ($p=0,27$). Доля клеток с хозяйским генотипом у пациентов с развившимся рецидивом заболевания - составляла 0% (0 – 11%), без рецидива заболевания – 5,5% (0–25%).

Исследуя химеризм среди Т-кон на этом же сроке, у пациентов с рецидивом заболевания доля клеток с хозяйским генотипом составляла 0% (0 – 11%), без рецидива заболевания – 2,8 % (0 – 8,25%), что не имеет статистических различий ($p=0,62$).

Полученные результаты не показали влияния химеризма в клетках костного мозга и субпопуляциях Т-хелперов на развитие рецидива, что представляется логичным, учитывая тот факт, что исследование проводилось в популяции, которая напрямую не реализует Т-клеточный ответ против опухоли.

3.10 Характеристика химеризма в костном мозге, CD4⁺CD25⁺ клетках, CD4⁺CD25⁻ клетках в зависимости от развития острой реакции «трансплантат против хозяина»

На +30 день доля клеток с хозяйским генотипом в костном мозге у пациентов с клиникой оРТПХ в течение первых 90 дней после алло-ТГСК составляла 0% (0 – 2,5%), у пациентов без оРТПХ – 2,25% (0 – 5,0%), статистически значимая разница между группами отсутствует ($p = 0,1$). Доля клеток с хозяйским генотипом среди Т-рег на сроке +30 день алло-ТГСК у пациентов с клиникой оРТПХ составляла 3,5% (0 – 21%), без клиники острой РТПХ – 11% (0 – 41%), что также показало отсутствие статистически значимого различия ($p = 0,19$). При оценке химеризма среди Т-кон у пациентов с оРТПХ доля клеток с хозяйским генотипом – 6% (0 – 11%), у пациентов без клиники оРТПХ – 10% (0 – 29%), разница не имеет статистической значимости ($p = 0,3$) (Рисунок 13).

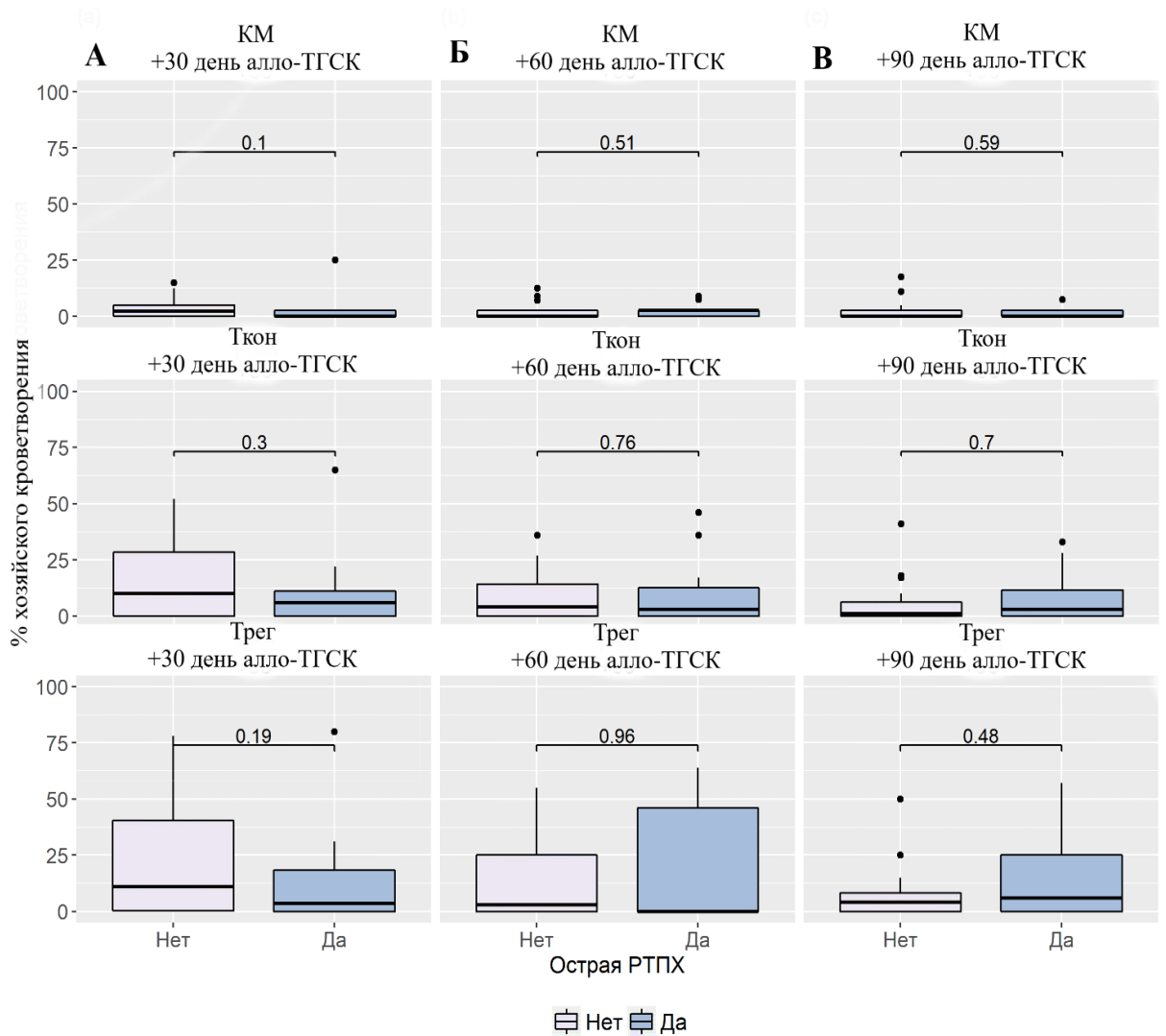


Рисунок 13 – Химеризм в пунктате костного мозга и среди Т-кон, Т-рег периферической крови в зависимости от развития оРТПХ. А – химеризм на сроке +30 день алло-ТГСК. Б – химеризм на сроке +60 день алло-ТГСК. В – химеризм на сроке +90 день алло-ТГСК.

При исследовании химеризма на +60 день после алло-ТГСК в костном мозге не было получено статистически значимой разницы у пациентов с развившейся оРТПХ и без неё ($p = 0,51$). Доля клеток с хозыяйским генотипом у больных с оРТПХ составлял 2,5% (0 – 2,5%), у больных без клиники оРТПХ – 0% (0 – 2,5%). Доля клеток, принадлежавших реципиенту, среди Т-рег у пациентов с клиникой острой

РТПХ составляла 0% (0 – 52%), у пациентов без оРТПХ – 3% (0 – 25%), что оказалось статистически не достоверным результатом ($p = 0,96$). Также не получено статистически значимых различий химеризма среди Т-кон в зависимости от развития оРТПХ ($p = 0,76$): процент клеток с хозяйским генотипом у больных с оРТПХ – 3% (0 – 12%), без клиники оРТПХ – 1% (0 – 6,25%).

На сроке +90 день после алло-ТГСК в костном мозге не получена статистически значимая разница химеризма у пациентов с оРТПХ ($p = 0,59$), одинаковая доля клеток с хозяйским генотипом в обеих группах – 0% (0 – 2,50%), чего нельзя сказать при исследовании химеризма среди субпопуляций Т-лимфоцитов. При оценке химеризма в Т-рег на этом сроке у больных с оРТПХ доля клеток с хозяйским генотипом составляла 6% (0 – 30%), без клиники оРТПХ – 4% (0 – 8,6%), однако достоверных различий получено не было ($p = 0,48$). При анализе Т-кон на сроке +90 день алло-ТГСК доля клеток с хозяйским генотипом у пациентов с оРТПХ составляла 3% (0 – 12%), без клиники оРТПХ – 1% (0 – 6,25%), $p = 0,7$.

Полученные результаты не показали влияния химеризма в клетках костного мозга и субпопуляциях Т-хелперов на развитие оРТПХ в первые 3 месяца после алло-ТГСК, что вероятно связано с применением иммуносупрессивной терапии на этих сроках после алло-ТГСК.

3.11 Влияние смешанного химеризма в костном мозге, $CD4^+CD25^+$ клетках $CD4^+CD25^-$ клетках на развитие острой реакции «трансплантат против хозяина», ассоциированной с отменой иммуносупрессивной терапии

Нами было отмечено, что в группе пациентов со смешанным химеризмом среди популяции Т-рег преобладает поздняя оРТПХ (после +90 дня), ассоциированная с началом отмены иммуносупрессии, которая обычно начинается в эти сроки (по сути, индуцированная отменой иммуносупрессии оРТПХ). Мы провели анализ химеризма в зависимости от этого фактора (Рисунок 14).

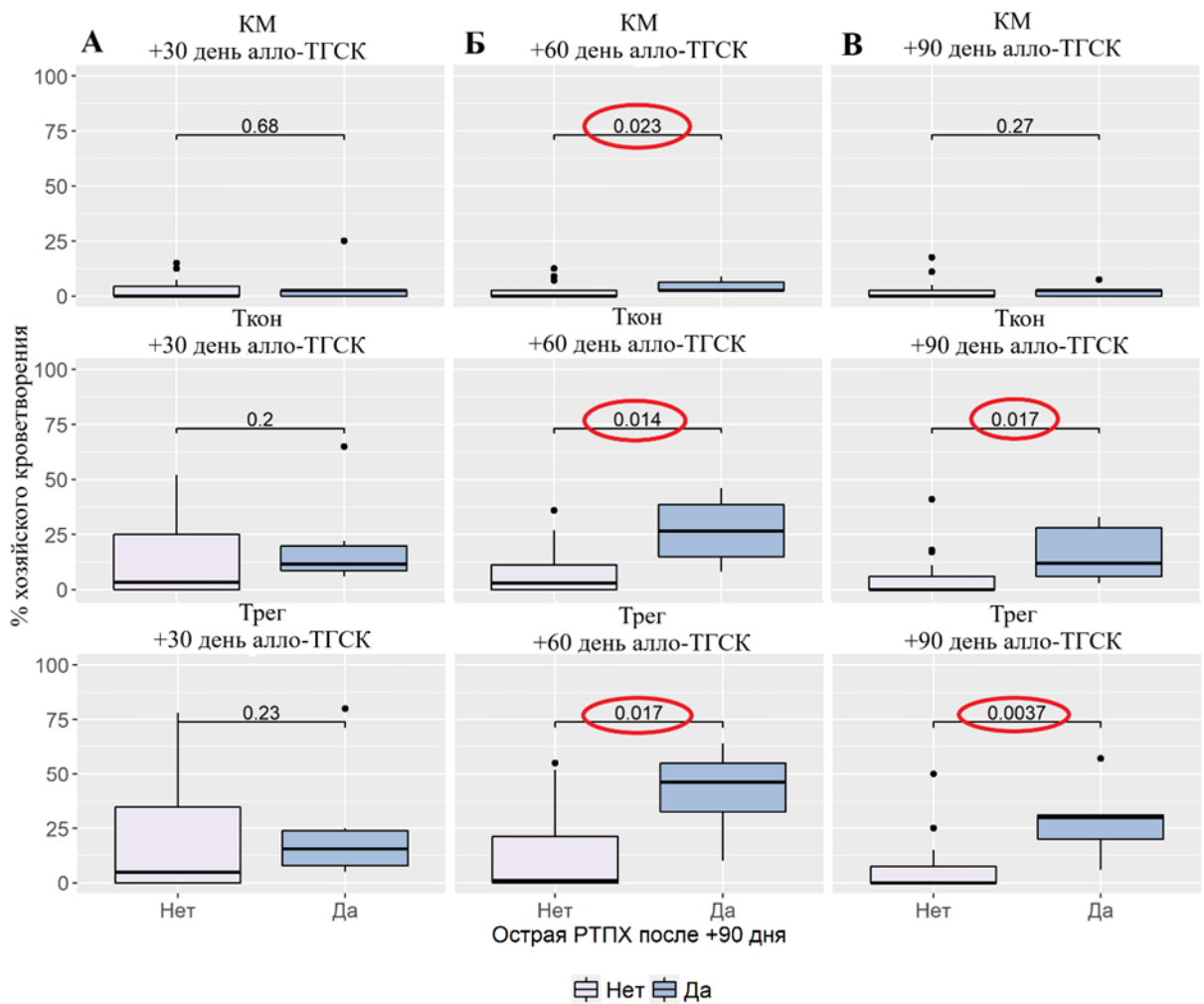


Рисунок 14 – Химеризм в пункте костного мозга и среди Т-кон, Т-рег периферической крови в зависимости от развития оРТПХ, ассоциированной с отменой ИСТ. А – химеризм на сроке +30 день алло-ТГСК. Б – химеризм на сроке +60 день алло-ТГСК. В – химеризм на сроке +90 день алло-ТГСК.

На +30 день доля клеток с хозяйским генотипом в костном мозге у пациентов, у которых не развилась клиника оРТПХ после +90 дня составляла 0% (0 – 5,0%), у пациентов с индуцированной оРТПХ доля клеток с хозяйским генотипом – 2,5% (0 – 2,5%), что не является статистически достоверным различием ($p = 0,68$).

При оценке химеризма в Т-рег мы наблюдали высокую долю клеток, принадлежавших реципиенту, в обеих группах. У пациентов без оРТПХ процент

клеток с хозяйским генотипом составил 4,75% (0 – 36%), в группе пациентов с индуцированной оРТПХ – 15,5% (7 – 25%), что не является статистически достоверным различием ($p = 0,23$).

Исследуя химеризм в Т-кон, достоверных различий между группами также не выявлено ($p = 0,2$). У пациентов, не развивших оРТПХ, примесь ДНК реципиента составила 3,5% (0 – 25%), в группе больных с индуцированной оРТПХ доля клеток с хозяйским генотипом составляла 11,5% (8 – 22%).

При исследовании химеризма в пунктате костного мозга на +60 день алло-ТГСК примесь клеток с хозяйским генотипом у пациентов без оРТПХ была 0% (0 – 2,5%), а в группе с индуцированной оРТПХ медиана смешанного кроветворения составляла 2,5% (2,5 – 7,5%), что является достоверным различием при сравнении этих групп больных ($p = 0,023$).

Значимые результаты были получены при сравнении влияния смешанного химеризма среди Т-рег на +60 день алло-ТГСК на развитие индуцированной оРТПХ. Доля клеток с хозяйским генотипом в группе пациентов без оРТПХ составляла 1% (0 – 22,5%), у пациентов с индуцированной оРТПХ – 46% (25 – 58%), $p = 0,017$.

В этот же срок среди Т-кон медиана хозяйского кроветворения у пациентов без оРТПХ составляла 3% (0 – 12%), в группе больных с индуцированной оРТПХ – 26,5% (12,5 – 41%). Были получены достоверные различия при сравнении влияния смешанного химеризма на развитие оРТПХ ($p = 0,014$).

Химеризм в костном мозге на +90 день алло-ТГСК у больных без клиники оРТПХ составил 0% (0 – 2,5%), с индуцированной оРТПХ – 2,5% (0 – 3%), что оказалось статистически не значимо ($p=0,27$).

Статистически значимые различия получены нами при исследовании пула Т-лимфоцитов (Т-регуляторные клетки, Т-конвенциональные клетки). При исследовании химеризма в Т-рег на сроке +90 день алло-ТГСК доля клеток хозяйского генотипа у пациентов без острой РТПХ составляет 0% (0 – 7,8%), группе больных с индуцированной оРТПХ – 30% (20 – 31%), $p = 0,0037$. Процент клеток

хозяйского генотипа среди Т-кон у пациентов без клиники оРТПХ составил 0% (0 – 6%), с индуцированной оРТПХ – 12% (6 – 28%), $p = 0,017$.

Химеризм в костном мозге не влияет на возникновение РТПХ, как показали результаты нашей исследовательской работы, однако при детальном рассмотрении популяций Т-лимфоцитов мы наблюдали смешанный химеризм в Т-рег, что, по сути, указывает на функциональную неспособность к иммуносупрессии $CD4^+CD25^+$ клеток хозяина, на фоне этого даже плановая отмена ИСТ (в группе со смешанным химеризмом в Т-рег клетках в отличие от группы с полным химеризмом в Т-рег) приводит к развитию оРТПХ.

Учитывая полученные данные, а также известную связь Т-рег с развитием РТПХ, в данной работе мы также рассмотрели оРТПХ в связи со временем ее развития.

При исследовании химеризма в костном мозге на сроке +90 день алло-ТГСК группе пациентов без оРТПХ, с клиникой оРТПХ, развившейся до +90 дня после алло-ТГСК, а также с оРТПХ на фоне отмены ИСТ достоверных различий мы не наблюдали ($p = 0,75$, $p = 0,36$, $p = 0,56$). Процент клеток с хозяйским генотипом у пациентов без оРТПХ – 2,25% (0 – 5%), с индуцированной оРТПХ после +3 месяцев алло-ТГСК – 2,5% (0 – 2,5%), с клиникой оРТПХ до +90 дней алло-ТГСК – 0% (0 – 0%) (Рисунок 15 А, Б).

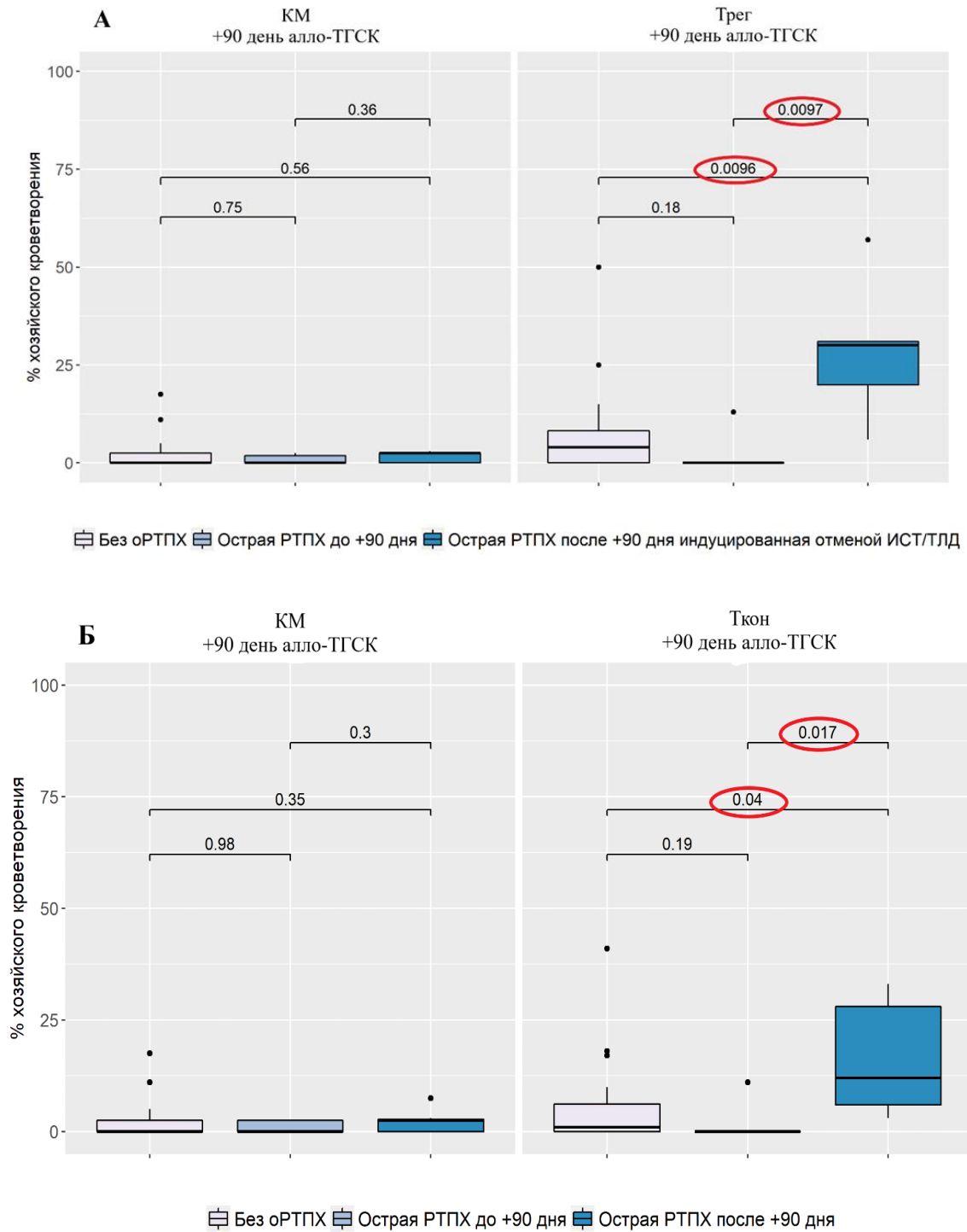


Рисунок 15 – Химеризм в пунктате костного мозга и среди Т-кон, Т-рег периферической крови в зависимости от развития индуцированной оРТПХ, ассоциированной с отменой иммуносупрессивной терапии/трансфузии лимфоцитов донора. А – химеризм на сроке +90 день алло-ТГСК в костном мозге, Т-рег. Б – химеризм на сроке +90 день алло-ТГСК в костном мозге, Т-кон.

В этот же срок при исследовании химеризма в Т-рег мы получили значимые различия в результатах за счет химеризма на +90 день у пациентов с индуцированной оРТПХ после +90 дней. Достоверные различия в группе пациентов без оРТПХ в сравнении с пациентами, у которых клиника оРТПХ развилась в результате отмены ИСТ ($p = 0,0096$), а также при сравнении пациентов с клиникой острой РТПХ до +90 дней алло-ТГСК в сравнении с индуцированной оРТПХ ($p = 0,0097$). Химеризм на +90 день в популяции Т-рег составил для этих групп: 4% (0 – 8,6%), 30% (20 – 31%), 0% (0 – 0%) для группы без оРТПХ, с острой РТПХ после +90 дней и острой РТПХ до +90 дней соответственно.

Похожие результаты были получены нами в случае детекции кроветворения реципиента в Т-кон. Достоверные различия получены в группе пациентов без оРТПХ в сравнении с пациентами, у которых клиника оРТПХ развилась в результате отмены ИСТ ($p = 0,04$), а также при сравнении пациентов с клиникой оРТПХ до +90 дней алло-ТГСК в сравнении с индуцированной оРТПХ ($p = 0,017$). Химеризм на +90 день среди Т-кон составил для этих групп: 1% (0 – 6,25%), 12% (6 – 28%) и 0% (0 – 0%) для группы без оРТПХ, с оРТПХ после +90 дней и оРТПХ до +90 дней соответственно.

Учитывая выраженную связь наличия смешанного кроветворения в популяции Т-рег на +90 день после алло-ТГСК и развития РТПХ на фоне отмены ИСТ, мы попытались оценить возможность применения данного параметра как маркера-предиктора развития оРТПХ на фоне отмены ИСТ. С помощью ROC-анализа, мы определили пороговое значение химеризма в Т-рег на +90 день после алло-ТГСК – 17,5% (AUC = 0,904, чувствительность 91,7%, специфичность 80%).

Мы разделили пациентов по этому признаку и провели оценку вероятности развития ОРТПХ с учетом конкурирующих рисков (Рисунок 16).

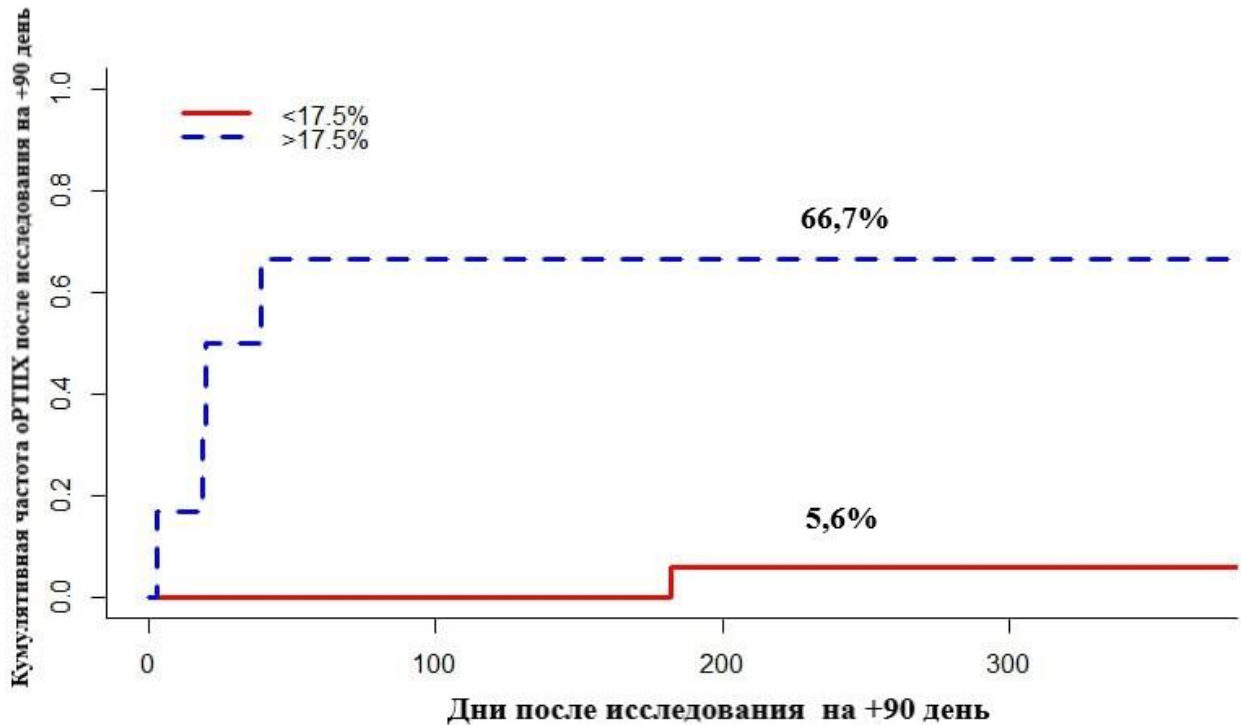


Рисунок 16 – Вероятность развития ОРТПХ II – IV степени в зависимости от химеризма в популяции CD4⁺CD25⁺ клеток периферической крови.

У пациентов, у которых процент клеток на +90 день среди Т-рег был более 17,5% вероятность развития ОРТПХ с учетом конкурирующих рисков составила 66,7%. В том случае, если доля клеток с хозяйским генотипом было меньше определенного значения, вероятность ОРТПХ была значительно меньше и составила 5,6% (Тест Грея, $p = 0,001$). Такая же зависимость сохраняется и для +60 дня, однако максимальную прогностическую значимость удалось получить именно для +90 дня.

Полученные результаты, по всей видимости, объясняются тем, что Т-рег с хозяйским генотипом не способны осуществлять полноценно свою функцию по

регуляции иммунного ответа, что, по сути, приводит к тому, что пул Т-рег остается «редуцированным», а начинающаяся после +90 дней отмена иммуносупрессивной терапии на фоне снижения числа адекватно функционирующих Т-рег ведет к развитию ОРТПХ.

3.12 Динамика химеризма в отдельных популяциях в зависимости от вида профилактики и сроков развития острой реакции «трансплантат против хозяина»

Учитывая данные, изложенные ранее, нами был проведен анализ динамических изменений в химеризме различных популяций в зависимости от режима профилактики ОРТПХ и сроков развития данного осложнения. Была произведена оценка динамики изменений химеризма в отдельных популяциях Т-клеток и в клетках костного мозга. Нами было показано, что различия между повторными измерениями для группы ПТ-ЦФ, АТГ и других режимов ИСТ являются для всех режимов и популяций не значимыми ($p > 0,05$) (Рисунок 17)

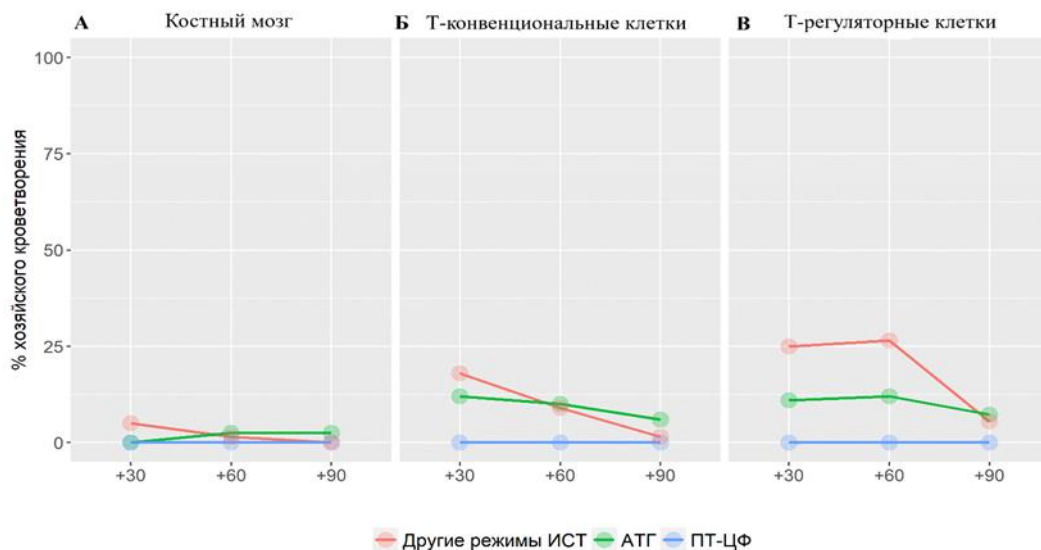


Рисунок 17 – Динамика изменения химеризма в зависимости от режимов профилактики РТПХ. А – химеризм в костном мозге. Б – химеризм в Т-

конвенциональных клетках периферической крови. В – химеризм в Т-регуляторных клетках периферической крови.

Было показано, что различия между повторными измерениями для группы без оРТПХ, оРТПХ до +90 дней и группы оРТПХ после +90 дней являются не значимыми ($p > 0,05$) (Рисунок 18).

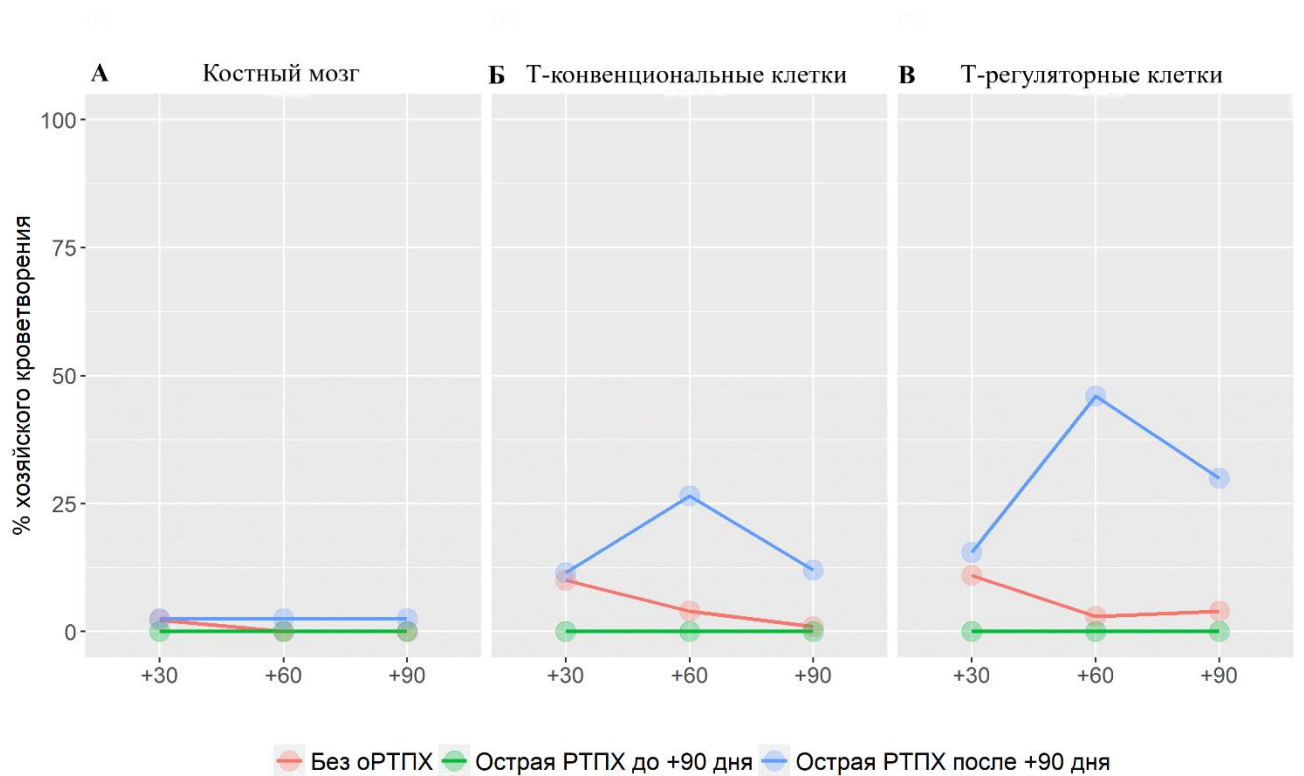


Рисунок 18 – Динамика изменения химеризма в популяциях клеток костного мозга и отдельных популяций Т-клеток хелперов в зависимости от времени возникновения РТПХ. А – химеризм в костном мозге. Б – химеризм в Т-конвенциональных клетках периферической крови. В – химеризм в Т-регуляторных клетках периферической крови.

3.13 Оценка влияния клинического использования лошадиного антитимоцитарного глобулина на вероятность развития острой реакции «трансплантат против хозяина» в сравнении с методами профилактики, основанными на посттрансплантационном циклофосфамиде

С целью проверки гипотезы о том, что провоцируемый использованием лАТГ смешанный химеризм в популяции Т-рег приводит на поздних сроках к развитию оРТПХ, мы провели ретроспективную оценку вероятности развития оРТПХ с учетом конкурирующих рисков в группе пациентов с острыми лейкозами, которым первая аллогенная трансплантация была выполнена в период с 2014 по 2020 гг. Всего было включено 260 пациентов. Детально клинические характеристики приведены в таблице 8.

Таблица 8 – Клиническая характеристика пациентов, включенных в последующий анализ

Параметр	лАТГ, n = 128	ПТ-ЦФ +/- лАТГ, n = 132	p-значение
Пол			0,3
жен	71 (55%)	64 (48%)	
муж	57 (45%)	68 (52%)	
Возраст	36 (30, 47)	37 (31, 45)	0,7
Диагноз			0,10
ОЛЛ	39 (30%)	53 (40%)	
ОМЛ	89 (70%)	79 (60%)	
Вид кондиционирования			0,014
MAC	24 (19%)	11 (8%)	
RIC	104 (81%)	121 (92%)	
Трансплантат			< 0,001

Продолжение таблицы 8

Параметр	ЛАТГ, n = 128	ПТ-ЦФ +/- ЛАТГ, n = 132	p-значение
КМ	80 (62%)	29 (22%)	
СКК	48 (38%)	103 (78%)	
Вид ТКМ			< 0,001
аллогенная неродственная несовместимая	2 (2%)	57 (43%)	
аллогенная неродственная совместимая	72 (56%)	21 (16%)	
аллогенная родственная несовместимая (гаплоидентичная)	0 (0%)	42 (32%)	
аллогенная родственная совместимая	54 (42%)	12 (9%)	
ОРТПХ			0,006
Да	48 (38%)	29 (22%)	
Нет	80 (62%)	103 (78%)	
Рецидив			0,005
Да	39 (30%)	21 (16%)	
Нет	89 (70%)	111 (84%)	
Смерть			0,048
Да	59 (46%)	45 (34%)	
Нет	69 (54%)	87 (66%)	

На рисунке 19 дана оценка развития оРТПХ всех степеней. Показано, что вероятность развития оРТПХ с учетом конкурирующих рисков в группе с лАТГ составила 37,1%, в группе ПТ-ЦФ – 25,8% ($p = 0,15$).

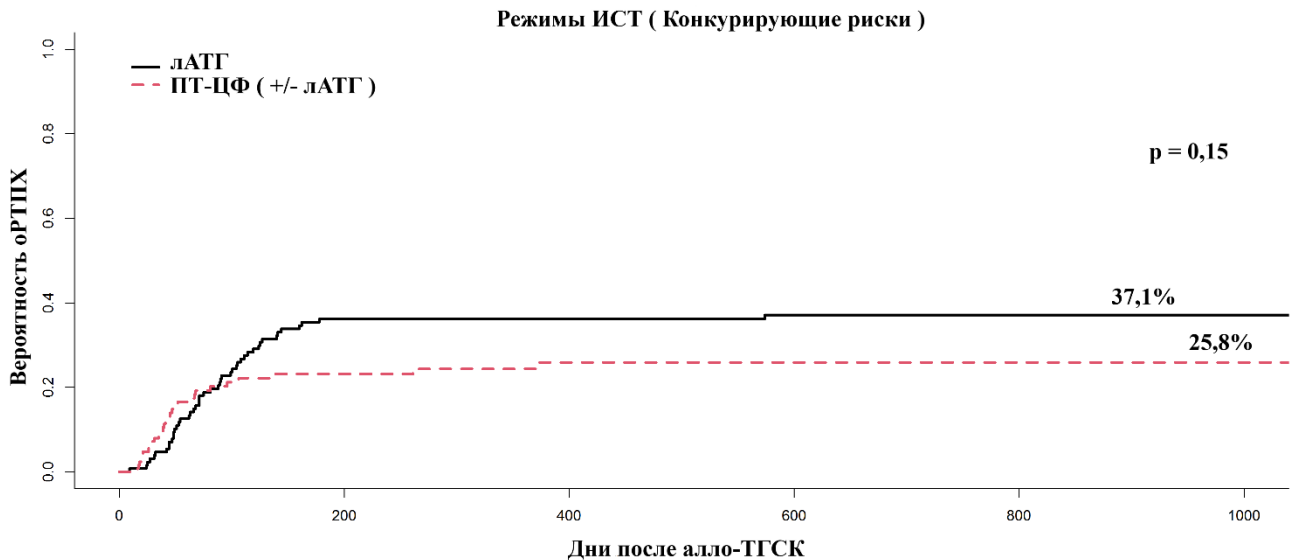


Рисунок 19 – Вероятность развития оРТПХ у пациентов в зависимости от режима профилактики РТПХ.

Далее нами была проанализирована вероятность развития клинически значимых степеней оРТПХ II – IV степени. На рисунке 20 показана вероятность развития оРТПХ II – IV степени с учетом конкурирующих рисков в группе с лАТГ составила 30,8%, в группе ПТ-ЦФ – 10,6% ($p = 0,0003$).

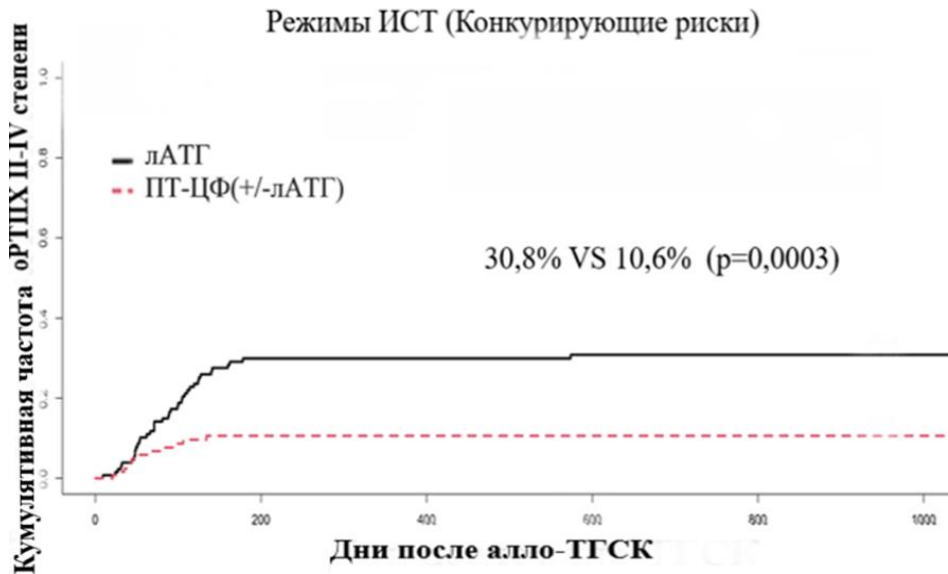


Рисунок 20 – Вероятность развития оРТПХ II – IV степени у пациентов в зависимости режима профилактики РТПХ

Для сверхтяжелых форм вероятность развития оРТПХ III-IV степени с учетом конкурирующих рисков в группе с ЛАТГ составила 21,3% в группе – ПТ-ЦФ 5,3% (p = 0,0006). На рисунке 21 отражена вероятность развития оРТПХ III-IV степени у пациентов, в зависимости от режима профилактики РТПХ.

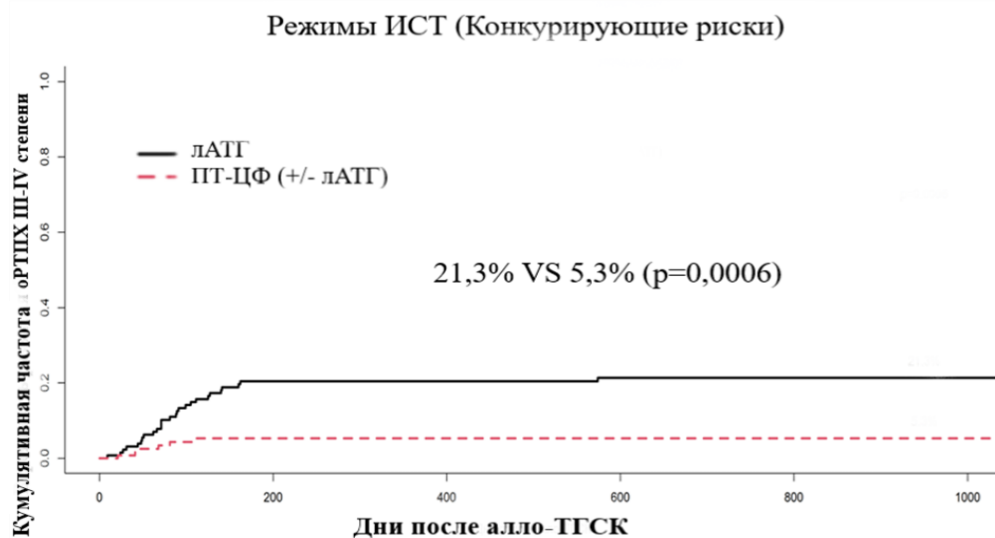


Рисунок 21 – Вероятность развития острой РТПХ III – IV степени у пациентов в зависимости от режима профилактики РТПХ.

При применении в режимах кондиционирования ПТ-ЦФ в сочетании с лАТГ вероятность развития ОРТПХ значительно ниже, чем при использовании лАТГ. Приняв во внимание полученные данные, мы проанализировали вероятность развития ОРТПХ у пациентов, которым в качестве иммуносупрессивной профилактики вводился ПТ-ЦФ без лАТГ, с группой пациентов, получавшей лАТГ. В анализ включено 190 пациентов, детальная характеристика представлена в таблице 9.

Таблица 9 – Клиническая характеристика пациентов, включенных в исследование

Параметр	лАТГ, n = 128	ПТ-ЦФ, n = 62	р-значение
Пол			0,4
жен	71 (55%)	30 (48%)	
муж	57 (45%)	32 (52%)	
Возраст	36 (30 – 47)	38 (32 – 46)	0,3
Диагноз			0,11
ОЛЛ	39 (30%)	26 (42%)	
ОМЛ	89 (70%)	36 (58%)	
Трансплантат			<0,001
КМ	80 (62%)	1 (2%)	
КМ + СКК	1 (1%)	0 (0%)	
СКК	47 (37%)	61 (98%)	
Вид ТКМ			<0,001
аллогенная неродственная несовместимая	2 (2%)	9 (15%)	
аллогенная неродственная совместимая	72 (56%)	14 (23%)	

продолжение таблицы 9

Параметр	ЛАТГ, n = 128	ПТ-ЦФ, n = 62	р-значение
аллогенная родственная несовместимая (гаплоидентичная)	0 (0%)	27 (44%)	
аллогенная родственная совместимая	54 (42%)	12 (18%)	

Произведен анализ вероятности развития клинически значимых степеней оРТПХ II – IV степени. На рисунке 22 показана вероятность развития оРТПХ II – IV степени с учетом конкурирующих рисков. В группе пациентов с ЛАТГ вероятность развития оРТПХ составила 28,3%, в группе ПТ-ЦФ – 13,1% ($p=0,06$).

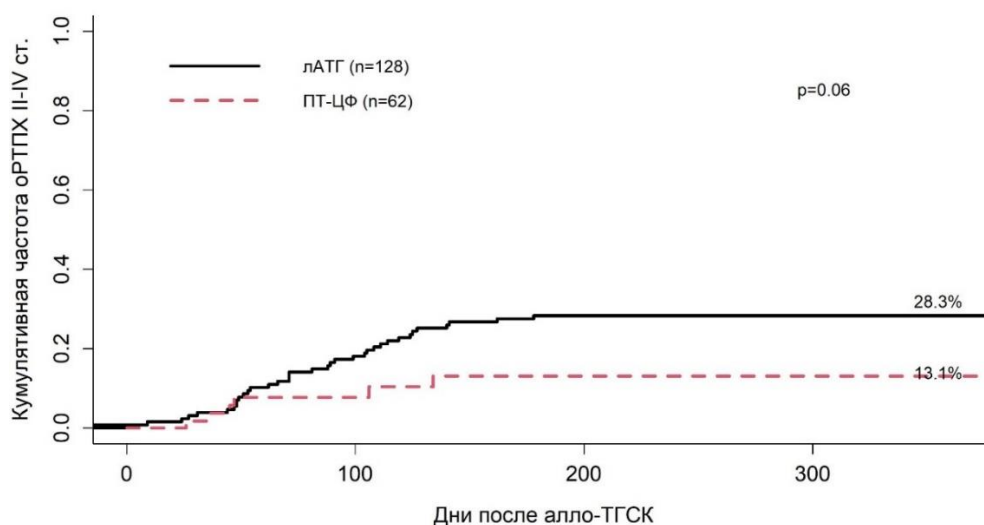


Рисунок 22 – Вероятность развития оРТПХ III – IV степени в зависимости от режима профилактики РТПХ.

Для сверхтяжелых форм вероятность развития оРТПХ III–IV степени с учетом конкурирующих рисков в группе с ЛАТГ составила 20,4% в группе – ПТ-ЦФ 4,6% ($p = 0,01$). На рисунке 23 отражена вероятность развития оРТПХ III-IV степени в зависимости от режима профилактики РТПХ.

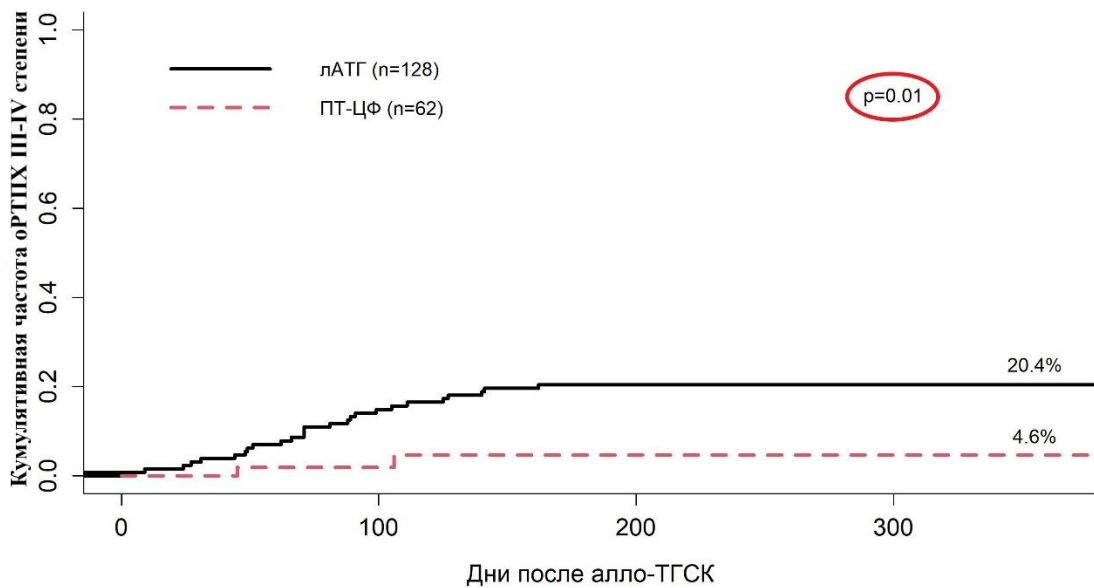


Рисунок 23 – Вероятность развития оРТПХ III – IV степени в зависимости от режима профилактики РТПХ.

В нашей работе было показано, что при применении ПТ-ЦФ частота развития оРТПХ особенно III–IV степени значительно меньше, чем при применении лАТГ. Данные явления наблюдаются несмотря на то, что пациентам в группе лАТГ алло-ТГСК была выполнена преимущественно от полностью совместимых доноров, что в теории должно было оказывать влияние на снижение вероятности развития оРТПХ, однако мы наблюдаем, что применение лАТГ существенно нивелирует этот эффект.

Полученные данные подтвердили механизм развития оРТПХ в группе с АТГ, однако, для дополнительной проверки того, что при использовании лАТГ сроки наступления оРТПХ сдвинуты на более позднее время, мы провели анализ сроков возникновения оРТПХ. На рисунке 24 видно, что медиана развития оРТПХ для группы с АТГ составляет 84,5 дня (49 – 114), для группы с ПТ-ЦФ – 46 дней (37 – 88,5) при этом различия были статистически значимыми ($p = 0,0011$).

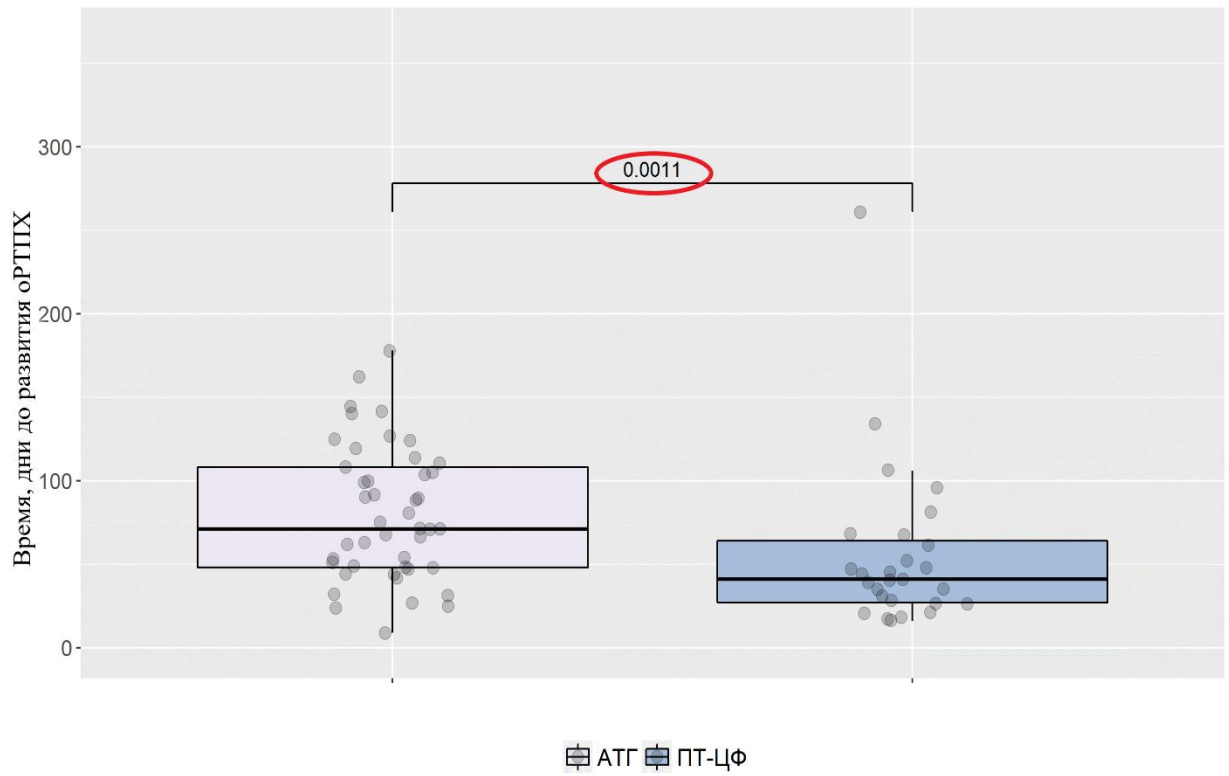


Рисунок 24 – Время развития ОРПХ у пациентов с иммуносупрессивной терапией лАТГ и ПТ-ЦФ.

Глава 4. Обсуждение

T-клетки являются одними из главных игроков, которые принимают участие в регуляции иммунного ответа, и, соответственно, в развитии иммунологических осложнений. В нашей работе мы исследовали взаимосвязь химеризма в T-конвенциональных $CD4^+CD25^-$ и T-регуляторных клетках $CD4^+CD25^+$ у больных с острыми лейкозами после алло-ТГСК и развитием иммунологических осложнений.

Как известно, пациенты, которым трансплантация была выполнена в ПР1 имеют лучшие показатели общей выживаемости и безрецидивной выживаемости, в отличие от пациентов, которым трансплантация была выполнена в ПР2 или вне ремиссии заболевания [50; 119; 157].

Очень часто возможность выполнения трансплантации в ПР1 обусловлена, прежде всего, быстрой доступностью родственного HLA-идентичного донора, именно поэтому в нашем исследовании преобладали пациенты после данного вида трансплантации, у которых профилактика РТПХ базировалась на использовании лАТГ ($n = 21$). Пациентам во второй ремиссии, чаще выполнялась трансплантация от неродственных доноров. В качестве профилактики РТПХ был использован ПТ-ЦФ ($n = 14$).

Сравнивая химеризм у пациентов в первой и второй ремиссии заболевания, мы получили статистически значимые различия на сроке +30, +60 дни алло-ТГСК. На +30 день алло-ТГСК были получены значимые отличия при сравнении химеризма у пациентов в первой и второй ремиссии, в костном мозге, среди T-конвенциональных клеток, среди T-регуляторных клеток. На +60 день алло-ТГСК среди T-конвенциональных клеток были получены достоверные отличия при сравнении пациентов в первой и второй ремиссии. Так, у пациентов в первой ремиссии больше процент клеток с хозяйским генотипом среди T-кон, чем у пациентов во второй ремиссии, что объясняется различием иммуносупрессивной терапии. Полученные результаты объясняются тем, что у пациентов, находящихся

в ПР1 в схему профилактики РТПХ был включен лАТГ, а по данным литературных источников при использовании лошадиного антиtimoцитарного глобулина не происходит выраженной лимфоаблации [77].

При изучении влияния предтрансплантационного кондиционирования на химеризм в костном мозге, а также среди Т-конвенциональных, Т-регуляторных клеток нами не было получено достоверного статистического различия при использовании кондиционирования в режиме МАС в отличие от режима R1С. По данным литературы при сравнении кондиционирования в миелоаблативном режиме и режиме пониженной интенсивности имеются различия: при использовании R1С увеличивается вероятность возникновения острой и хронической РТПХ, а также рецидив заболевания [39; 159]. Однако, в нашей работе мы не обнаружили влияния предтрансплантационного кондиционирования на химеризм.

Исследуя влияние химеризма на рецидив в костном мозге, а также среди Т-конвенциональных, Т-регуляторных клеток мы не получили достоверного статистического различия, это связано с тем, что данная популяция Т-клеток не участвует напрямую в Т-клеточном ответе против опухоли.

Анализируя химеризм в зависимости от донора, мы получили значимые различия в костном мозге и среди Т-конвенциональных клеток на сроке +30 день алло-ТГСК.

Несмотря на недостаточную статистическую значимость данных, нами была отмечена тенденция к большему числу хозяйских Т-рег среди пациентов, которым трансплантация была выполнена от родственных и неродственных полностью совместимых доноров в сравнении с частично-совместимыми и гаплоидентичными трансплантациями. А учитывая, что фундаментальным различием этих видов трансплантаций является прежде всего использование лАТГ при трансплантации от родственного и неродственного полностью совместимого донора. Вероятно, это связано с тем, что при применении данного иммуносупрессанта происходит персистенция Т-клеток, принадлежавших реципиенту.

При исследовании химеризма в костном мозге, Т-конвенциональных, Т-регуляторных клетках в зависимости от источника трансплантата нами были получены значимые результаты на сроке +30 день алло-ТГСК.

Примесь клеток с хозяйским генотипом в ранние сроки после алло-ТГСК, в нашем случае – на +30 день алло-ТГСК, у пациентов с источником трансплантата в виде костного мозга свидетельствует о том, что при трансплантации костного мозга происходит более медленное восстановление, чем при трансфузии стволовых клеток. Именно поэтому в первые месяцы после трансплантации аллогенного костного мозга могут персистировать клетки, принадлежащие хозяйскому генотипу [87].

В нашей работе мы сравнили влияние режимов профилактики РТПХ и их влияние на химеризм в клетках костного мозга и среди Т-хелперов периферической крови.

Антитимоцитарный глобулин используется в схемах профилактики РТПХ с 1970-х годов [168]. Как известно, стандарт лечения взрослых пациентов с апластической анемией, не имеющих родственных доноров, включает комбинацию ЛАТГ и ЦСА. При использовании ЛАТГ в 60 – 70% случаев происходит восстановление показателей периферической крови, уменьшается зависимость от трансфузий компонентов крови [154]. При замене лошадиного АТГ на кроличий не происходит должного эффекта и только в 30 – 40% случаев происходит гематологическое восстановление [135], поэтому ЛАТГ является золотым стандартом в лечении апластической анемии.

Механизм действия антитимоцитарного глобулина основан на иммуносупрессивном действии, обусловленном уничтожением лимфоцитов в циркулирующем пуле [22].

В нескольких исследованиях была продемонстрирована неэффективность ЛАТГ в качестве профилактики острой и хронической РТПХ [46; 81].

В 2017 г. опубликовано крупное исследование, в которое были включены 833 пациента с тяжелой апластической анемией после алло-ТГСК. В работе было показано, что после родственной HLA-совместимой трансплантации чаще

развивается острая (17% против 6%, $p < 0,001$) и хроническая РТПХ (20% против 9%, $p < 0,01$) у пациентов, получавших лАТГ по сравнению с пациентами, получавшими кАТГ. У пациентов после неродственной трансплантации частота оРТПХ была выше при ИСТ, проводимой лАТГ (42% против 23%, $p < 0,001$) [53].

При трансплантации солидных органов тоже проводили сравнение лошадиного и кроличьего АТГ. Так Hardinger и др. сравнивали бессобытийную выживаемость при применении лАТГ и кАТГ спустя год после трансплантации почки. Показатели были значимо лучше у пациентов, получавших кроличий АТГ в сравнении с лошадиным [68].

Есть работы, в которых показано, что именно кАТГ в отличие от лАТГ индуцирует дифференцировку в Т-регуляторные клетки [138], что, в свою очередь, играет большую роль в профилактике РТПХ.

По данным литературы после внутривенного введения все виды АТГ вызывают деплецию Т-клеток в периферической крови [111]. Однако, в нашей работе мы видим большой процент клеток с хозяйским генотипом именно у пациентов, которым выполнялась профилактика оРТПХ лошадиным антиtimoцитарным глобулином, что свидетельствует о недостаточной лимфодеплетирующей способности этого препарата и о потенциальном механизме показанной ранее его клинической неэффективности.

У пациентов, у которых в схему профилактики РТПХ был включен ПТ-ЦФ мы наблюдали меньший процент клеток с хозяйским генотипом, как в костном мозге, так и среди Т-клеток. По данным многих исследований, в которых оценивалась эффективность посттрансплантационного циклофосфида препарат снижает вероятность как острой, так и хронической РТПХ не только при гаплоидентичных трансплантациях, но и при HLA-совместимых родственных и неродственных алло-ТГСК [103; 114], таким образом снижая потребность в других иммуносупрессивных препаратах.

Действие циклофосфида на Т-клетки заключается в деплеции непосредственно аллореактивных Т-клеток без значимого воздействия на

эффektorные клетки, что в будущем дает возможность для полноценной реконституции Т-клеточного пула [150].

Учитывая большой процент клеток с хозяйским генотипом в Т-клетках, мы проанализировали развитие поздней oРТПХ на фоне плановой отмены иммуносупрессии.

У пациентов, у которых в последствии развилась oРТПХ на фоне отмены иммуносупрессивной терапии мы наблюдали большой процент клеток с хозяйским генотипом, как в костном мозге, так и среди Т-конвенциональных, Т-регуляторных клеток периферической крови ($p = 0,023$, $p = 0,014$, $p = 0,017$) на +60 день алло-ТГСК. С течением времени на +90 день алло-ТГСК в костном мозге мы не отметили разницы в примеси клеток с хозяйским генотипом у пациентов с oРТПХ и без нее. В популяции Т-клеток периферической крови сохранялся большой процент клеток с хозяйским генотипом, как в Т-конвенциональных клетках, так и в Т-регуляторных ($p = 0,017$, $p = 0,0037$).

По данным литературы смешанный химеризм как в костном мозге, так и в клеточных популяциях в большей степени является предиктором развития рецидива заболевания, чем oРТПХ. Однако есть работы, в которых показано, что смешанный химеризм среди Т-клеток приводит к развитию oРТПХ. В работе Antin и коллег [58] продемонстрировано, что пациенты, которые имеют более 90% донорских Т-клеток после алло-ТГСК развивают oРТПХ чаще, чем пациенты, имеющие менее 90% Т-клеток, принадлежащих донору, однако, как показывает наше исследование, химеризм не во всех популяциях имеет одинаковое значение.

В другой работе [108] было показано, что Т-регуляторные клетки, имеющие смешанный химеризм, препятствуют функционированию наивных донорских Т-клеток и, таким образом, подавляют иммунный ответ.

Анализируя данные, полученные при ROC-анализе, мы определили пороговое значение химеризма в Т-регуляторных клетках на +90 день после алло-ТГСК – 17,5%. Далее мы использовали этот параметр для оценки кумулятивной частоты развития oРТПХ. При детекции среди Т-рег более 17,5% клеток с хозяйским генотипом риск развития oРТПХ 66,7%. Это объясняется тем, что Т-рег

с хозяйским генотипом не выполняют регуляцию иммунного ответа и плановая отмена ИСТ, происходящая на этом сроке, приводит к развитию ОРТПХ. Таким образом, химеризм в Т-рег на этом сроке может служить фактором прогноза ОРТПХ.

Глава 5. Заключение

Ежегодно в мире растет количество выполненных трансплантаций гемопоэтических стволовых клеток. Все трансплантационные центры сталкиваются с развитием иммунологических осложнений после алло-ТГСК. оРТПХ остается ведущим осложнением после алло-ТГСК и возникает у половины пациентов после трансплантации. Рецидив заболевания после алло-ТГСК, в свою очередь, возникает у 30–50% больных в зависимости от заболевания [25; 146; 192].

Главными клетками, поддерживающими баланс между РТПХ и РТПЛ, являются Т-клетки, а именно Т-регуляторные клетки.

Наша работа была посвящена изучению химеризма среди субпопуляций Т-хелперов у больных гемобластозами после трансплантации аллогенных стволовых кроветворных клеток.

Мы провели анализ взаимосвязи химеризма в костном мозге и среди Т-клеток хелперов периферической крови, как ведущих клеток в поддержании иммунологического баланса. При исследовании пунктата костного мозга и субпопуляций Т-клеток на сроках +30, +60, +90 дни алло-ТГСК имеется разница между химеризмом в клетках костного мозга и Т-хелперах.

По результатам нашей работы мы можем сделать заключение, что основное влияние на химеризм у пациентов с острыми лейкозами в отдельных популяциях Т-хелперов после алло-ТГСК оказывает режим профилактики РТПХ.

В целом, проведенное исследование показало, что не только количественные параметры тех или иных популяций Т-клеток вносят существенный вклад в развитие посттрансплантационных осложнений. А именно структурный состав и генетическая принадлежность Т-клеток влияет на развитие последующих аллоиммунных осложнений. Понимание не только роли отдельных субпопуляций, но и их генетической принадлежности дает возможности для патогенетического обоснования того или иного подхода в профилактике РТПХ и дальнейшей своевременной модификации иммуносупрессивной терапии, а также проведения

обоснованной превентивной терапии, включая современные клеточные технологии.

Глава 6. Выводы

1. Химеризм у пациентов с острыми лейкозами в отдельных популяциях Т-клеток ($CD4^+CD25^-$, $CD4^+CD25^+$) после алло-ТГСК ассоциирован с режимом профилактики РТПХ. При применении в режимах ИСТ ПТ-ЦФ+лАТГ процент клеток с хозяйским генотипом значимо ниже в сравнении с режимами, в которых применялся только лАТГ на сроке +30 дней, +60 дней после алло-ТГСК ($p < 0,05$).
2. Химеризм среди отдельных популяций Т-клеток ($CD4^+CD25^-$, $CD4^+CD25^+$) отличается от химеризма в костном мозге в различные сроки после трансплантации. Примесь хозяйского кроветворения среди клеток костного мозга значимо ниже, чем среди Т-клеток периферической крови ($CD4^+CD25^-$, $CD4^+CD25^+$) на +30 день после алло-ТГСК ($p < 0,05$), на +60 день после алло-ТГСК ($p < 0,05$), на +90 день алло-ТГСК ($p < 0,05$).
3. Вариант острого лейкоза, статус до трансплантации и интенсивность кондиционирования не оказывают значимого влияния на химеризм в отдельных популяциях Т-хелперов ($CD4^+CD25^-$, $CD4^+CD25^+$). Химеризм в отдельных популяциях Т-хелперов периферической крови не ассоциирован с развитием рецидива заболевания.
4. Химеризм в популяции $CD4^+CD25^+$ клеток периферической крови служит маркером-предиктором поздней оРТПХ. Вероятность развития поздней оРТПХ значимо выше у пациентов, у которых хозяйский химеризм среди Т-рег более 17,5% на сроке +90 день после алло-ТГСК и составляет 66,7% против 5,6% ($p = 0,001$).
5. Для оценки влияния клеточных популяций после трансплантации необходимо исследование качественных (химеризм) и количественных (абсолютные значения) значений этих популяций.

Практические рекомендации

1. Исключить применение лАТГ у больных с острыми лейкозами в режиме профилактики РТПХ, так как данный препарат потенциально увеличивает риск развития оРТПХ на сроках после +90 дня.

2. Химеризм в популяции CD4⁺CD25⁺ клеток периферической крови может быть использован для прогнозирования развития поздней оРТПХ у реципиентов аллогенных гемопоэтических стволовых клеток.

Список сокращений

Алло-ТГСК – трансплантация аллогенных гемопоэтических стволовых клеток

АТГ – антитимоцитарный глобулин

ГСК – гемопоэтические стволовые клетки

ИСТ – иммуносупрессивная терапия

кАТГ – кроличий антитимоцитарный глобулин

КМ – костный мозг

лАТГ – лошадиный антитимоцитарный глобулин

МДС – миелодиспластический синдром

ММФ – микофенолата мофетил

МТХ – метотрексат

ОЛЛ – острый лимфобластный лейкоз

ОМЛ – острый миелобластный лейкоз

ОРТПХ – острая реакция «трансплантат против хозяина»

ПР – полная ремиссия

ПТ-ЦФ – посттрансплантационный циклофосфамид

ПЦР, РСР – полимеразная цепная реакция

РТПХ – реакция «трансплантат против хозяина»

РТПЛ – реакция «трансплантат против лейкоза»

СКК – стволовые клетки крови

Т-кон – Т-конвенциональные клетки

Т-рег – Т-регуляторные клетки

ТКР, TCR – т-клеточный рецептор

хрРТПХ – хроническая реакция «трансплантат против хозяина»

ЦСА – циклоспорин

CD – кластер дифференцировки

CTLA-4 – антиген цитотоксических Т-лимфоцитов

FISH – флуоресцентная гибридизация in situ

FoxP3 — белок семейства FoxP3

IGTR — глюкокортикоид индуцированный рецептор семейства фактора некроза опухоли

HLA – человеческие лейкоцитарные антигены

Ig – иммуноглобулин

IL – интерлейкин

LAG3 – мембранный белок суперсемейства иммуноглобулина

MAC – myeloablative conditioning (миелоаблативный режим кондиционирования)

MHC – главный комплекс гистосовместимости

mTOR – серин/треонинкиназа

NK – естественные (натуральные) киллеры

OX40 (TNFRSF4) – мембранный белок, рецептор из семейства рецепторов фактора опухоли лиганда OX40L

PI3K – фосфатидилинозитол-3-киназа

qPCR – полимеразная цепная реакция в реальном времени

RIC – reduced intensity conditioning (режим кондиционирования пониженной интенсивности)

RFLP – полиморфизм длин рестриционных фрагментов

STR – короткие tandemные повторы

TGF β – трансформирующий фактор роста β

Th – Т-хелперы

TNF – фактор некроза опухоли

iТрег – индуцибельные Т-регуляторные клетки

nТрег – естественные Т-регуляторные клетки

pТрег – периферические Т-регуляторные клетки

rТрег – резидентные Т-регуляторные клетки

VNTR – tandemные повторы с переменным числом

Список литературы

1. InDel-полиморфизм в количественной оценке посттрансплантационного химеризма / И. М. Бархатов, А. И. Шакирова, А. В. Евдокимов [и др.] // Ученые записки СПбГМУ им. акад. И.П.Павлова. – 2016. – Т. XXIII. – № 4. – С. 40-45.
2. Аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток при остром миелобластном лейкозе в первой ремиссии / С. Н. Бондаренко, Е. В. Семенова, В. Н. Вавилов [и др.] // Терапевтический архив. – 2013. – Т. 7. – С. 18-25.
3. Блау О.В. Химеризм после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток / Блау О.В. // Клиническая онкогематология. – 2013. – Т. 6. – № 1. – С. 34-39.
4. Желнова Е.И. Линейно-специфический химеризм у больных гемобластозами после трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток / Желнова Е.И. // Автореферат. – 2008.
5. Иммунобиология острой реакции «Трансплантат против хозяина» / Г. А. Ефимов, А. С. Вдовин, А. А. Григорьев [и др.] // Медицинская иммунология. – 2015. – Т. 17. – № 6. – С. 499-516.
6. Прогностическое значение показателей посттрансплантационного химеризма / А. А. Сипол, Е. В. Семенова, И. М. Бархатов [и др.] // Онкогематология. – 2008. – № 4. – С. 31-35.
7. A crucial role for antigen-presenting cells and alloantigen expression in graft-versus-leukemia responses / P. Reddy, Y. Maeda, C. Liu [et al.] // Nature Medicine. – 2005. – Vol. 11. – № 11. – P. 1244-1249.
8. A multicenter investigation with interphase fluorescence in situ hybridization using X- and Y-chromosome probes / G. Dewald, R. Stallard, A. A. I. Saadi [et al.] // American Journal of Medical Genetics. – 1998. – Vol. 76. – № 4. – P. 318-326.
9. A prospective randomized trial comparing cyclosporine and short course methotrexate with cyclosporine and mycophenolate mofetil for GVHD prophylaxis in myeloablative allogeneic bone marrow transplantation / B. Bolwell, R. Sobecks, B. Pohlman [et al.] // Bone Marrow Transplantation. – 2004. – Vol. 34. – № 7. – P. 621-625.

10. A retrospective analysis of therapy for acute graft-versus-host disease: initial treatment / P. Martin, G. Schoch, L. Fisher [et al.] // *Blood*. – 1990. – Vol. 76. – № 8. – P. 1464-72.
11. Abraham R. T. Immunopharmacology of rapamycin / R. T. Abraham, G. J. Wiederrecht // *Annual Review of Immunology*. – 1996. – Vol. 14. – P. 483-510.
12. Acute graft-versus-host disease: Pathophysiology, clinical manifestations, and management / D. Couriel, H. Caldera, R. Champlin, K. Komanduri // *Cancer*. – 2004. – Vol. 101. – № 9. – P. 1936-1946.
13. Acute graft versus host disease: A comprehensive review / S. Nassereddine, H. Rafei, E. Elbahesh, I. Tabbara // *Anticancer Research*. – 2017. – Vol. 37. – № 4. – P. 1547-1555.
14. Acute GVHD is a strong predictor of full donor CD3+ T cell chimerism after reduced intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation / J. El-Cheikh, A. Vazquez, R. Crocchiolo [et al.] // *American Journal of Hematology*. – 2012. – Vol. 87. – № 12. – P. 1074-1078.
15. Ahmed F. E. Forensic DNA Typing: Biology & Technology behind STR Markers . John M. Butler / F. E. Ahmed // *The Quarterly Review of Biology*. – 2001. – Vol. 76. – № 4. – P. 484-484.
16. Aladağ E. Acute graft-versus-host disease: A brief review / E. Aladağ, E. Kelkitli, H. Göker // *Turkish Journal of Hematology*. – 2020. – Vol. 37. – № 1. – P. 1-4.
17. Aldehyde dehydrogenase expression drives human regulatory T cell resistance to posttransplantation cyclophosphamide / C. G. Kanakry, S. Ganguly, M. Zahurak [et al.] // *Science Translational Medicine*. – 2013. – Vol. 5. – № 211. – P. 1-23.
18. Alloantigen-specific de novo-induced Foxp3+ Treg revert in vivo and do not protect from experimental GVHD / C. Koenecke, N. Czeloth, A. Bubke [et al.] // *European Journal of Immunology*. – 2009. – Vol. 39. – № 11. – P. 3091-3096.
19. Amplification by the polymerase chain reaction of hypervariable regions of the human genome for evaluation of chimerism after bone marrow transplantation / L. Ugozzoli, P. Yam, L. D. Petz [et al.] // *Blood*. – 1991. – Vol. 77. – № 7. – P. 1607-1615.
20. Analysis of donor-type chimerism in lineage-specific cell populations after

- allogeneic myeloablative and nonmyeloablative stem cell transplantation / Y. Miura, J. Tanaka, T. Toubai [et al.] // *Bone Marrow Transplantation*. – 2006. – Vol. 37. – № 9. – P. 837-843.
21. Anti-thymocyte globulin (ATG) differentially depletes naïve and memory T cells and permits memory-type regulatory T cells in nonobese diabetic mice / C. Q. Xia, A. V. Chernatynskaya, C. H. Wasserfall [et al.] // *BMC Immunology*. – 2012. – Vol. 13. – P. 1-13.
22. Antithymocyte globulin in allogeneic hematopoietic cell transplantation: Benefits and limitations / T. Nishihori, Z. Al-Kadhimi, M. Hamadani, M. A. Kharfan-Dabaja // *Immunotherapy*. – 2016. – Vol. 8. – № 4. – P. 435-447.
23. Bacigalupo A. Antilymphocyte/thymocyte globulin for graft versus host disease prophylaxis: Efficacy and side effects / A. Bacigalupo // *Bone Marrow Transplantation*. – 2005. – Vol. 35. – № 3. – P. 225-231.
24. Bader P. Documentation of engraftment and chimerism after HSCT / P. Bader // *The EBMT Handbook: Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Cellular Therapies*. – 2018. – P. 143-147.
25. Barrett A. J. Relapse after allogeneic stem cell transplantation / A. J. Barrett, M. Battiwalla // *Expert Review of Hematology*. – 2010. – Vol. 3. – № 4. – P. 429-441.
26. Berenbaum M. C. Prolongation of homograft survival in mice with single doses of cyclophosphamide [30] / M. C. Berenbaum, I. N. Brown // *Nature*. – 1963. – Vol. 200. – № 4901. – P. 84.
27. Billingham R. E. The biology of graft-versus-host reactions. / R. E. Billingham // *Harvey lectures*. – 1966. – Vol. 62. – P. 21-78.
28. Blood stem cells compared with bone marrow as a source of hematopoietic cells for allogeneic transplantation / R. E. Champlin, N. Schmitz, M. M. Horowitz [et al.] // *Blood*. – 2000. – Vol. 95. – № 12. – P. 3702-9.
29. Bluestone J. A. Mechanisms of tolerance / J. A. Bluestone // *Immunological Reviews*. – 2011. – Vol. 241. – № 1. – P. 5-19.
30. Böyum A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow. Introduction. / A. Böyum // *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation, Supplement*.

– 1968. – Vol. 97. – P. 7.

31. Calcineurin inhibitors, but not rapamycin, reduce percentages of CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells in renal transplant recipients / D. S. Segundo, J. C. Ruiz, M. Izquierdo [et al.] // *Transplantation*. – 2006. – Vol. 82. – № 4. – P. 550-557.

32. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells / W. Liu, A. L. Putnam, Z. Xu-yu [et al.] // *Journal of Experimental Medicine*. – 2006. – Vol. 203. – № 7. – P. 1701-1711.

33. CD4+CD25+ regulatory T cells preserve graft-versus-tumor activity while inhibiting graft-versus-host disease after bone marrow transplantation / M. Edinger, P. Hoffmann, J. Ermann [et al.] // *Nature Medicine*. – 2003. – Vol. 9. – № 9. – P. 1144-1150.

34. Cheng G. T-cell tolerance and the multi-functional role of IL-2R signaling in T-regulatory cells / G. Cheng, A. Yu, T. R. Malek // *Immunological Reviews*. – 2011. – Vol. 241. – № 1. – P. 63-76.

35. Clinical-Grade–Expanded Regulatory T Cells Prevent Graft-versus-Host Disease While Allowing a Powerful T Cell–Dependent Graft-versus-Leukemia Effect in Murine Models / B. Del Papa, L. Ruggeri, E. Urbani [et al.] // *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. – 2017. – Vol. 23. – № 11. – P. 1847-1851.

36. Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HLA-matched sibling donors / H. Glucksberg, R. Storb, A. Fefer [et al.] // *Transplantation*. – 1974. – Vol. 18. – № 4. – P. 295-304.

37. Clinical tolerance in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation / M. G. Roncarolo, S. Gregori, B. Lucarelli [et al.] // *Immunological Reviews*. – 2011. – Vol. 241. – № 1. – P. 145-163.

38. Cohen J. L. The role of CD4+CD25hi regulatory T cells in the pathogenesis of graft-versus-host disease / J. L. Cohen, O. Boyer // *Current Opinion in Immunology*. – 2006. – Vol. 18. – № 5. – P. 580-585.

39. Comparison of reduced-intensity and myeloablative conditioning regimens for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in patients with acute myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia: A meta-analysis / S. F. A. Wahid, N. A. Ismail, M. R. Mohd-Idris [et al.] // *Stem Cells and Development*. – 2014. – Vol. 23. –

№ 21. – P. 2535-2552.

40. Conversion from calcineurin inhibitor to mycophenolate mofetil-based immunosuppression changes the frequency and phenotype of CD4+FOXP3+ regulatory T cells / A. Demirkiran, V. D. K. D. Sewgobind, J. Van Der Weijde [et al.] // *Transplantation*. – 2009. – Vol. 87. – № 7. – P. 1062-1068.

41. Cutaneous Graft-Versus-Host Disease: Diagnosis and Treatment / K. Strong Rodrigues, C. Oliveira-Ribeiro, S. de Abreu Fiuza Gomes, R. Knobler // *American Journal of Clinical Dermatology*. – 2018. – Vol. 19. – № 1. – P. 33-50.

42. Cytogenetic follow-up studies of recipients of T-cell depleted allogeneic bone marrow / S. D. Lawler, H. Harris, J. Millar [et al.] // *British Journal of Haematology*. – 1987. – Vol. 65. – № 2. – P. 143-150.

43. Cytological identification of radiation-chimæras / C. E. Ford, J. L. Hamerton, D. W. H. Barnes, J. F. Loutit // *Nature*. – 1956. – Vol. 177. – № 4506. – P. 452-454.

44. Decreased incidence of graft-versus-host disease and improved survival with methotrexate combined with cyclosporin compared with monotherapy in recipients of bone marrow from donors other than HLA identical siblings / O. Ringden, S. Klaesson, B. Sundberg [et al.] // *Bone Marrow Transplantation*. – 1992. – Vol. 9. – № 1. – P. 19-25.

45. Diagnostic value of highly-sensitive chimerism analysis after allogeneic stem cell transplantation / L. Sellmann, K. Rabe, I. Bünting [et al.] // *Bone Marrow Transplantation*. – 2018. – Vol. 53. – № 11. – P. 1457-1465.

46. Different Outcomes between Cyclophosphamide Plus Horse or Rabbit Antithymocyte Globulin for HLA-Identical Sibling Bone Marrow Transplant in Severe Aplastic Anemia / E. H. Atta, A. M. de Sousa, M. R. Schirmer [et al.] // *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. – 2012. – Vol. 18. – № 12. – P. 1876-1882.

47. Digital droplet PCR-based chimerism analysis for monitoring of hematopoietic engraftment after allogeneic stem cell transplantation / T. Mika, A. Baraniskin, S. Ladigan [et al.] // *International Journal of Laboratory Hematology*. – 2019. – Vol. 41. – № 5. – P. 615-621.

48. Digital PCR panel for sensitive hematopoietic chimerism quantification after

- allogeneic stem cell transplantation / T. Stahl, C. Rothe, M. U. Böhme [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2016. – Vol. 17. – № 9. – P. 1-12.
49. Digital PCR to assess hematopoietic chimerism after allogeneic stem cell transplantation / T. Stahl, M. U. Böhme, N. Kröger, B. Fehse // *Experimental Hematology*. – 2015. – Vol. 43. – № 6. – P. 462-468.e1.
50. Disease burden may identify patients more likely to benefit from second allogeneic hematopoietic stem cell transplantation to treat relapsed acute myelogenous leukemia / C. Hosing, R. M. Saliba, M. Shahjahan [et al.] // *Bone Marrow Transplantation*. – 2005. – Vol. 36. – № 2. – P. 157-162.
51. DNA methylation controls Foxp3 gene expression / J. K. Polansky, K. Kretschmer, J. Freyer [et al.] // *European Journal of Immunology*. – 2008. – Vol. 38. – № 6. – P. 1654-1663.
52. Donor-type CD4+CD25+ regulatory T cells suppress lethal acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation / P. Hoffmann, J. Ermann, M. Edinger [et al.] // *Journal of Experimental Medicine*. – 2002. – Vol. 196. – № 3. – P. 389-399.
53. Effect of antithymocyte globulin source on outcomes of bone marrow transplantation for severe aplastic anemia / N. Kekre, Y. Zhang, M. J. Zhang [et al.] // *Haematologica*. – 2017. – Vol. 102. – № 7. – P. 1291-1298.
54. Emadi A. Cyclophosphamide and cancer: Golden anniversary / A. Emadi, R. J. Jones, R. A. Brodsky // *Nature Reviews Clinical Oncology*. – 2009. – Vol. 6. – № 11. – P. 638-647.
55. Emerson S. G. The regulation of hematopoiesis following bone marrow transplantation / S. G. Emerson, R. P. Gale // *The International Journal of Cell Cloning*. – 1987. – Vol. 5. – № 6. – P. 432-449.
56. Epigenetic control of the foxp3 locus in regulatory T cells / S. Floess, J. Freyer, C. Siewert [et al.] // *PLoS Biology*. – 2007. – Vol. 5. – № 2. – P. 0169-0178.
57. Epigenetic Regulation of Foxp3 Expression in Regulatory T Cells by DNA Methylation / G. Lal, N. Zhang, W. van der Touw [et al.] // *The Journal of Immunology*. – 2009. – Vol. 182. – № 1. – P. 259-273.

58. Establishment of complete and mixed donor chimerism after allogeneic lymphohematopoietic transplantation: Recommendations from a workshop at the 2001 tandem meetings / J. H. Antin, R. Childs, A. H. Filipovich [et al.] // *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. – 2001. – Vol. 7. – № 9. – P. 473-485.
59. Evaluation of mixed hematopoietic chimerism in pediatric patients with leukemia after allogeneic stem cell transplantation by quantitative PCR analysis of variable number of tandem repeat and testis determination gene / L. J. Wang, P. Chou, L. Gonzalez-Ryan [et al.] // *Bone Marrow Transplantation*. – 2002. – Vol. 29. – № 1. – P. 51-56.
60. Evolution of mixed chimerism after allogeneic bone marrow transplantation as determined on granulocytes and mononuclear cells by the polymerase chain reaction / E. Roux, C. Helg, B. Chapuis [et al.] // *Blood*. – 1992. – Vol. 79. – № 10.
61. Extended follow-up of methotrexate-free immunosuppression using sirolimus and tacrolimus in related and unrelated donor peripheral blood stem cell transplantation / C. Cutler, S. Li, V. T. Ho [et al.] // *Blood*. – 2007. – Vol. 109. – № 7. – P. 3108-3114.
62. Extrathymic generation of regulatory T cells in placental mammals mitigates maternal-fetal conflict / R. M. Samstein, S. Z. Josefowicz, A. Arvey [et al.] // *Cell*. – 2012. – Vol. 150. – № 1. – P. 29-38.
63. Fontenot J. D. Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells / J. D. Fontenot, M. A. Gavin, A. Y. Rudensky // *Journal of Immunology*. – 2017. – Vol. 198. – № 3. – P. 986-992.
64. Frequency of CD4⁺CD25^{hi}FOXP3⁺ Regulatory T Cells Has Diagnostic and Prognostic Value as a Biomarker for Acute Graft-versus-Host-Disease / J. M. Magenau, X. Qin, I. Tawara [et al.] // *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. – 2010. – Vol. 16. – № 7. – P. 907-914.
65. Gershon R. K. Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. / R. K. Gershon, K. Kondo // *Immunology*. – 1970. – Vol. 18. – № 5. – P. 723-37.
66. Granzyme B expression in T-regulatory cells is a strong predictor of acute graftversus- host disease after day +30 in patients with classic immunosuppression after allo-HSCT / M. Y. Drovov, E. N. Parovichnikova, J. O. Davydova [et al.] // *Cellular*

Therapy and Transplantation. – 2016. – Vol. 5. – № 3. – P. 22-25.

67. Haploidentical transplant with posttransplant cyclophosphamide vs matched unrelated donor transplant for acute myeloid leukemia / S. O. Ciurea, M. J. Zhang, A. A. Bacigalupo [et al.] // *Blood*. – 2015. – Vol. 126. – № 8. – P. 1033-1040.

68. Hardinger K. L. Rabbit antithymocyte globulin induction therapy in adult renal transplantation / K. L. Hardinger // *Pharmacotherapy*. – 2006. – Vol. 26. – № 12 I. – P. 1771-1783.

69. High-dose cyclophosphamide as single-agent, short-course prophylaxis of graft-versus-host disease / L. Luznik, J. Bolaños-Meade, M. Zahurak [et al.] // *Blood*. – 2010. – Vol. 115. – № 16. – P. 3224-3230.

70. High donor FOXP3-positive regulatory T-cell (Treg) content is associated with a low risk of GVHD following HLA-matched allogeneic SCT / K. Rezvani, S. Mielke, M. Ahmadzadeh [et al.] // *Blood*. – 2006. – Vol. 108. – № 4. – P. 1291-1297.

71. High expression of granzyme B in conventional CD4+ T cells is associated with increased relapses after allogeneic stem cells transplantation in patients with hematological malignancies / M. Drovok, Y. Davydova, N. Popova [et al.] // *Transplant Immunology*. – 2021. – Vol. 65. – P. 1-20.

72. HLA-Haploidentical Bone Marrow Transplantation for Hematologic Malignancies Using Nonmyeloablative Conditioning and High-Dose, Posttransplantation Cyclophosphamide / L. Luznik, P. V. O'Donnell, H. J. Symons [et al.] // *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. – 2008. – Vol. 14. – № 6. – P. 641-650.

73. HLA Association with Hematopoietic Stem Cell Transplantation Outcome: The Number of Mismatches at HLA-A, -B, -C, -DRB1, or -DQB1 Is Strongly Associated with Overall Survival / P. Loiseau, M. Busson, M. L. Balere [et al.] // *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. – 2007. – Vol. 13. – № 8. – P. 965-974.

74. Homeostasis of Peripheral CD4 + T Cells: IL-2R α and IL-2 Shape a Population of Regulatory Cells That Controls CD4 + T Cell Numbers / A. R. M. Almeida, N. Legrand, M. Papiernik, A. A. Freitas // *The Journal of Immunology*. – 2002. – Vol. 169. – № 9. – P. 4850-4860.

75. Homeostatic maintenance of natural Foxp3+ CD25+ CD4+ regulatory T cells by

- interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization / R. Setoguchi, S. Hori, T. Takahashi, S. Sakaguchi // *Journal of Experimental Medicine*. – 2005. – Vol. 201. – № 5. – P. 723-735.
76. Hood K. A. Mycophenolate mofetil: A unique immunosuppressive agent / K. A. Hood, D. G. Zaremski // *American Journal of Health-System Pharmacy*. – 1997. – Vol. 54. – № 3. – P. 285-294.
77. Horse versus Rabbit Antithymocyte Globulin in Acquired Aplastic Anemia / P. Scheinberg, O. Nunez, B. Weinstein [et al.] // *New England Journal of Medicine*. – 2011. – Vol. 365. – № 5. – P. 430-438.
78. Huennekens F. M. The methotrexate story: A paradigm for development of cancer chemotherapeutic agents / F. M. Huennekens // *Advances in Enzyme Regulation*. – 1994. – Vol. 34. – № C. – P. 397-418.
79. Immunoablative high-dose cyclophosphamide without stem-cell rescue for refractory, severe autoimmune disease / R. A. Brodsky, M. Petri, B. D. Smith [et al.] // *Annals of Internal Medicine*. – 1998. – Vol. 129. – № 12. – P. 1031-1035.
80. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. / S. Sakaguchi, N. Sakaguchi, M. Asano [et al.] // *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. – 1995. – Vol. 155. – № 3. – P. 1151-64.
81. Impact of immune modulation with anti-T-cell antibodies on the outcome of reduced-intensity allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for hematologic malignancies / R. J. Soiffer, J. LeRademacher, V. Ho [et al.] // *Blood*. – 2011. – Vol. 117. – № 25. – P. 6963–6970.
82. Impact of immunosuppressive drugs on CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells: Does in vitro evidence translate to the clinical setting? / A. Demirkiran, T. K. Hendrikx, C. C. Baan, L. J. W. Van Der Laan // *Transplantation*. – 2008. – Vol. 85. – № 6. – P. 783-789.
83. Impact of mycophenolic acid and tacrolimus on Th17-related immune response / F. Abadja, S. Atemkeng, E. Alamartine [et al.] // *Transplantation*. – 2011. – Vol. 92. – № 4. – P. 396-403.

84. Important factors in implementation of lineage-specific chimerism analysis for routine use / T. P. Das, D. A. Kipp, D. S. Kliman [et al.] // *Bone Marrow Transplantation*. – 2021. – Vol. 56. – № 4. – P. 946-948.
85. In vitro amplification of hypervariable DNA regions for the evaluation of chimerism after allogeneic BMT / G. Martinelli, E. Trabetti, A. Zaccaria [et al.] // *Bone Marrow Transplantation*. – 1993. – Vol. 12. – № 2. – P. 115-120.
86. Increased frequency of regulatory T Cells and selection of highly potent CD62L+ cells during treatment of human lung transplant recipients with rapamycin / C. M. Lange, T. Y. V. Tran, H. Farnik [et al.] // *Transplant International*. – 2010. – Vol. 23. – № 3. – P. 266-276.
87. Influence of conditioning regimens and stem cell sources on donor-type chimerism early after stem cell transplantation / J. Sugita, J. Tanaka, A. Hashimoto [et al.] // *Annals of Hematology*. – 2008. – Vol. 87. – № 12. – P. 1003-1008.
88. Instability of Foxp3 expression limits the ability of induced regulatory T cells to mitigate graft versus host disease / A. Beres, R. Komorowski, M. Mihara, W. R. Drobyski // *Clinical Cancer Research*. – 2011. – Vol. 17. – № 12. – P. 3969-3983.
89. Instability of the transcription factor Foxp3 leads to the generation of pathogenic memory T cells in vivo / X. Zhou, S. L. Bailey-Bucktrout, L. T. Jeker [et al.] // *Nature Immunology*. – 2009. – Vol. 10. – № 9. – P. 1000-1007.
90. Jamil M. O. State-of-the-art acute and chronic GVHD treatment / M. O. Jamil, S. Mineishi // *International Journal of Hematology*. – 2015. – Vol. 101. – № 5. – P. 452-466.
91. JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY Mobilized Peripheral Blood Stem Cells Versus Unstimulated Bone Marrow As a Graft Source for T-Cell-Replete Haploidentical Donor Transplantation Using Post-Transplant Cyclophosphamide / A. Bashey, M.-J. Zhang, S. R. Mccurdy [et al.] // *J Clin Oncol*. – 2017. – Vol. 35. – P. 3002-3009.
92. Kamradt T. Advances in immunology: Tolerance and autoimmunity / T. Kamradt, N. A. Mitchison // *New England Journal of Medicine*. – 2001. – Vol. 344. – № 9. – P. 655-663.
93. Khan F. Significance of chimerism in hematopoietic stem cell transplantation: New

variations on an old theme / F. Khan, A. Agarwal, S. Agrawal // Bone Marrow Transplantation. – 2004. – Vol. 34. – № 1. – P. 1-12.

94. Kottke-Marchant K. Laboratory Hematology Practice / K. Kottke-Marchant, B. H. Davis // Laboratory Hematology Practice. – 2012. – Lab. Hematol. Pract.

95. Lentiviral Vector Transduction of Hematopoietic Stem Cells that Mediate Long-Term Reconstitution of Lethally Irradiated Mice / W. Chen, X. Wu, D. N. Levasseur [et al.] // Stem Cells. – 2000. – Vol. 18. – № 5. – P. 352-359.

96. Linked T Cell Receptor and Cytokine Signaling Govern the Development of the Regulatory T Cell Repertoire / M. A. Burchill, J. Yang, K. B. Vang [et al.] // Immunity. – 2008. – Vol. 28. – № 1. – P. 112-121.

97. Liu C. Targeting regulatory T cells in tumors / C. Liu, C. J. Workman, D. A. A. Vignali // FEBS Journal. – 2016. – P. 2731-2748.

98. Long S. A. CD4 + FOXP3 + T Regulatory Cells in Human Autoimmunity: More Than a Numbers Game / S. A. Long, J. H. Buckner // The Journal of Immunology. – 2011. – Vol. 187. – № 5. – P. 2061-2066.

99. Low-dose, but not high-dose, cyclosporin A promotes regulatory T-cell induction, expansion, or both / R. Baumgrass, C. Brandt, F. Wegner [et al.] // Journal of Allergy and Clinical Immunology. – 2010. – Vol. 126. – № 1. – P. 183-184.

100. Low-dose of tacrolimus favors the induction of functional CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells in solid-organ transplantation / Z. Wang, B. Shi, H. Jin [et al.] // International Immunopharmacology. – 2009. – Vol. 9. – № 5. – P. 564-569.

101. Low-dose post-transplant cyclophosphamide and anti-thymocyte globulin as an effective strategy for GVHD prevention in haploidentical patients / Y. Wang, D. P. Wu, Q. F. Liu [et al.] // Journal of Hematology and Oncology. – 2019. – Vol. 12. – № 1. – P. 1-9.

102. Low-dose post-transplant cyclophosphamide can mitigate GVHD and enhance the G-CSF/ATG induced GVHD protective activity and improve haploidentical transplant outcomes / Y. Wang, Y. J. Chang, L. Chen [et al.] // OncoImmunology. – 2017. – Vol. 6. – № 11. – P. 1-10.

103. Luznik L. High dose cyclophosphamide for GVHD prevention / L. Luznik, R. J.

Jones, E. J. Fuchs // *Current opinion in hematology*. – 2010. – Vol. 17. – № 6. – P. 493-499.

104. Luznik L. Post-transplantation cyclophosphamide for tolerance induction in HLA-haploidentical bone marrow transplantation / L. Luznik, P. V. O'Donnell, E. J. Fuchs // *Seminars in Oncology*. – 2012. – Vol. 39. – № 6. – P. 683-693.

105. Matsuda S. Mechanisms of action of cyclosporine / S. Matsuda, S. Koyasu // *Immunopharmacology*. – 2000. – Vol. 47. – № 2-3. – P. 119-125.

106. Mayumi H. Cyclophosphamide-induced immunological tolerance: An overview / H. Mayumi, M. Umesue, K. Nomoto // *Immunobiology*. – 1996. – Vol. 195. – № 2. – P. 129-139.

107. McCann S. R. Mixed chimaerism; Detection and significance following BMT / S. R. McCann, M. Lawler // *Bone Marrow Transplantation*. – 1993. – Vol. 11. – № 2. – P. 91-94.

108. Mixed chimerism established by hematopoietic stem cell transplantation is maintained by host and donor T regulatory cells / F. A. M. Kinsella, J. Zuo, C. F. Inman [et al.] // *Blood Advances*. – 2019. – Vol. 3. – № 5. – P. 734-743.

109. Mixed hematopoietic chimerism after allogeneic bone marrow transplantation: The impact of quantitative PCR analysis for prediction of relapse and graft rejection in children / P. Bader, W. Hölle, T. Klingebiel [et al.] // *Bone Marrow Transplantation*. – 1997. – Vol. 19. – № 7. – P. 697-702.

110. Mixed T Lymphocyte Chimerism after Allogeneic Hematopoietic Transplantation Is Predictive for Relapse of Acute Myeloid Leukemia and Myelodysplastic Syndromes / H. C. Lee, R. M. Saliba, G. Rondon [et al.] // *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. – 2015. – Vol. 21. – № 11. – P. 1948-1954.

111. Mohty M. Mechanisms of action of antithymocyte globulin: T-cell depletion and beyond / M. Mohty // *Leukemia*. – 2007. – Vol. 21. – № 7. – P. 1387-1394.

112. Molecular monitoring of T-cell chimerism early after allogeneic stem cell transplantation may predict the occurrence of acute GVHD grades II-IV / M. Jaksch, M. Uzunel, M. Remberger [et al.] // *Clinical Transplantation*. – 2005. – Vol. 19. – № 3. – P. 346-349.

113. Mycophenolate mofetil and cyclosporine for graft-versus-host disease prophylaxis following reduced intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation / M. Mohty, H. de Lavallade, C. Faucher [et al.] // *Bone Marrow Transplantation*. – 2004. – Vol. 34. – № 6. – P. 527-530.
114. Nonmyeloablative, HLA-Mismatched Unrelated Peripheral Blood Transplantation with High-Dose Post-Transplantation Cyclophosphamide / K. C. Rappazzo, M. Zahurak, M. Bettinotti [et al.] // *Transplantation and Cellular Therapy*. – 2021. – Vol. 27. – № 11. – P. 909.e1-909.e6.
115. Nonmyeloablative bone marrow transplantation from partially HLA-mismatched related donors using posttransplantation cyclophosphamide / P. V. O'Donnell, L. Luznik, R. J. Jones [et al.] // *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. – 2002. – Vol. 8. – № 7. – P. 377-386.
116. Nonmyeloablative HLA-Haploidentical Bone Marrow Transplantation with High-Dose Posttransplantation Cyclophosphamide: Effect of HLA Disparity on Outcome / Y. L. Kasamon, L. Luznik, M. S. Leffell [et al.] // *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. – 2010. – Vol. 16. – № 4. – P. 482-489.
117. Organ-specific autoimmune diseases induced in mice by elimination of T cell subset: I. Evidence for the active participation of T cells in natural selftolerance; deficit of a T cell subset as a possible cause of autoimmune disease / S. Sakaguchi, K. Fukuma, K. Kuribayashi, T. Masuda // *Journal of Experimental Medicine*. – 1985. – Vol. 161. – № 1. – P. 72-87.
118. Origin of cell populations after bone marrow transplantation. Analysis using DNA sequence polymorphisms / D. Ginsburg, J. H. Antin, B. R. Smith [et al.] // *Journal of Clinical Investigation*. – 1985. – Vol. 75. – № 2. – P. 596-603.
119. Outcome of second allogeneic transplants using reduced-intensity conditioning following relapse of haematological malignancy after an initial allogeneic transplant / B. E. Shaw, G. J. Mufti, S. Mackinnon [et al.] // *Bone Marrow Transplantation*. – 2008. – Vol. 42. – № 12. – P. 783-789.
120. Owen R. D. Immunogenetic consequences of vascular anastomoses between bovine twins / R. D. Owen // *Science*. – 1945. – Vol. 102. – № 2651. – P. 400-401.

121. Pasquini M. C. Impact of graft-versus-host disease on survival / M. C. Pasquini // *Best Practice and Research: Clinical Haematology*. – 2008. – Vol. 21. – № 2. – P. 193-204.
122. Pathophysiology of GvHD and other HSCT-related major complications / S. Ghimire, D. Weber, E. Mavin [et al.] // *Frontiers in Immunology*. – 2017. – Vol. 8. – № MAR. – P. 1-11.
123. Patterns and kinetics of T-cell chimerism after allo transplant with alemtuzumab-based conditioning: Mixed chimerism protects from GVHD, but does not portend disease recurrence / K. Van Besien, A. Dew, S. Lin [et al.] // *Leukemia and Lymphoma*. – 2009. – Vol. 50. – № 11. – P. 1809-1817.
124. Penhale W. J. Thyroiditis in T cell-depleted rats. Influence of strain, radiation dose, adjuvants and antilymphocyte serum. / W. J. Penhale, A. Farmer, W. J. Irvine // *Clinical and experimental immunology*. – 1975. – Vol. 21. – № 3. – P. 362-375.
125. Phase III study comparing tacrolimus (FK506) with cyclosporine for graft-versus-host disease prophylaxis after allogeneic bone marrow transplantation / A. Hiraoka, Y. Ohashi, S. Okamoto [et al.] // *Bone Marrow Transplantation*. – 2001. – Vol. 28. – № 2. – P. 181-185.
126. Phenotypic Complexity of the Human Regulatory T Cell Compartment Revealed by Mass Cytometry / G. M. Mason, K. Lowe, R. Melchiotti [et al.] // *The Journal of Immunology*. – 2015. – Vol. 195. – № 5. – P. 2030-2037.
127. Polyclonal Anti-T-Cell Therapy for Type 1 Diabetes Mellitus of Recent Onset / F. Saudek, T. Havrdova, P. Boucek [et al.] // *The Review of Diabetic Studies*. – 2004. – Vol. 1. – № 2. – P. 80-80.
128. Post-transplant high-dose cyclophosphamide for the prevention of graft-versus-host disease / A. S. Al-Homsi, T. S. Roy, K. Cole [et al.] // *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. – 2015. – Vol. 21. – № 4. – P. 604-611.
129. Post-transplant T cell chimerism predicts graft versus host disease but not disease relapse in patients undergoing an alemtuzumab based reduced intensity conditioned allogeneic transplant / E. Nikolousis, S. Robinson, S. Nagra [et al.] // *Leukemia Research*. – 2013. – Vol. 37. – № 5. – P. 561-565.

130. Post-Transplantation Cyclophosphamide Following Busulfan and Fludarabine Myeloablative Conditioning Prevents Severe Acute and Chronic Graft-Versus-Host Disease and Minimizes Duration Of Immunosuppression: Results Of a Multi-Institutional Trial In Patients / C. G. Kanakry, P. O'Donnell, T. Furlong [et al.] // *Blood*. – 2013. – Vol. 122. – № 21. – P. 3310-3310.
131. Posttransplantation cyclophosphamide prevents graft-versus-host disease by inducing alloreactive T cell dysfunction and suppression / L. P. Wachsmuth, M. T. Patterson, M. A. Eckhaus [et al.] // *Journal of Clinical Investigation*. – 2019. – Vol. 129. – № 6. – P. 2357-2373.
132. Powell J. D. The Mammalian Target of Rapamycin: Linking T Cell Differentiation, Function, and Metabolism / J. D. Powell, G. M. Delgoffe // *Immunity*. – 2010. – Vol. 33. – № 3. – P. 301-311.
133. Powrie F. Subsets of rat CD4⁺ T cells defined by their differential expression of variants of the CD45 antigen: Developmental relationships and in vitro and in vivo functions / F. Powrie, D. Mason // *Current Topics in Microbiology and Immunology*. – 1990. – Vol. 159. – P. 79-96.
134. Profound Depletion of Host Conventional Dendritic Cells, Plasmacytoid Dendritic Cells, and B Cells Does Not Prevent Graft-versus-Host Disease Induction / H. Li, A. J. Demetris, J. McNiff [et al.] // *The Journal of Immunology*. – 2012. – Vol. 188. – № 8. – P. 3804-3811.
135. Prospective study of rabbit antithymocyte globulin and cyclosporine for aplastic anemia from the EBMT Severe Aplastic Anaemia Working Party / J. C. Marsh, A. Bacigalupo, H. Schrezenmeier [et al.] // *Blood*. – 2012. – Vol. 119. – № 23. – P. 5391-5396.
136. Quantitative analysis of chimerism after allogeneic stem cell transplantation by PCR amplification of microsatellite markers and capillary electrophoresis with fluorescence detection: The Geneva experience / Y. Chalandon, S. Vischer, C. Helg [et al.] // *Leukemia*. – 2003. – Vol. 17. – № 1. – P. 228-231.
137. Quantitative assessment of hematopoietic chimerism after bone marrow transplantation by real-time quantitative polymerase chain reaction / M. Alizadeh, M.

- Bernard, B. Danic [et al.] // *Blood*. – 2002. – Vol. 99. – № 12.
138. Rabbit ATG but Not Horse ATG Promotes Expansion of Functional CD4⁺CD25^{high}FoxP3 Regulatory T Cells In Vitro. / X. Feng, E. E. Solomou, K. Keyvanfar [et al.] // *Blood*. – 2007. – Vol. 110. – № 11. – P. 2312-2312.
139. Real-time quantitative Y chromosome-specific PCR (QYCS-PCR) for monitoring hematopoietic chimerism after sex-mismatched allogeneic stem cell transplantation / B. Fehse, A. Chukhlovin, K. Köhlcke [et al.] // *Journal of Hematotherapy and Stem Cell Research*. – 2001. – Vol. 10. – № 3. – P. 419-425.
140. Recipient nonhematopoietic antigen-presenting cells are sufficient to induce lethal acute graft-versus-host disease / M. Koyama, R. D. Kuns, S. D. Olver [et al.] // *Nature Medicine*. – 2012. – Vol. 18. – № 1. – P. 135-142.
141. Reconstitution and clinical significance of T cell subsets in the early stage after related HLA-mismatched peripheral blood hematopoietic SCT without T-cell depletion in vitro / N. Pang, X. Duan, M. Jiang [et al.] // *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*. – 2015. – Vol. 8. – № 8. – P. 8892-8901.
142. Reduced Mortality after Allogeneic Hematopoietic-Cell Transplantation / T. A. Gooley, J. W. Chien, S. A. Pergam [et al.] // *New England Journal of Medicine*. – 2010. – Vol. 363. – № 22. – P. 2091-2101.
143. Regulatory T-cell suppressor program co-opts transcription factor IRF4 to control TH2 responses / Y. Zheng, A. Chaudhry, A. Kas [et al.] // *Nature*. – 2009. – Vol. 458. – № 7236. – P. 351-356.
144. Regulatory T-cells in the graft and the risk of acute graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation / D. Wolf, A. M. Wolf, D. Fong [et al.] // *Transplantation*. – 2007. – Vol. 83. – № 8. – P. 1107-1113.
145. Regulatory T cells: Recommendations to simplify the nomenclature / A. K. Abbas, C. Benoist, J. A. Bluestone [et al.] // *Nature Immunology*. – 2013. – Vol. 14. – № 4. – P. 307-308.
146. Relapse after Allogeneic Stem Cell Transplantation of Acute Myelogenous Leukemia and Myelodysplastic Syndrome and the Importance of Second Cellular Therapy / C. Zuanelli Brambilla, S. M. Lobaugh, J. D. Ruiz [et al.] // *Transplantation and*

Cellular Therapy. – 2021. – Vol. 27. – № 9.

147. Riddell S. R. The Graft-versus-Leukemia Effect-Breaking the Black Box Open / S. R. Riddell // *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. – 2008. – Vol. 14. – № 1 SUPPL. – P. 2-3.

148. Risk factors for acute graft-versus-host disease in histocompatible donor bone marrow transplantation / D. Weisdorf, R. Hakke, B. Blazar [et al.] // *Transplantation*. – 1991. – Vol. 51. – № 6. – P. 1197-1203.

149. Risk factors for acute GVHD and survival after hematopoietic cell transplantation / M. Jagasia, M. Arora, M. E. D. Flowers [et al.] // *Blood*. – 2012. – Vol. 119. – № 1. – P. 296-307.

150. Role of naive-derived T memory stem cells in T-cell reconstitution following allogeneic transplantation / A. Roberto, L. Castagna, V. Zanon [et al.] // *Blood*. – 2015. – Vol. 125. – № 18. – P. 2855-2864.

151. Sakaguchi S. Study on cellular events in post-thymectomy autoimmune oophoritis in mice: II. Requirement of lyt-1 cells in normal female mice for the prevention of oophoritis / S. Sakaguchi, T. Takahashi, Y. Nishizuka // *Journal of Experimental Medicine*. – 1982. – Vol. 156. – № 6. – P. 1577-1586.

152. Sakaguchi S. Regulatory T cells - A brief history and perspective / S. Sakaguchi, K. Wing, M. Miyara // *European Journal of Immunology*. – 2007. – Vol. 37. – № SUPPL. 1. – P. 116-23.

153. Scheffold A. Regulation of CD4+CD25+ regulatory T cell activity: It takes (IL-)two to tango / A. Scheffold, J. Hühn, T. Höfer // *European Journal of Immunology*. – 2005. – Vol. 35. – № 5. – P. 1336-41.

154. Scheinberg P. How I treat acquired aplastic anemia / P. Scheinberg, N. S. Young // *Blood*. – 2012. – Vol. 120. – № 6. – P. 1185-1196.

155. Schmidt A. Molecular mechanisms of treg-mediated cell suppression / A. Schmidt, N. Oberle, P. H. Krammer // *Frontiers in Immunology*. – 2012. – Vol. 3. – № MAR. – P. 1-20.

156. Schornagel J. H. The clinical pharmacology of methotrexate / J. H. Schornagel, J. G. McVie // *Cancer Treatment Reviews*. – 1983. – Vol. 10. – № 1. – P. 53-75.

157. Second allograft for hematologic relapse of acute leukemia after first allogeneic stem-cell transplantation from related and unrelated donors: The role of donor change / M. Christopeit, O. Kuss, J. Finke [et al.] // *Journal of Clinical Oncology*. – 2013. – Vol. 31. – № 26. – P. 3259-3271.
158. Sequential monitoring of chimerism and detection of minimal residual disease after allogeneic blood stem cell transplantation (BSCT) using multiplex PCR amplification of short tandem repeat-markers / C. Thiede, M. Bornhäuser, U. Oelschlägel [et al.] // *Leukemia*. – 2001. – Vol. 15. – № 2. – P. 293-302.
159. Servais S. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) after reduced intensity conditioning / S. Servais, F. Baron, Y. Beguin // *Transfusion and Apheresis Science*. – 2011. – Vol. 44. – № 2. – P. 205-210.
160. Shevach E. M. Mechanisms of Foxp3+ T Regulatory Cell-Mediated Suppression / E. M. Shevach // *Immunity*. – 2009. – Vol. 30. – № 5. – P. 636-645.
161. Short tandem repeats (STRS) as biomarkers for the quantitative follow-up of chimerism after stem cell transplantation: Methodological considerations and clinical application / A. Navarro-Bailón, D. Carbonell, A. Escudero [et al.] // *Genes*. – 2020. – Vol. 11. – № 9. – P. 1-18.
162. Significant Risk of Graft-versus-Host Disease with Exposure to Checkpoint Inhibitors before and after Allogeneic Transplantation / A. Ijaz, A. Y. Khan, S. U. Malik [et al.] // *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. – 2019. – Vol. 25. – № 1. – P. 94-99.
163. Stability of the regulatory T cell lineage in vivo / Y. P. Rubtsov, R. E. Niec, S. Josefowicz [et al.] // *Science*. – 2010. – Vol. 329. – № 5999. – P. 1667-1671.
164. Standard graft-versus-host disease prophylaxis with or without anti-T-cell globulin in haematopoietic cell transplantation from matched unrelated donors: a randomised, open-label, multicentre phase 3 trial / J. Finke, W. A. Bethge, C. Schmoor [et al.] // *The Lancet Oncology*. – 2009. – Vol. 10. – № 9. – P. 855-864.
165. Starr T. K. Positive and negative selection of T cells / T. K. Starr, S. C. Jameson, K. A. Hogquist // *Annual Review of Immunology*. – 2003. – Vol. 21. – P. 139-176.
166. Steroid-refractory acute GVHD: Predictors and outcomes / J. R. Westin, R. M.

Saliba, M. De Lima [et al.] // *Advances in Hematology*. – 2011. – Vol. 2011.

167. Storb R. Should methotrexate plus calcineurin inhibitors be considered standard of care for prophylaxis of acute graft-versus-host disease? / R. Storb, J. H. Antin, C. Cutler // *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*. – 2010. – Vol. 16. – № 1 Suppl. – P. 18-27.

168. Storb R. Treatment of established human graft versus host disease by antithymocyte globulin / R. Storb, E. Gluckman, E. D. Thomas // *Blood*. – 1974. – Vol. 44. – № 1. – P. 57-75.

169. Strauss G. Induction of apoptosis and modulation of activation and effector function in T cells by immunosuppressive drugs / G. Strauss, W. Osen, K. M. Debatin // *Clinical and Experimental Immunology*. – 2002. – Vol. 128. – № 2. – P. 255-266.

170. Strober S. Use of hematopoietic cell transplants to achieve tolerance in patients with solid organ transplants / S. Strober // *Blood*. – 2016. – Vol. 127. – № 12. – P. 1539-1543.

171. Surh C. D. T-cell apoptosis detected in situ during positive and negative selection in the thymus / C. D. Surh, J. Sprent // *Nature*. – 1994. – Vol. 372. – № 6501. – P. 100-103.

172. T regulatory cells and transplantation tolerance / V. S. Gorantla, S. Schneeberger, G. Brandacher [et al.] // *Transplantation Reviews*. – 2010. – Vol. 24. – № 3. – P. 147-159.

173. Tacrolimus instead of cyclosporine used for prophylaxis against graft-versus-host disease improves outcome after hematopoietic stem cell transplantation from unrelated donors, but not from HLA-identical sibling donors: A nationwide survey conducted in Ja / M. Yanada, N. Emi, T. Naoe [et al.] // *Bone Marrow Transplantation*. – 2004. – Vol. 34. – № 4. – P. 331-337.

174. Takaba H. The Mechanisms of T Cell Selection in the Thymus / H. Takaba, H. Takayanagi // *Trends in Immunology*. – 2017. – Vol. 38. – № 11. – P. 805-816.

175. Taylor P. A. The infusion of ex vivo activated and expanded CD4 +CD25 + immune regulatory cells inhibits graft-versus-host disease lethality / P. A. Taylor, C. J. Lees, B. R. Blazar // *Blood*. – 2002. – Vol. 99. – № 10. – P. 3493-3499.

176. TGF- β 1 maintains suppressor function and Foxp3 expression in CD4 +CD25+ regulatory T cells / J. C. Marie, J. J. Letterio, M. Gavin, A. Y. Rudensky // *Journal of Experimental Medicine*. – 2005. – Vol. 201. – № 7. – P. 1061-1067.
177. The Biology of T Regulatory Type 1 Cells and Their Therapeutic Application in Immune-Mediated Diseases / M. G. Roncarolo, S. Gregori, R. Bacchetta [et al.] // *Immunity*. – 2018. – Vol. 49. – № 6. – P. 1004-1019.
178. The impact of regulatory T cells on T-cell immunity following hematopoietic cell transplantation / V. H. Nguyen, S. Shashidhar, D. S. Chang [et al.] // *Blood*. – 2008. – Vol. 111. – № 2. – P. 945-953.
179. The lifestyle of naturally occurring CD4+CD25 +Foxp3+ regulatory T cells / E. M. Shevach, R. A. DiPaolo, J. Andersson [et al.] // *Immunological Reviews*. – 2006. – Vol. 212. – P. 60-73.
180. The mTOR Kinase Differentially Regulates Effector and Regulatory T Cell Lineage Commitment / G. M. Delgoffe, T. P. Kole, Y. Zheng [et al.] // *Immunity*. – 2009. – Vol. 30. – № 6. – P. 832-844.
181. The use of skin grafting to distinguish between monozygotic and dizygotic twins in cattle / D. Anderson, R. E. Billingham, G. H. Lampkin, P. B. Medawar // *Heredity*. – 1951. – Vol. 5. – № 3. – P. 379-397.
182. Thol F. Treatment of Relapsed Acute Myeloid Leukemia / F. Thol, A. Ganser // *Current Treatment Options in Oncology*. – 2020. – Vol. 21. – № 8. – P. 1-11.
183. Tissue resident regulatory T cells: Novel therapeutic targets for human disease / X. Zhou, J. Tang, H. Cao [et al.] // *Cellular and Molecular Immunology*. – 2015. – Vol. 12. – № 5. – P. 543-552.
184. Transplantation tolerance: Clinical potential of regulatory T cells / Y. D. Muller, J. D. Seebach, L. H. Bühler [et al.] // *Self/Nonsel - Immune Recognition and Signaling*. – 2011. – Vol. 2. – № 1. – P. 26-34.
185. Transplantation tolerance through hematopoietic chimerism: Progress and challenges for clinical translation / B. Mahr, N. Granofszky, M. Muckenhuber, T. Wekerle // *Frontiers in Immunology*. – 2017. – Vol. 8. – № DEC. – P. 1-14.
186. Treatment of Murine Leukaemia with X Rays and Homologous Bone Marrow / D.

W. H. Barnes, M. J. Corp, J. F. Louth, F. E. Neal // *British Medical Journal*. – 1956. – Vol. 2. – № 4993. – P. 626.

187. Tumor Evasion of the Immune System by Converting CD4 + CD25 – T Cells into CD4 + CD25 + T Regulatory Cells: Role of Tumor-Derived TGF- β / V. C. Liu, L. Y. Wong, T. Jang [et al.] // *The Journal of Immunology*. – 2007. – Vol. 178. – № 5. – P. 2883-2892.

188. Use of polymerase chain reaction-detected sequence polymorphisms to document engraftment following allogeneic bone marrow transplantation / M. S. Roth, J. H. Antin, E. L. Bingham, D. Ginsburg // *Transplantation*. – 1990. – Vol. 49. – № 4. – P. 714-720.

189. Validation of chimerism in pediatric recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) a comparison between two methods: Real-time PCR (qPCR) vs. variable number tandem repeats PCR (VNTR PCR) / M. Kletzel, W. Huang, M. Olszewski, S. Khan // *Chimerism*. – 2013. – Vol. 4. – № 1. – P. 1-8.

190. Villarroel M. C. Mycophenolate mofetil: An update / M. C. Villarroel, M. Hidalgo, A. Jimeno // *Drugs of Today*. – 2009. – Vol. 45. – № 7. – P. 521-532.

191. Wood K. J. Regulatory T cells in transplantation tolerance / K. J. Wood, S. Sakaguchi // *Nature Reviews Immunology*. – 2003. – Vol. 3. – № 3. – P. 199-210.

192. Zeiser R. Acute Graft-versus-Host Disease Biology, Prevention and Therapy HHS Public Access / R. Zeiser, B. R. Blazar // *N Engl J Med*. – 2017. – Vol. 377. – № 22. – P. 2167-2179.

193. Zhu Hua Z. F. High Level of CD4+CD25+CD127- Treg Cells in Donor Graft is Associated with a Low Risk of aGVHD after allo-HSCT for Children with Hematologic Malignancies / Z. F. Zhu Hua // *Journal of Cell Science & Therapy*. – 2013. – Vol. 04. – № 03. – P. 1-5.

194. Ziegler S. F. FOXP3: Of mice and men / S. F. Ziegler // *Annual Review of Immunology*. – 2006. – Vol. 24. – P. 209-226.