

**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

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание учёной степени  
кандидата медицинских наук

Москва – 2023

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Научные руководители:**

доктор биологических наук  
кандидат медицинских наук

**Судариков Андрей Борисович**  
**Дроков Михаил Юрьевич**

**Официальные оппоненты:**

**Моисеев Иван Сергеевич** – доктор медицинских наук, доцент, заместитель директора по научной работе научно-исследовательского института детской онкологии, гематологии и трансплантологии имени Р.М. Горбачевой Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета имени академика И.П. Павлова.

**Балашов Дмитрий Николаевич** – доктор медицинских наук, заведующий отделением трансплантации гемопоэтических стволовых клеток №2, ведущий научный сотрудник отдела оптимизации лечения и профилактики осложнений трансплантации гемопоэтических стволовых клеток федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева» Минздрава России.

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита состоится «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2023 года в \_\_\_\_\_ часов на заседании диссертационного совета 21.1.023.01 (Д 208.135.01) при федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 125167, г. Москва, Новый Зыковский проезд, 4.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации и на сайте [www.blood.ru](http://www.blood.ru)

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2023 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
кандидат медицинских наук

**Сысоева Елена Павловна**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность исследования

Трансплантация 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.

Главными из нерешенных проблем, приводящими к инвалидизации и смерти после алло-ТГСК остаются острая реакция «трансплантат против хозяина» (oРТПХ), рецидив основного заболевания. В последние годы отмечается уменьшение развития oРТПХ, что вероятно связано с улучшением режимов профилактики. По данным литературы приблизительно у 50 % пациентов после алло-ТГСК развивается oРТПХ, в свою очередь oРТПХ III–IV степени констатируется приблизительно у 10 % больных [Gooley T., 2010]. Рецидив заболевания после алло-ТГСК у больных с диагнозом острый лейкоз развивается у 30–40 % пациентов и остается одной из ведущих причин гибели пациентов [Barrett A., 2010; Thol F., 2020].

При алло-ТГСК важную роль играет иммунологическая толерантность [Gorantla V., 2010]. 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 [Edinger M., 2003; Mahr B., 2017; Strober S., 2016].

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 [Cohen J.L., 2006]. Донорские Т-клетки на ранних этапах облегчают приживление гемопоэтических стволовых клеток [Chen W., 2010; Emerson S.G., 1987], а также защищают реципиентов от оппортунистических инфекций и выполняют задачу по элиминации остаточных опухолевых клеток реципиента через так называемый эффект «трансплантат против лейкоза» [Reddy P., 2005; Riddell S.R., 2008].

Среди Т-клеток присутствуют и те, которые регулируют развитие и силу аллоиммунной реакции после алло-ТГСК. Т-регуляторные клетки (Т-рег) – это субпопуляция Т-клеток хелперов, осуществляющая регуляцию иммунного ответа [Sakaguchi S., 2007; Shevach E.M., 2006]. Данная популяция клеток контролирует развитие оРТПХ при сохранении эффекта реакции «трансплантат против лейкоза» (РТПЛ) [Edinger M., 2003].

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.

### **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 (ИСТ) 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**

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 ИСТ 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 Т-клеток 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 ИСТ.

## **Внедрение в практику**

Полученные результаты используются в ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России при лечении пациентов с заболеваниями системы крови и могут применяться в отделениях трансплантации костного мозга и гемопоэтических стволовых клеток в других клиниках.

## **Публикации**

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.

## **Апробация**

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, 2018 г.), 9-ом ежегодном собрании Общества гематологической онкологии (SOHO 2021 г.).

## **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.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Характеристика больных

В проспективное исследование включено 42 пациента с острыми лейкозами после алло-ТГСК за период с 2016 по 2018 гг. В ретроспективную часть работы было включено 260 больных с острым лейкозом, которым алло-ТГСК была выполнена в период с 2014 по 2020 гг. У данной группы пациентов оценивалась вероятность развития оРТПХ в зависимости от режимов ИСТ.

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.). Дизайн исследования отображен на рисунке 1.

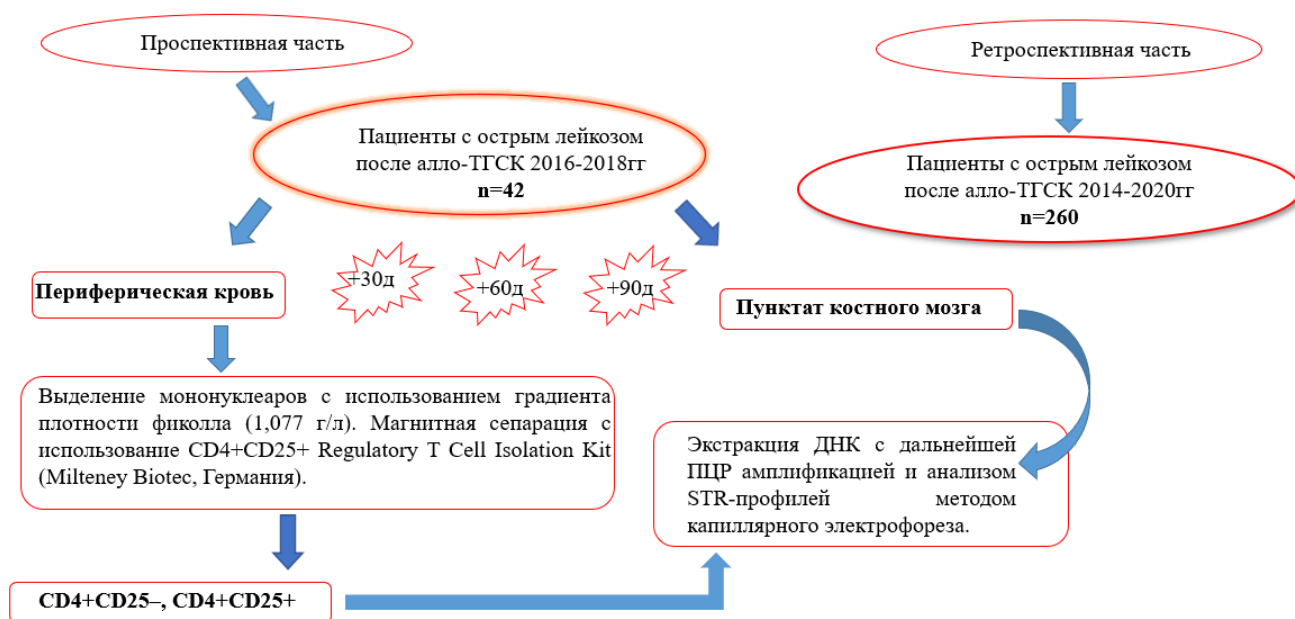


Рисунок 1 – Дизайн исследования

Медиана возраста пациентов, включенных в проспективную часть работы, составила 35,5 лет (19–66). Из них женщин – 23 человека, 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.

Всем пациентам, включенным в исследование, перед проведением алло-ТГСК было выполнено предтрансплантационное кондиционирование. Миелоаблативный режим (MAC) использовали у 16 пациентов, режим пониженной интенсивности (RIC) у 26 больных.

Трансплантация аллогенных гемопоэтических стволовых клеток 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 в качестве источника трансплантата были использованы у 18 пациентов, костный мозг у 24 пациентов.

Все пациенты, включенные в исследование, получали ИСТ с целью профилактики развития РТПХ. По виду ИСТ 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 (без включения лАТГ и ПТ-ЦФ в режим профилактики, сюда также был отнесен препарат кроличьего АТГ (кАТГ)). 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.

### **Методы исследования**

Первый этап исследования проводили в научно-клинической лаборатории иммунофенотипирования клеток крови и костного мозга (заведующая лабораторией, д.м.н. Гальцева И.В.).

У пациентов в контрольные сроки на +30, +60, +90 дни после алло-ТГСК выполняли забор периферической крови в пробирку с ЭДТА. В дальнейшем из периферической крови выделяли фракцию мононуклеаров с использованием градиента плотности фикола (1,077 г/л) [Böyum A., 1968 г.], затем производили подсчет клеток на



гематологическом анализаторе. Далее проводилась магнитная сепарация с использованием CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Regulatory T Cell Isolation Kit (Milteney Biotec, Германия). Полученные на предыдущем этапе клетки подвергались негативной селекции (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>), позитивной селекции (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>).

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<sup>+</sup>. Чистота в итоговой фракции CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> клеток составляла 85,95 % (71,6–98,5 %). Учитывая малое количество целевых клеток, рутинный контроль чистоты CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> клеток не выполнялся. Однако по данным проведенного на предварительных этапах исследования и информации от производителя ожидаемая чистота составляет более 80 %.

Второй этап работы проводился в лаборатории молекулярной гематологии (заведующий лабораторией, д.б.н. Судариков А.Б.).

Из полученной клеточной суспензии CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup>, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, а также пунктата костного мозга проводилась экстракция дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) с использованием наборов для выделения ДНК/РНК «Ампли Прайм РИБО-преп» согласно инструкции.

Предварительно концентрацию ДНК измеряли на спектрофотометре Genesys 10 UV (Thermo Scientific). Значение концентрации ДНК в исходном растворе (мкг/мкл) находили, умножая значение поглощения при длине волны 260 нм на K=50. В случае селектированных образцов с низкой клеточностью (10-40 тысяч клеток в образце) определение концентрации ДНК не проводили, избегая расхода ДНК.

Аmplification проводилась при помощи лиофилизированного мультиплексного набора для амплификации 19 полиморфных STR-маркеров и локуса амелогенина X, амелогенина Y человека (Cordis plus, ГОРДИЗ, Москва). Последующий фрагментный анализ был выполнен на генетическом анализаторе ABI 3130 (Thermofisher Scientific, USA).

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.

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).

### **Статистический анализ 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 сопряженности использовался критерий хи-квадрат, для таблиц 2x2 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 перцентеля  $\pm 1,5$  величины

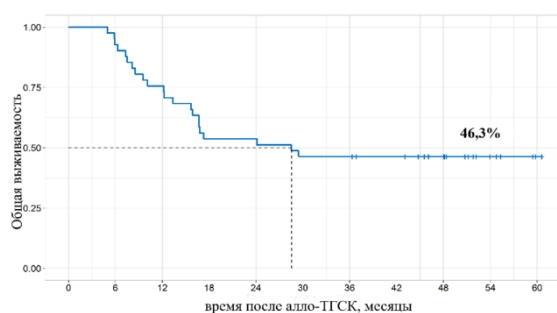
межквартильного размаха. Точками на графиках отображены «выбросы» – значения, попадающие в интервал 1,5–3-х величин межквартильного размаха. Для оценки корреляции был использован коэффициент Спирмана, а для оценки силы связи была использована шкала Чеддока: 0–0,3 очень слабая, 0,3–0,5 слабая, 0,5–0,7 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.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### Общая и безрецидивная выживаемость пациентов, включенных в исследование

Общая выживаемость (ОВ) и безрецидивная выживаемость (БРВ) в течение 60 месяцев в нашей исследовательской работе составила 46,3 % (рисунок 2, А – Б)

А



Б

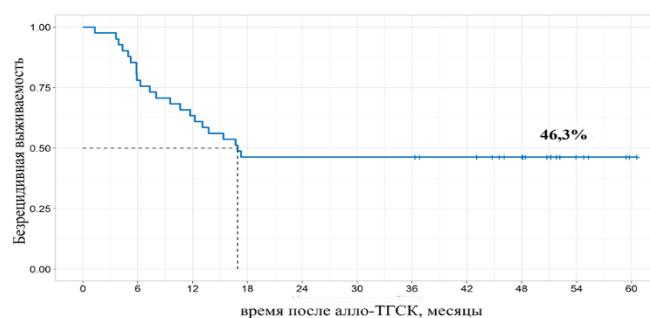


Рисунок 2 – Результаты алло-ТГСК у пациентов, включенных в исследование. А – 5-летняя ОВ. Б – 5-летняя БРВ.

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

Мы проанализировали химеризм в костном мозге, Т-рег и Т-кон периферической крови на 30, 60, 90 дни после алло-ТГСК (рисунок 3). При анализе на всех сроках наблюдения были получены статистически достоверные различия в проценте клеток с хозяи́нским генотипом между исследуемыми клетками костного мозга и исследуемыми популяциями периферической крови.

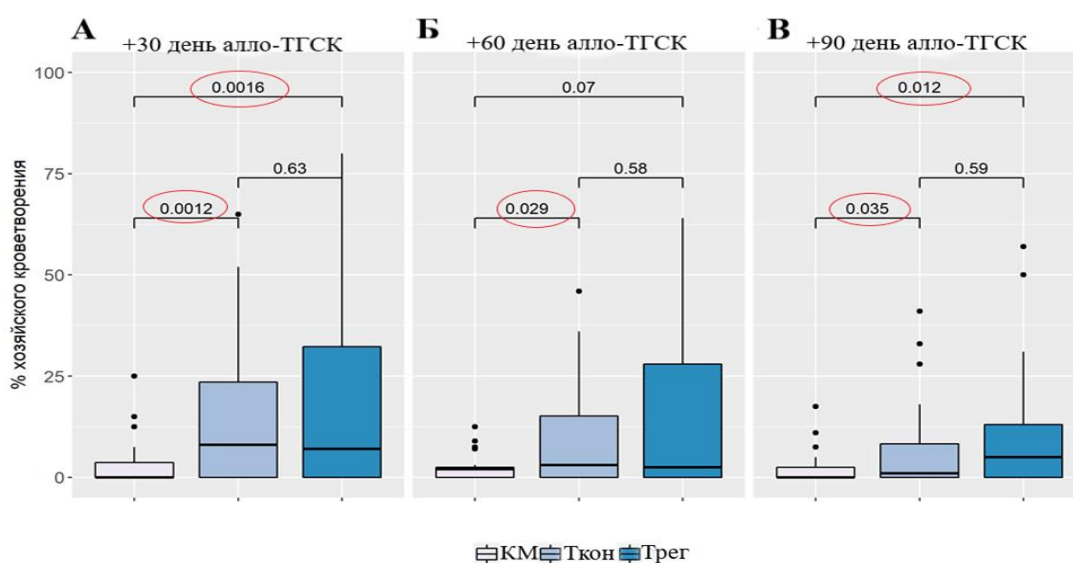


Рисунок 3 – Сравнение химеризма в пунктате костного мозга и среди Т-кон и Т-рег периферической крови в зависимости от сроков после алло-ТГСК. А – химеризм на сроке +30 день алло-ТГСК. Б – химеризм на сроке +60 день алло-ТГСК. В – химеризм на сроке +90 день алло-ТГСК.

### Характеристика химеризма в костном мозге, $CD4^+CD25^+$ клетках, $CD4^+ CD25^-$ клетках в зависимости от развития рецидива после трансплантации

В работе проведен анализ ассоциации химеризма с рецидивом в клетках костного мозга и субпопуляциях Т-хелперов периферической крови (Т-рег, Т-кон) на 30, 60, 90 дни алло-ТГСК (Рисунок 4).

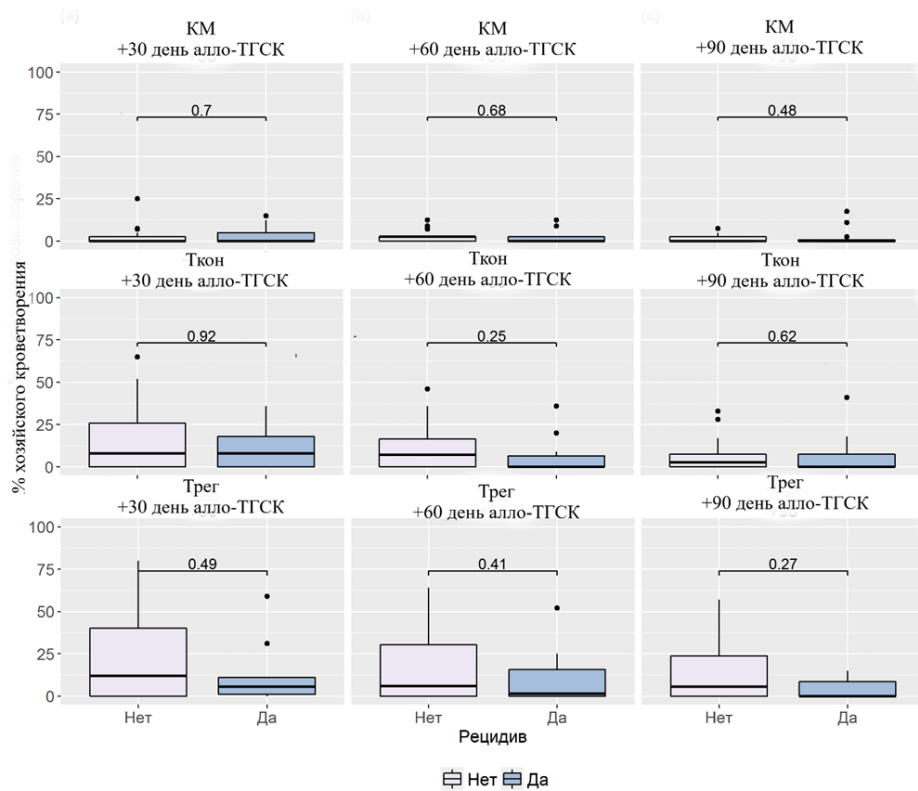


Рисунок 4 – Химеризм в пунктате костного мозга и среди Т-кон и Т-рег периферической крови в зависимости от развития рецидива заболевания. А – химеризм на сроке +30 день алло-ТГСК. Б – химеризм на сроке +60 день алло-ТГСК. В – химеризм на сроке +90 день алло-ТГСК.

Мы не получили статистически значимых различий в проценте клеток с хозяйским генотипом, что представляется логичным, учитывая тот факт, что исследование проводилось в популяции, которая напрямую не реализует Т-клеточный ответ против опухоли.

#### Характеристика химеризма в костном мозге, $CD4^+$ $CD25^-$ клетках, $CD4^+CD25^+$ клетках в зависимости от режима иммуносупрессивной терапии

Мы оценили химеризм среди клеток костного мозга и периферической крови (Т-рег и Т-кон) в зависимости от режима ИСТ на 30, 60, 90 дни после алло-ТГСК (Рисунок 5). Пациенты были разделены на 3 группы в зависимости от режима ИСТ.

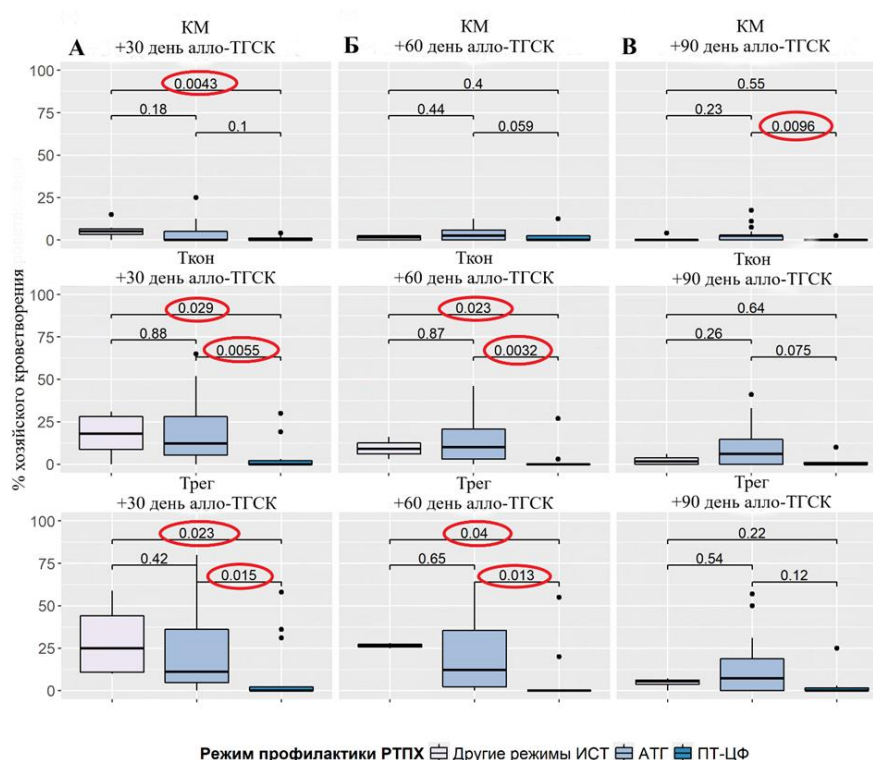


Рисунок 5 – Химеризм в пунктате костного мозга и среди Т-кон и Т-рег периферической крови в зависимости от режима ИСТ. А – химеризм на сроке +30 день алло-ТГСК. Б – химеризм на сроке +60 день алло-ТГСК. В – химеризм на сроке +90 день алло-ТГСК.

Полученные данные свидетельствовали, что при применении лАТГ создаются предпосылки к развитию нестабильности химеризма в исследованных субпопуляциях Т-клеток (Т-рег и Т-кон), 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 гетерогенна. В дальнейшем полученные данные были использованы для оценки развития оРТГХ в различные сроки.

**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 оРТГХ после +90 дня, ассоциированная с началом

отмены ИСТ, которая обычно начинается в эти сроки. Мы провели анализ химеризма в зависимости от этого фактора (Рисунок 6).

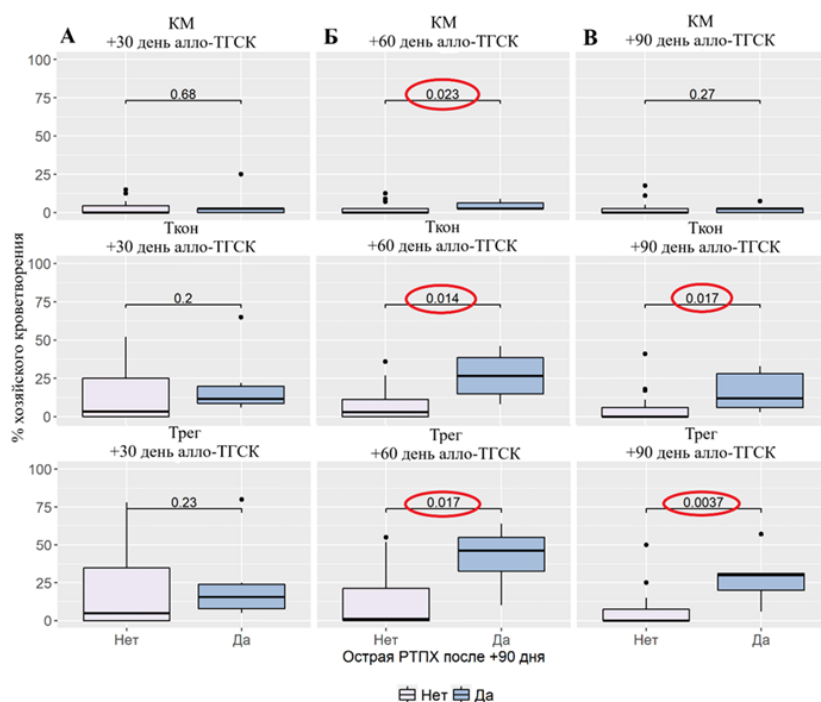


Рисунок 6 – Химеризм в пунктате костного мозга и среди Т-рег, Т-кон периферической крови в зависимости от развития оРТПХ, ассоциированной с отменой ИСТ. А – химеризм на сроке +30 день алло-ТГСК. Б – химеризм на сроке +60 день алло-ТГСК. В – химеризм на сроке +90 день алло-ТГСК.

Статистически значимые результаты были получены при сравнении ассоциации смешанного химеризма среди Т-кон, Т-рег на 60, 90 день алло-ТГСК на развитие индуцированной оРТПХ.

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 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 (Рисунок 7).

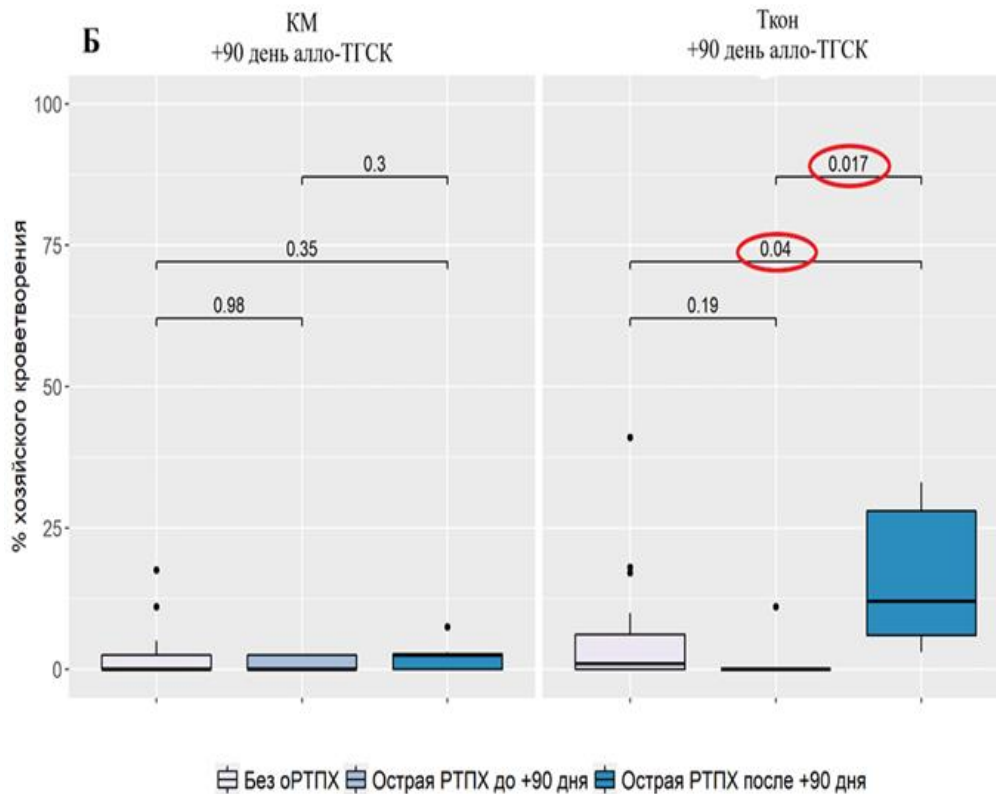
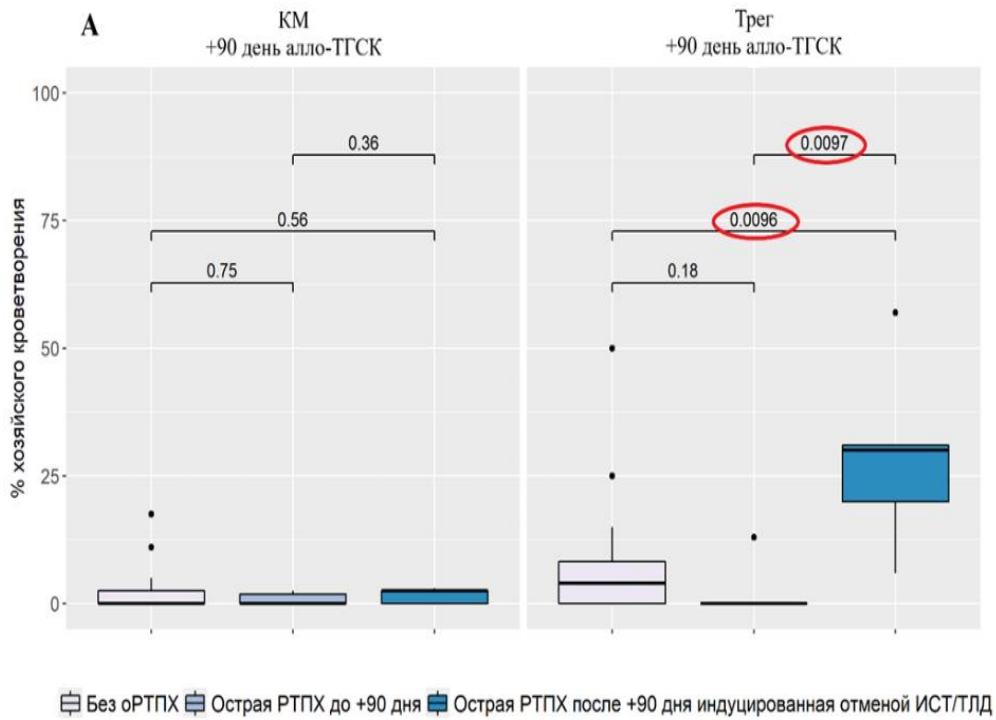


Рисунок 7 – Химеризм в пунктате костного мозга и среди Т-кон и Т-рег периферической крови в зависимости от развития индуцированной оРТПХ, ассоциированной с отменой ИСТ/трансфузии лимфоцитов донора. А – химеризм на сроке



+90 день алло-ТГСК в костном мозге, Т-рег. Б – химеризм на сроке +90 день алло-ТГСК в костном мозге, Т-кон.

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 оРТПХ до +90 дней алло-ТГСК в сравнении с индуцированной оРТПХ ( $p = 0,0097$ ). 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 ( $p = 0,017$ ).

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 8).

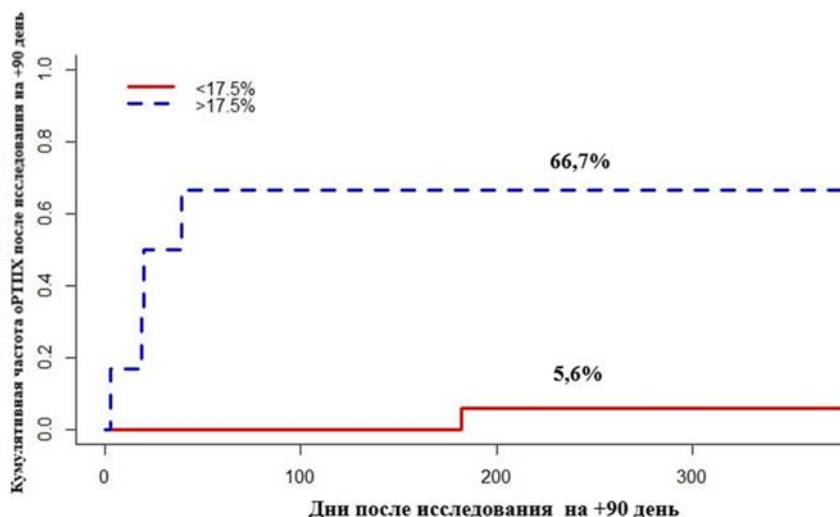


Рисунок 8 – Вероятность развития oRTPX II–IV степени в зависимости от химеризма в популяции CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> клеток периферической крови

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

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 ИСТ на фоне снижения числа адекватно функционирующих Т-рег ведет к развитию oRTPX.

**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 oRTPX,

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 клиническая характеристика приведена в таблице 1.

Таблица 1 – Клиническая характеристика пациентов, включенных в последующий анализ

Параметр	лАТГ, n = 128	ПТ-ЦФ +/- лАТГ, n = 132	p-значение
<b>Пол</b>			0,3
жен	71 (55 %)	64 (48 %)	
муж	57 (45 %)	68 (52 %)	
<b>Диагноз</b>			0,10
ОЛЛ	39 (30 %)	53 (40 %)	
ОМЛ	89 (70 %)	79 (60 %)	
<b>Вид кондиционирования</b>			0,014
MAC	24 (19 %)	11 (8 %)	
RIC	104 (81 %)	121 (92 %)	
<b>Трансплантат</b>			< 0,001
КМ	80 (62 %)	29 (22 %)	
СКК	48 (38 %)	103 (78 %)	
<b>Вид ТКМ</b>			< 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 %)	

На рисунке 9 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 % ( $p = 0,15$ ).

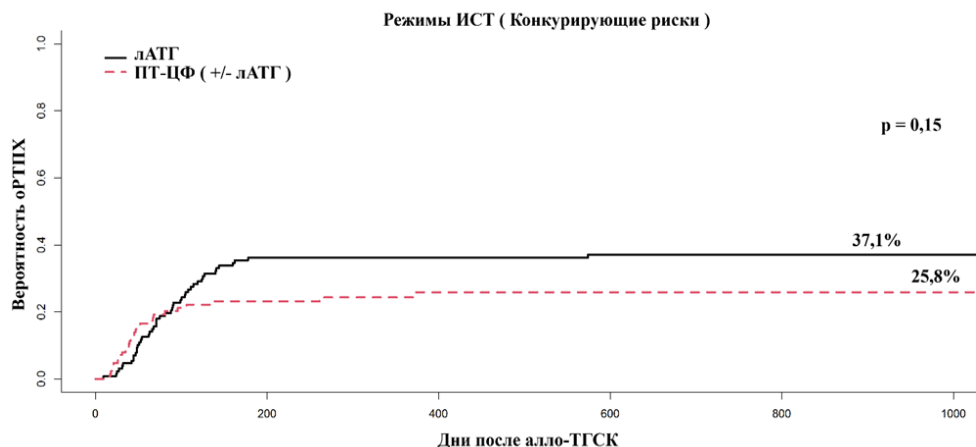


Рисунок 9 – Вероятность развития оРТПХ у пациентов, в зависимости от режима профилактики РТПХ

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

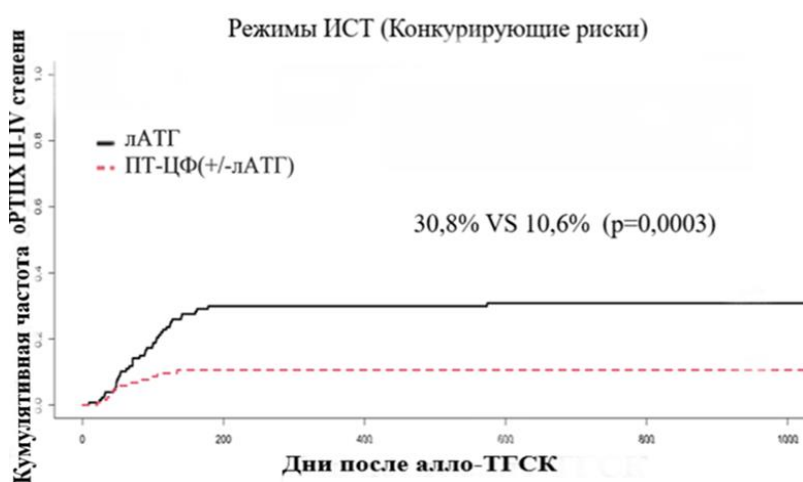


Рисунок 10 – Вероятность развития оРТПХ II – IV степени у пациентов, в зависимости режима профилактики РТПХ

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 11 отражена вероятность развития оРТПХ III–IV степени у пациентов, в зависимости от режима профилактики РТПХ.

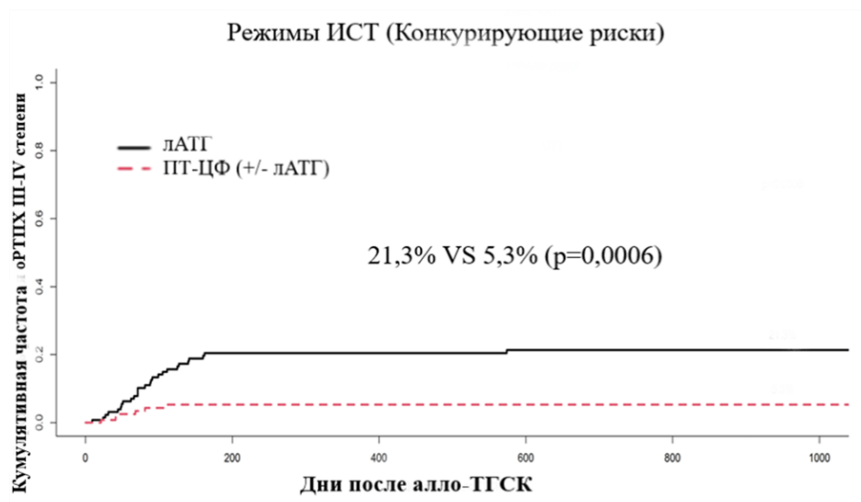


Рисунок 11 – Вероятность развития оРТПХ III–IV степени у пациентов, в зависимости от режима профилактики РТПХ

Полученные данные подтвердили механизм развития оРТПХ в группе с лАТГ, однако, для дополнительной проверки того, что при использовании лАТГ сроки наступления оРТПХ сдвинуты на более поздние, мы провели анализ сроков возникновения оРТПХ среди пациентов. На рисунке 12 видно, что медиана развития оРТПХ для группы с лАТГ составляет 84,5 дня (49– 114), для группы с ПТ-ЦФ – 46 дней (37 – 88,5) при этом различия были статистически значимыми ( $p = 0,0011$ ).

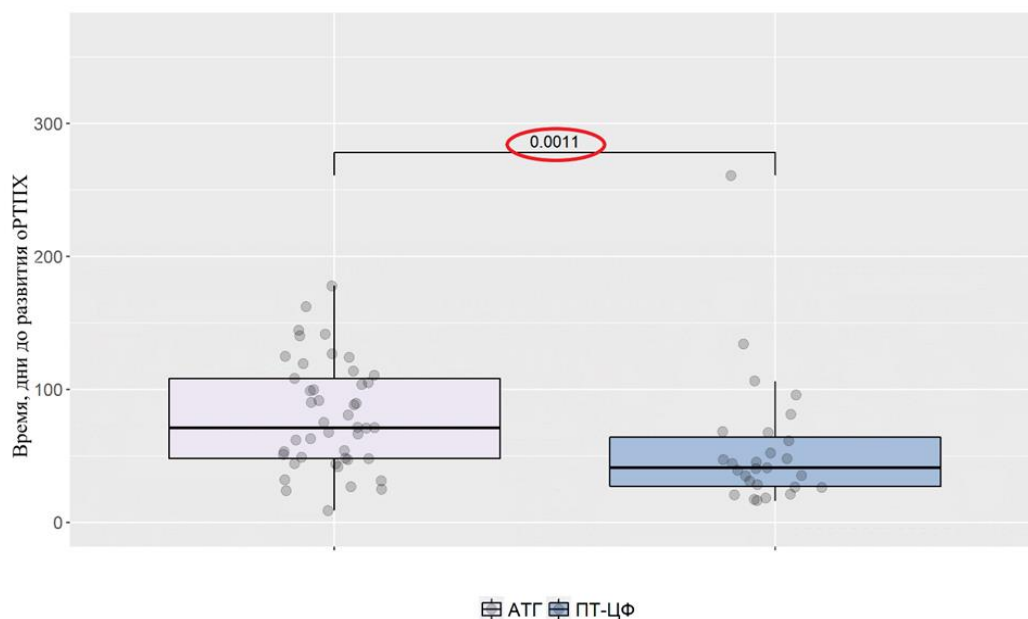


Рисунок 12 – Время развития oRTPX у пациентов с ИСТ лАТГ и ПТ-ЦФ

## 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, +60, +90 дни после 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 oRTPX. Вероятность развития поздней oRTPX значимо выше у пациентов, у которых хозяйский химеризм среди Т-рег клеток 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) параметров 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<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> клеток периферической крови может быть использован для прогнозирования развития поздней оРТПХ у реципиентов аллогенных гемопоэтических стволовых клеток.

### **СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

1. Дубняк Д.С. [и др.]. Мониторинг химеризма после трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток/ Дубняк Д.С., Рисинская Н.В., Дроков М.Ю., Судариков А.Б. // Трансплантология. – 2022. – Т.14. – № 4. – С. 488-499.

2. Дубняк Д.С. [и др.]. Расщепленный химеризм среди Т-регуляторных клеток у больных с острыми лейкозами после трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток/ Дубняк Д.С., Рисинская Н.В., Дроков М.Ю., Васильева В.А., Старикова О.С., Масликова У.В., Кольгаева Э.И., Давыдова Ю.О., Капранов Н.М., Гальцева И.В., Кузьмина Л.А., Судариков А.Б., Паровичникова Е.Н. // Гематология и трансфузиология. – 2022. – Т. 67. – № S2. – С. 106-107.

3. Dubnyak D. [и др.]. Influence of chimerism in T-regulatory cells on relapse rate in acute leukemia patients after all-HSCT/Dubnyak D., Risinskaya N., Drovkov M., Kapranov N., Davydova Ju., Kuzmina L., Vasilyeva V., Popova N., Mikhaltsova E., Galtseva I., Sudarikov A., Julhakyan H., Parovichnikova E., Savchenko V// Clinical Lymphoma, Myeloma and Leukemia. – 2021. – Т. 21. – № Suppl.1.– С. S214.

4. Михальцова Е.Д. [и др.]. Влияние режимов профилактики РТПХ на восстановление клеточного звена иммунной системы у пациентов после трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток/ Михальцова Е.Д., Попова Н.Н., Дроков М.Ю., Капранов Н.М., Давыдова Ю.О., Васильева В.А., Дубняк Д.С., Масликова У.В.,

Гальцева И.В., Кузьмина Л.А., Паровичникова Е.Н., Савченко В.Г. //Медицинская иммунология. – 2021. –Т. 23. – №5. – С. 1125-1136.

5. Омарова Ф.А. [и др.]. Влияние HLA-совместимости между реципиентом и донором на восстановление Т-клеточного звена иммунной системы у пациентов после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток/ Омарова Ф.А., Попова Н.Н., Давыдова Ю.О., Капранов Н.М., Дроков М.Ю., Старикова О.С., Масликова У.В., Конова З.В., Кольгаева Э.И., Михальцова Е.Д., Довыденко М.В., Королева О.М., Дмитрова А.А., Дубняк Д.С., Ахмедов М.И., Гармаш А.С., Никифорова К.А., Васильева В.А., Кузьмина Л.А., Гальцева И.В //Клеточная терапия и Трансплантация. – 2021. –Т. 10. – №3. – С. 59-61.

6. Дубняк Д.С. [и др.]. Сравнение эффективности лошадиного АТГ и посттрансплантационного циклофосфида к лимфодеплеции конвенциональных и регуляторных Т-клеток у пациентов с острыми лейкозами после кондиционирования в режиме пониженной интенсивности/ Дубняк Д.С., Рисинская Н.В., Дроков М.Ю., Давыдова Ю.О., Капранов Н.М., Кузьмина Л.А., Гальцева И.В., Сударикив А.Б., Паровичникова Е.Н., Савченко В.Г.//Гематология и трансфузиология. – 2020. –Т. 65. – №S1. – С. 142-143.

7. Дубняк Д.С. [и др.]. Влияние различных режимов профилактики на структуру острой реакции «трансплантат против хозяина» у пациентов после трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток/ Дубняк Д.С., Дроков М.Ю., Рисинская Н.В., Васильева В.А., Дмитрова А.А., Конова З.В., Попова Н.Н., Старикова О.С., Масликова У.В., Михальцова Е.Д., Ахмедов М.И., Довыденко М.В., Королева О.М., Омарова Ф.А., Кольгаева Э.И., Давыдова Ю.О., Капранов Н.М., Кузьмина Л.А., Гальцева И.В., Сударикив А.Б.//Клеточная Терапия и Трансплантация. – 2020. –Т. 9. – №3. – С. 67-69.

8. Дубняк Д.С. [и др.]. Связь смешанного химеризма в субпопуляции Т-регуляторных клеток с частотой рецидивов острых лейкозов после трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток/ Дубняк Д.С., Рисинская Н.В., Дроков М.Ю., Кострица Н.С., Давыдова Ю.О., Кузьмина Л.А., Капранов Н.М., Васильева В.А., Попова Н.Н., Михальцова Е.Д., Королева О.М., Конова З.В., Гальцева И.В., Сударикив А.Б., Паровичникова Е.Н., Савченко В.Г.// Гематология и трансфузиология. – 2018. –Т. 63. – №S1. – С. 22.



9. Drokov M.Y. [и др.]. Age affects GVHD rate but not overall survival in leukemia patients with posttransplant cyclophosphamide (PT-CY) and anti-thymocyte globulin (ATG) as GVHD prophylaxis/ Drokov M.Y., Kuzmina L.A., Popova N.N., Mikhaltsova E.D., Vasilyeva V.A., Koroleva O.M., Dubnyak D.S., Sidorova A.A., Usikova E.V., Konova Z.V., Dmitrova A.A., Parovichnikova E.N., Savchenko V.G.// Cellular Therapy and Transplantation. – 2018. – Т. 7. – №3. – С. 44-48.

10. Dubnyak D.S. [и др.]. Impact of mixed chimerism in T regulatory cells on relapse rate in acute leukemia patients after allo-HSCT/Dubnyak D.S., Risinskaya N.V., Drokov M.Yu., Kostritsa N., Davydova Yu.O., Kuzmina L.A., Kapranov N.M., Vasileva V.A., Popova N.N., Mikhaltsova E.D., Koroleva O.M., Sidorova A.A., Usikova E., Konova Z.V., Galtseva I.V., Sudarikov A.B., Parovichnikova E.N., Savchenko V.G.//HemaSphere. – 2018. –Т.2. – №S1. – С. 1080-1081.

11. Drokov M.Y. [и др.]. Level of granzyme B-positive T-regulatory cells a strong predictor biomarker of acute graft-versus-host disease after day +30 after allo-HSCT/ Drokov M.Y., Davydova J.O., Kuzmina L.A., Galtseva I.V., Kapranov N.M., Vasilyeva V.A., Dubnyak D.S., Koroleva O.M., Mikhaltsova E.D., Popova N.N., Parovichnikova E.N., Savchenko V.G.//Leukemia Research. – 2017. –Т.54. – С. 25-29.

12. Drokov M.Y. [и др.]. Post-transplant CY for GVHD prophylaxis in patients with advanced leukemia/ Drokov M.Yu., Vasileva V.A., Dubnyak D.S., Koroleva O.M., Mikhaltsova E.D., Popova N.N., Konova Z.V., Kuzmina L.A., Parovichnikova E.N., Savchenko V.G.// Annals of Hematology. – 2017. –Т.96. –№ S1. – С. s83.

13. Mikhaltsova E. [и др.]. Post-transplant high-dose cyclophosphamide affect T-cell reconstitution in bone marrow, but not in peripheral blood stem cells recipients/ Mikhaltsova E., Drokov M., Davydova J., Kuzmina L., Popova N., Dubnyak D., Vasilyeva V., Koroleva O., Konova Z., Kapranov N., Galtseva I., Parovichnikova E., Savchenko V.//Haematologica. – 2017. –Т.102. –№ S2. – С. 635.

14. Dubnyak D. [и др.]. Short-term chimerism in T-helper cell subsets after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation/Dubnyak D., Risinskaya N., Drokov M., Kostritsa N., Kuzmina L., Popova N., Mikhaltsova E., Vasilyeva V., Koroleva O., Konova Z., Fevrалеva I., Galtseva I., Davydova J., Kapranov N., Sudarikov A., Parovichnikova E., Savchenko V.//Haematologica. – 2017. –Т.102. –№ S2. – С. 861

15. Dubnyak D.S. [и др.]. Impact of post-transplant cyclophosphamide after hematopoietic stem cell transplantation on chimerism in T-regulatory cells//Dubnyak D.S., Risinskaya N.V., Drovkov M.Y., Kostritsa N.S., Davydova J.O., Kuzmina L.A., Vasilyeva V.A., Popova N.N., Mikhaltsova E.D., Koroleva O.M., Kapranov N.M., Konova Z.V., Galtseva I.V., Sudarikov A.B., Parovichnikova E.N., Savchenko V.G.//Cellular Therapy and Transplantation. – 2017 –Т.6. –№ 3. – С. 37-40.

### **СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ**

Алло-ТГСК– трансплантация аллогенных гемопоэтических стволовых клеток

АТГ– антитимоцитарный глобулин

БРВ – безрецидивная выживаемость

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ИСТ – иммуносупрессивная терапия

кАТГ – кроличий антитимоцитарного глобулина

лАТГ – лошадиный антитимоцитарный глобулин

КМ – костный мозг

ОВ – общая выживаемость

ОЛЛ – острый лимфобластный лейкоз

ОМЛ – острый миелобластный лейкоз

ОРТПХ – острая реакция «трансплантат против хозяина»

ПТ-ЦФ – посттрансплантационный циклофосфамид

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РТПХ – реакция «трансплантат против хозяина»

РТПЛ – реакция «трансплантат против лейкоза»

Т-кон – Т-конвенциональные клетки

Т-рег – Т-регуляторные клетки

CD – кластер дифференцировки

МАС – myeloablative conditioning (миелоаблативный режим кондиционирования)

RIC – reduced intensity conditioning (режим кондиционирования пониженной интенсивности)