

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ  
ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
«РЕСПУБЛИКАНСКИЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЦЕНТР  
ТРАНСФУЗИОЛОГИИ И МЕДИЦИНСКИХ БИОТЕХНОЛОГИЙ»

УДК 616.419-018.4-089.843:575.222.75]-053.2/7

ЛАВРИНЕНКО  
ВИКТОРИЯ АЛЕКСАНДРОВНА

**ЗНАЧЕНИЕ ГЕМОПОЭТИЧЕСКОГО ХИМЕРИЗМА ПОСЛЕ  
АЛЛОГЕННОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ  
СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК У ДЕТЕЙ И МОЛОДЫХ ВЗРОСЛЫХ**

Автореферат диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук  
по специальности 14.01.21 – гематология и переливание крови

Минск, 2018

Научная работа выполнена в ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии»

Научный руководитель: Белевцев Михаил Владимирович,  
к.б.н., доцент, зам. директора по научной работе ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии»

Официальные оппоненты: Слобожанина Екатерина Ивановна,  
д.б.н., профессор член-корр. НАН Беларуси, заведующий лабораторией медицинской биофизики ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси»

Пасюков Вадим Владимирович, к.б.н., заведующий лабораторией клеточной лекарственной резистентности ГУ «Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий»

Оппонирующая организация: ГУ «Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека»

Защита состоится «25» июля 2018 г. в 14.00 на заседании Совета по защите диссертации Д 03.11.01 при ГУ «Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий» по адресу: 223053, г. Минск, Долгиновский тракт, 160. Телефон ученого секретаря (017) 289-87-60, e-mail:erasiuk@tut.by

С диссертационной работой можно ознакомиться в библиотеке ГУ «Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий».

Автореферат разослан «    » июня 2018 г.

Ученый секретарь

совета по защите диссертаций, к.б.н. \_\_\_\_\_ Расюк Е.Д.

## ВВЕДЕНИЕ

Аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (аллоТГСК) является эффективным методом лечения детей и взрослых с самыми разными заболеваниями, такими как лейкозы, лимфомы, апластические анемии (АА), первичные иммунодефициты (ПИД) и другие. Ведение и лечение пациентов после аллоТГСК требует обязательной оценки приживления донорских клеток – исследования химеризма, которое позволяет определить происхождение гемопоэтических клеток и соотношение клеток донора и реципиента.

За последнее десятилетие использование аллоТГСК увеличилось, что связано с повышением ее безопасности, благодаря усовершенствованию подходов выбора доноров, увеличению их количества и доступности, использованию пуповинной крови, внедрению режимов кондиционирования с редуцированной интенсивностью (РИК), улучшению сопроводительной терапии [J. R. Passweg et al. 2012, A. Gratwohl et al., 2013, В. П. Поп и др., 2017, Б. В. Афанасьев и др., 2016]. Интерес к мониторингу химеризма возрос, так как новые подходы, такие как аллоТГСК с применением РИК, требуют тщательного наблюдения за трансплантатом, а выявление смешанного химеризма (СХ) в определенных ситуациях является основанием для коррекции иммуносупрессивной терапии (ИСТ), назначения инфузии донорских лимфоцитов (ИДЛ) и другой терапии [P. Tsirigotis et al., 2016, E. Rettinger et al., 2011, E. Rettinger et al., 2017].

Несмотря на постоянное совершенствование технологии проведения аллоТГСК, ее успех ограничивают многочисленные осложнения: рецидивы основного заболевания, отторжение трансплантата и развитие реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ) [Б. В. Афанасьев и др., 2015, Ю. В. Скворцова и др., 2015]. Поэтому изучение гемопоэтического химеризма и определение его связи с перечисленными осложнениями играет важнейшую роль для правильной оценки состояния пациента и дальнейшего лечения [T. Lion et al., 2012, J. R. Clark et al., 2014]. Определение закономерностей установления химеризма в различных клеточных субпопуляциях позволит эффективнее выявлять пациентов с риском неблагоприятных событий. В этой области проводятся интенсивные исследования, однако получены довольно противоречивые результаты относительно влияния уровня химеризма на исход аллоТГСК. В отличие от полного донорского химеризма (ПДХ) значение СХ, т.е. одновременного выявления клеток донора и реципиента после аллоТГСК, остается не до конца ясным. Факторы, которые влияют на развитие СХ, также мало изучены.

Современные методы исследования химеризма разнообразны. Оптимальный методологический подход определения химеризма для клинического применения должен быть специфичным, информативным, чувствительным и количественно точным. Поэтому актуальным является выбор метода исследования, который бы удовлетворял этим требованиям.

Задачей данного исследования стало определить оптимальный метод мониторинга химеризма, изучить закономерности его становления при различных заболеваниях, выявить факторы, влияющие на его уровень, установить связь химеризма с исходом аллоТГСК.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Связь работы с крупными научными программами (проектами), темами.** Диссертационная работа являлась составной частью:

– задания 01.16 «Разработать и внедрить комплексный метод определения химеризма и установить его клиническое значение у больных после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток» ГНТП «Новые технологии диагностики и лечения», подпрограмма «Трансплантология и регенеративная медицина», № госрегистрации 20114490 (2011–2015 гг.);

– НИР «Особенности донорского химеризма в различных субпопуляциях гемопоэтических клеток у детей с незлокачественными заболеваниями после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток», БРФФИ «Наука», договор № М16–95 от 20.05.2016 (2016–2018 гг.);

– НИР «Роль донорского химеризма в развитии посттрансплантационных рецидивов у детей с острыми лейкозами», БРФФИ–РФФИ, договор № М16Р–126 от 20.05.2016 (2016–2018 гг.);

Тема диссертации соответствует пункту 4 перечня приоритетных направлений научно-технической деятельности в Республике Беларусь на 2016–2020 гг. «Медицина, фармация, медицинская техника (трансплантация органов и тканей; технологии профилактики, диагностики и лечения заболеваний; фармацевтические технологии, медицинские биотехнологии, лекарственные средства, диагностические препараты и тест-системы)» Указа Президента Республики Беларусь от 22.04.2015 г. № 166 «О приоритетных направлениях научно-технической деятельности в Республике Беларусь на 2016-2020 гг.».

**Цель работы** – установить диагностическое и прогностическое значение химеризма гемопоэтических клеток у детей и молодых взрослых после аллоТГСК.

### **Задачи исследования:**

1. Разработать и внедрить алгоритм молекулярно-генетического определения химеризма после аллоТГСК у детей и молодых взрослых.

2. Определить сроки и особенности установления химеризма, в том числе в различных клеточных популяциях периферической крови (ПК) и костного мозга (КМ) у реципиентов аллогенных гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) при гемобластозах, АА и ПИД.

3. Выявить факторы, влияющие на становление гемопоэтического химеризма у пациентов с острым лейкозом (ОЛ) и АА после аллоТГСК.

4. Определить взаимосвязь между минимальной остаточной болезнью (МОБ) и гемопоэтическим химеризмом после аллоТГСК при онкогематологических заболеваниях (ОГЗ).

5. Определить связь химеризма с развитием посттрансплантационных осложнений и исходом аллоТГСК. Выявить прогностическое значение химеризма, в том числе в субпопуляциях лейкоцитов при различных заболеваниях у пациентов после аллоТГСК.

*Объект исследования* – образцы клеток КМ и ПК пациентов после аллоТГСК.

*Предмет исследования* – химеризм после аллоТГСК, факторы его определяющие и его связь с исходом аллоТГСК.

**Научная новизна:** При ОЛ после миелоаблативного кондиционирования (МАК) впервые было доказано, что наличие СХ ( $\leq 99$  % донорских клеток) на +30 день в КМ является фактором риска развития рецидивов в первые полгода после аллоТГСК, на основании чего возможно выделение таких пациентов в группу риска для назначения соответствующего лечения.

Впервые была показана связь СХ с отсроченным восстановлением иммуногемопоэза (в миелоидном и лимфоидном ростках) и длительной зависимостью от гемотрансфузий у пациентов с АА.

**Положения, выносимые на защиту:**

1. Оптимальным подходом для мониторинга гемопоэтического химеризма при уровне 5–95 % клеток донора является использование полимеразной цепной реакции коротких tandemных повторов (STR-ПЦР) с последующим фрагментным анализом, а при уровне  $> 95$  % – использование количественной ПЦР в реальном времени полиморфизмов инсерция/делеция (InDel-ПЦР).

2. С развитием СХ при ОЛ в ПК и КМ на +30 день после аллоТГСК связаны низкая клеточность трансплантата ( $< 3 \cdot 10^8$ /кг), а также со СХ в КМ возраст реципиента  $> 15$  лет. Химеризм на +30 день в КМ позволяет предсказать развитие ранних рецидивов в первые полгода.

3. В динамике увеличивающийся СХ в КМ и/или ПК, в CD34+ субпопуляции (особенно при одновременном выявлении нарастания МОБ) связан с развитием рецидивов, низкой бессобытийной и общей выживаемостью у пациентов с гемобластомами.

4. Факторами, влияющими на развитие СХ на +30 день при АА являются трансплантация от совместимого сиблинга, общая клеточность трансплантата  $\leq 2 \cdot 10^8$ /кг, CD34+ клеточность трансплантата  $\leq 7 \cdot 10^6$ /кг. При ПДХ наблюдается более раннее восстановление всех трех ростков кроветворения по сравнению с пациентами со СХ, а также более ранняя независимость от трансфузий эритроцитов и тромбоцитов. Отторжение трансплантата при АА ассоциировано с прогрессивно увеличивающимся СХ.

5. У пациентов с ПИД развитие ПДХ обеспечивает восстановление всех клеточных ростков кроветворения, однако сопряжено с более частым развитием РТПХ по сравнению со СХ. При ПИД увеличивающийся СХ не ассоциирован с отторжением трансплантата.

**Личный вклад соискателя.** Анализ литературных данных, планирование и выполнение основных этапов исследования, отработка молекулярно-генетических методов определения химеризма, методов сортировки клеточных субпопуляций, сбор материала и определение химеризма в образцах, формирование базы данных, анализ, описание и интерпретацию полученных результатов исследования проводились лично соискателем. Автор выражает благодарность научному руководителю при постановке целей и задач, а также соавторам за помощь при проведении совместных исследований. Сбор и анализ клинических данных был проведен совместно с врачом-трансплантологом Ю. Е. Марейко.

**Апробация результатов диссертации и информация об использовании ее результатов.** По материалам диссертации были сделаны доклады на Втором украинско-шведском симпозиуме «Трансляционная онкология: старые и новые парадигмы» (20–21 мая 2013 г., Киев), IX Международном симпозиуме, посвященном памяти Р. М. Горбачевой «Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток у детей и взрослых» (18–20 сентября 2015 г., Сочи), 42-м ежегодном конгрессе Европейского общества по трансплантации крови и костного мозга (3–6 апреля 2016 г., Валенсия), IX съезде онкологов и радиологов стран СНГ и Евразии (15–17 июня 2016 г., Минск), VIII съезде врачей клиничко-лабораторной службы Министерства здравоохранения Республики Беларусь (10–11 ноября 2016 г., Минск), Республиканской школе-семинаре «Диагностика иммунопатологических состояний» (20–21 апреля 2017 г., Минск), VIII Межрегиональном совещании НОДГО «Перспективы детской гематологии-онкологии: мультидисциплинарный подход – 2017» (25–28 мая 2017 г., Москва), XI Международном симпозиуме, посвященном памяти Р. М. Горбачевой «Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток. Генная и клеточная терапия» (14–16 сентября 2017 г., Санкт-Петербург), World Immune Regulation Meeting XII (14–17 марта 2018 г., Давос, Швейцария), Stem Cell (16–17 апреля 2018 г., Амстердам), V Международной научно-практической конференции «Актуальные вопросы первичных иммунодефицитов» (19–20 апреля 2018 г., Минск), IX Межрегиональном совещании НОДГО (26–28 апреля 2018 г., Санкт-Петербург).

Проект «Тест-система для определения химеризма (соотношения клеток донор-реципиент) у пациентов после аллогенной трансплантации методом ПЦР в реальном времени полиморфизмов инсерция/делеция» занял 1-е место в Республиканском конкурсе инновационных проектов 2017 года в номинации «Лучший инновационный проект».

**Опубликованность результатов диссертации.** По материалам диссертации опубликована 21 работа, в том числе 5 статей в рецензируемых журналах ВАК, 4 статьи в сборниках научных трудов международных конференций и 12 тезисов докладов (6.3 авторских листа). Министерством здравоохранения Республики Беларусь утверждены 3 инструкции по применению, 3 рационализаторских предложения.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация изложена на 201 странице машинописного текста и иллюстрирована 29 таблицей и 43 рисунками. Работа состоит из введения, общей характеристики работы, пяти глав с изложением результатов собственных исследований, заключения и указателя использованной литературы (267 источников, из них 12 опубликованы на русском языке), представленного на 21 странице. Список публикаций соискателя включает 27 работ.

## ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

### Материалы и методы исследования

**Характеристика пациентов.** В исследование включены 140 пациентов (85 мужского и 54 женского пола) с медианой возраста 9 (0,3–32) лет, которым была выполнена аллотГГСК (140 аллотГГСК № 1, 10 аллотГГСК № 2, 1 аллотГГСК № 3). Из них 45 пациентов с ОЛЛ, 38 с ОМЛ, 2 с бифенотипическим ОЛ, 7 с МДС, 5 с ювенильным миеломоноцитарным лейкозом (ЮММЛ), 1 с ХМЛ, 5 с неходжкинскими лимфомами (НХЛ), 2 с лимфомой Беркитта, 17 с АА, 16 с ПИД, 1 с талассемией, 1 с нейтропенией. Информированное согласие было получено у всех пациентов или их официальных опекунов. Для исследования химеризма и факторов, влияющих на его химеризма, оценки связи химеризма с исходом аллотГГСК сформированы 3 группы – пациенты с ОГЗ, АА и ПИД.

**Мониторинг химеризма.** Определение химеризма проводилось в клетках КМ пациентов на +30, +60, +100, +180, +365-й дни после аллотГГСК и каждые последующие полгода, в клетках ПК на +14, +30, +45, +60, + 80, +100, +140, +180, +245, +365-й дни после аллотГГСК и каждые последующие полгода.

Для определения химеризма использовали мультиплексную ПЦР коротких tandemных повторов (short tandem repeats, STR) с помощью коммерческого набора AmpF1STR® SGM Plus® PCR Amplification Kit (Applied Biosystems, США). Разделение продуктов ПЦР производили с помощью капиллярного электрофореза на генетическом анализаторе 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США), анализ – с использованием программного обеспечения «GeneMapper» (Applied Biosystems, США).

Исследование химеризма проводили методом ПЦР в реальном времени на приборе CFX96 Real-Time System (BioRad, США) с использованием панели праймеров к 30 полиморфизмам инсерция/делеция (InDel-ПЦР). Для определения чувствительности строили калибровочную кривую для информативных аллелей донора, и реципиента, и контрольного гена ALB.

Для исследования химеризма методом FISH клетки ПК/КМ подвергались краткосрочному культивированию в среде RPMI-1640 (Sigma, США), фиксировались и окрашивались коммерческими зондами CEP X/Y Dual Color Probe (Abbott, США).

Для выделения субпопуляций Т-, В-, ЕК-клеток, гранулоцитов и CD34+ клеток использовали магнитную сепарацию клеток (MACS) наборами Dynabeads (Invitrogen, США) и флуоресцентно-активированную сепарацию клеток (FACS) на приборе FACS Vantage SE (Becton Dickinson, США). Чистоту изолированных клеток определяли при помощи проточного цитометра Navios (Beckman Coulter, США). После MACS проводили окрашивание антителами специфических к линейно-специфическим антигенам в зависимости от сортированной популяции. В анализ химеризма брались только образцы клеток с чистотой > 95 %.

**Исследование иммунного статуса** проводили методом проточной цитофлуориметрии на приборе Navios (Beckman Coulter, США).

**Определение МОБ** проводили методами многоцветной проточной цитофлуориметрии и молекулярно-генетическими методами по экспрессии химерных онкогенов, Ig/TCR реарранжировкам и специфическим мутациям.

**Статистическая обработка данных.** За ПДХ был принят уровень химеризма с количеством клеток донора  $>99\%$  (для пациентов с АА и ПИД  $>98\%$ ). СХ – уровень химеризма 5–99 % (для пациентов с АА и ПИД 5–98 %). Увеличивающийся СХ – уменьшение количества донорских более чем на 15 % от предыдущей точки или переход ПДХ в СХ. Прогрессивно увеличивающийся СХ – увеличение на  $>15\%$  клеток реципиента менее чем за 3 месяца со стойкой тенденцией к нарастанию СХ. Статистическую обработку данных проводили с помощью статистического пакета R, версия 3.2.2 и GraphPad Software. Оценки сопоставимости методов определения химеризма проводили методом Бленда-Альтмана. При анализе факторов, влияющих на химеризм +30 дня применяли корреляцию Спирмена, критерий Манна-Уитни и Краскела-Уоллиса. Показатели выживаемости рассчитывали по методу Каплана-Мейера, и различия в выживаемости оценивались при помощи лонг-ранк теста. Для расчёта кумулятивных частот (CI) событий применяли анализ конкурирующих рисков, и определяли статистически значимые различия с помощью теста Грея. Провели мультивариантный анализ факторов, влияющих на общую (overall survival, OS) и бессобытийную выживаемость (event free survival, EFS) – (регрессионная модель Кокса), и CI развития рецидивов (регрессионная модель Файна и Грея). Динамика восстановления гематологических и иммунологических показателей на протяжении первого года изучалась с помощью модели смешанных эффектов. Сравнение в группах по индивидуальным показателям проводили с помощью точного критерия Фишера. Сравнение в парных измерениях осуществляли по критерию Вилкоксона. Результаты анализа считались статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

### **Сравнительная характеристика методов определения химеризма**

В данном исследовании мы сравнили мультиплексную STR-ПЦР с последующим фрагментным анализом и InDel-ПЦР в реальном времени для мониторинга химеризма. Метод FISH был использован как референсный метод, так как основан на прямом подсчете клеток донора и реципиента и позволял оценить корректность серийных разведений клеток одного волонтера в клетках другого.

Метод на основе STR-маркеров подходит для определения химеризма при любом сочетании донора и реципиента (кроме однойцевых близнецов) – у 100 % пар, в то время как метод, основанный на использовании InDel-мишеней, – только у 88 % и FISH – у 57 % (только у пар несовместимы по полу).

Чувствительность методов составили для STR-ПЦР 1–5 %, для FISH 1 % и для InDel-ПЦР 0,01 % клеток минорной популяции.

Точность определения химеризма была выше для STR-ПЦР, чем InDel-ПЦР, коэффициенты корреляции составили  $r = 0,9987$  (0,9977–0,9993,  $p < 0,0001$ ) и



$r = 0,9568$  ( $0,9247-0,9754$   $p < 0,0001$ ). Наиболее точные и воспроизводимые результаты количественного определения химеризма получаются при использовании STR-ПЦР в диапазоне 5–95 % с абсолютной погрешностью 0–5,8 % и коэффициентом вариации 2,6–18,8 %. Для InDel-ПЦР точность измерения возрастает при снижении доли минорной субпопуляции, так как погрешность измерения снижается и составляет в диапазоне выше 10 % минорной субпопуляции – до 27,5 %, при  $10 \pm 4,5$  %,  $5 \pm 2,5$  %,  $3 \pm 1,3$  %,  $1 \pm 0,67$  %,  $0,1 \pm 0,07$  %,  $0,01 \pm 0,006$  %; коэффициент вариации – до 50 %.

С учетом чувствительности и точности методов, наиболее оптимальным подходом для мониторинга химеризма у пациентов с уровнем химеризма менее 5 % или более 95 % является использование InDel-ПЦР, а при уровне химеризма 5–95 % для мониторинга рекомендуется использование STR-ПЦР.

Исходя из наших исследований алгоритм мониторинга химеризма заключается в следующем:

Определение химеризма проводится в КМ на +30, +60, +100, +180, +365-й дни после аллотГСК и каждые последующие полгода у пациентов с ОЛ, в ПК на +14, +30, +45, +60, +80, +100, +140, +180, +245, +365-й дни после аллотГСК и каждые последующие полгода у всех пациентов.

На +14 день в ПК химеризм определяется методом STR-ПЦР. Если уровень химеризма  $> 95$  %, то последующий мониторинг химеризма производится методом InDel-ПЦР.

На +30 день в КМ и ПК уровень химеризма определяется методом InDel-ПЦР, если уровень выявленного химеризма  $> 95$  % на +14 день. Если  $\leq 95$  %, то методом STR-ПЦР. Если мониторинг проводился методом STR-ПЦР и уровень выявленного химеризма  $> 95$  %, то результат подтверждается методом InDel-ПЦР. Из клеток КМ производится сортировка CD34+ субпопуляции, химеризм, в которой определяется методом STR-ПЦР.

Выбор метода мониторинга химеризма в последующие дни зависит от значения химеризма в предыдущей точке: при уровне 5–95 % клеток донора – STR-ПЦР с последующим фрагментным анализом, а при уровне  $> 95$  % – InDel-ПЦР. Если мониторинг проводился методом STR-ПЦР и уровень выявленного химеризма  $> 95$  %, то результат подтверждается InDel-ПЦР.

При выявлении СХ, необходимо повторить анализ и провести сортировку клеток (Т-, В-, ЕК-клетки, гранулоциты, CD34+клетки). При риске рецидива основного заболевания или отторжения трансплантата исследование химеризма проводится 1 раз в неделю.

### **Химеризм на +30 день у пациентов с острым лейкозом**

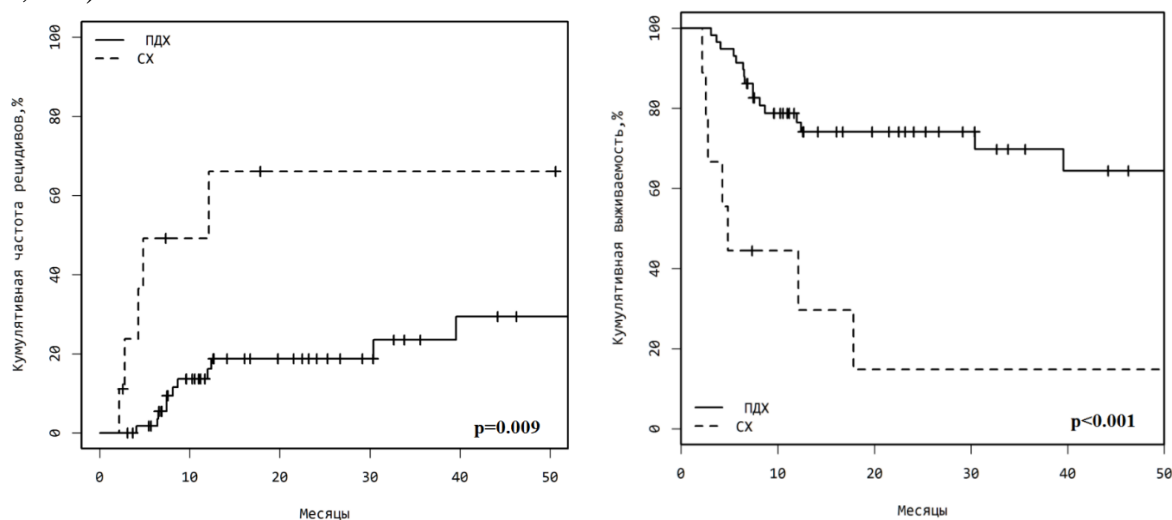
В исследование включено 74 пациента с ОЛ после первой аллотГСК с применением МАК, находившиеся в полной ремиссии на момент аллотГСК. У пациентов с ОЛ уровень химеризма на +30 день составил 95,96–100 % (медиана 99,95 %) в ПК и 95,10–100 % (медиана 99,92 %) в КМ. У пациентов с ОЛ после МАК смешанный химеризм в КМ/ПК на +30 день после аллотГСК развился у

13,5 % (у 10 из 74 пациентов). Уровень химеризма в КМ значительно ниже, чем в ПК ( $p = 0,024$ ). СХ на +30 день методом STR-ПЦР выявлялся только у 5 из 10 пациентов со СХ, выявленного методом InDel-ПЦР, что делает этот метод непригодным для данного исследования.

В мультивариантном анализе с развитием СХ в ПК и КМ на +30 день после аллотГСК были ассоциированы клеточность трансплантата  $\leq 3 \cdot 10^8/\text{кг}$  ( $p = 0,005$  и  $p = 0,041$  соответственно), а также со СХ в КМ возраст реципиента  $> 15$  лет ( $p=0,007$ ). Уровень химеризма на +30 день в КМ у пациентов с положительной МОБ ниже 99,04 % (95,1–100 %), чем у пациентов с негативной МОБ – 99,91 % (95,66–100 %),  $p = 0,036$ .

Среди 74 пациентов с ОЛ у 16 развился рецидив на 66–1203 (медиана 226) дни, из них 4 умерли в результате прогрессии лейкоза.

Наличие СХ ( $\leq 99\%$  донорских клеток) на +30 день в КМ у пациентов с ОЛ является самым неблагоприятным фактором риска развития неблагоприятного исхода в мультивариантном анализе (рисунок 1): по сравнению с пациентами с ПДХ у них значительно выше риск развития рецидивов СІ развития рецидивов –  $59,3 \pm 20,2$  % vs.  $27,0 \pm 8,2$  % ( $\text{HR} = 94,5$ ,  $p < 0,0001$ ); ниже EFS –  $14,8 \pm 13,3$  % vs.  $64,1 \pm 8,3$  % ( $\text{HR} = 6,8$ ,  $p = 0,0001$ ); ниже OS –  $23,8 \pm 19,3$  % vs.  $89,7 \pm 4,0$  % ( $\text{HR} = 6,9$ ,  $p = 0,006$ ).



**Рисунок 1. – Сравнение СІ рецидивов и EFS при СХ и ПДХ в КМ на +30 день**

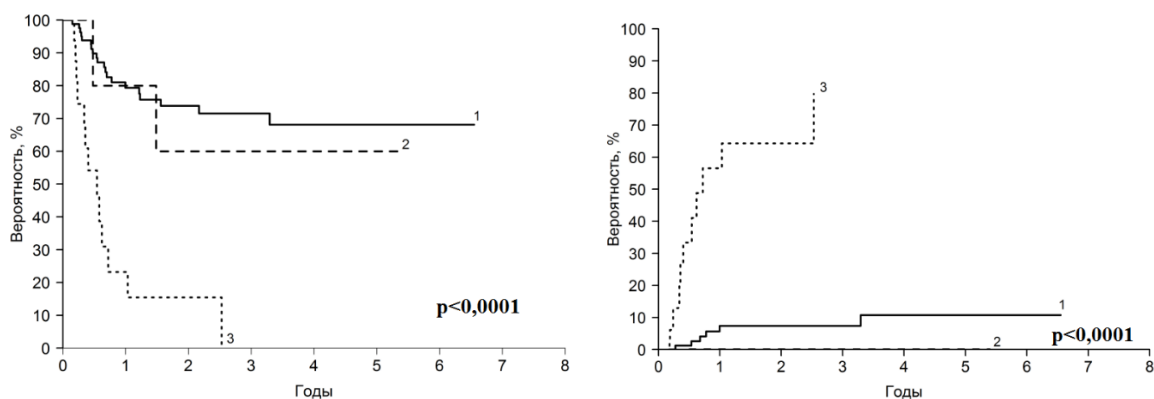
Химеризм на +30 день в КМ позволяет выявить 80 % пациентов с риском развития ранних рецидивов в первые полгода. Химеризм на +30 день в ПК не влиял на развитие рецидивов. На СІ смертности, связанной с трансплантацией (TRM) уровень химеризма в КМ и ПК не оказывал влияния.

### **Динамика химеризма как фактор прогноза развития рецидивов после аллотГСК**

В исследование включено 96 пациентов с ОГЗ, которым было проведено 104 аллотГСК, в 95 % случаев применялось МАК.

После МАК у 70 % пациентов с ОГЗ уровень химеризма выявлялся на уровне – 99,4–100 % донорских клеток. Увеличивающийся СХ у пациентов с ОГЗ является

неблагоприятным фактором прогноза для EFS (HR = 6,9,  $p < 0,0001$ ) и ассоциирован с высоким риском развития рецидивов (HR = 12,2,  $p < 0,0001$ ) после аллотГГСК. EFS в группе с ПДХ, уменьшающимся СХ и увеличивающимся СХ, составляет  $68,1 \pm 6,4$  %,  $60,0 \pm 21,9$  % и 0 % ( $p < 0,0001$ ), СИ развития рецидивов –  $10,8 \pm 4,6$  %, 0 % и  $81,3 \pm 10,8$  % ( $p < 0,0001$ ), соответственно (рисунок 2).



**Рисунок 2.** –СИ рецидивов и EFS у пациентов с ОГЗ после аллотГГСК в зависимости от динамики химеризма: 1 – ПДХ, 2 – уменьшающийся СХ, 3 – увеличивающийся СХ

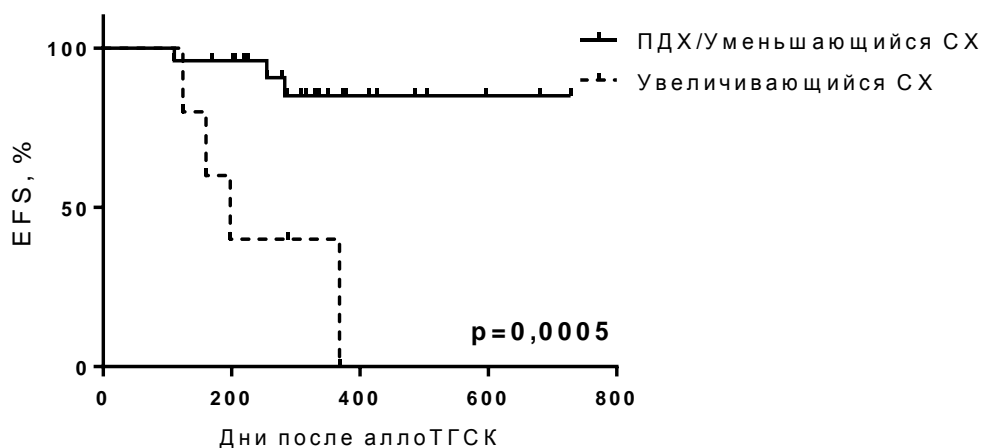
Увеличивавшийся СХ раньше и чаще выявляется в КМ, чем в ПК ( $p = 0,06$ ). В разгар гематологического рецидива химеризм в ПК может быть полностью донорским. Основными причинами неудачного прогнозирования рецидивов являются длительный период между последней точкой мониторинга в КМ и наличие экстрамедуллярного очага. Использование более чувствительного метода для мониторинга химеризма InDel-ПЦР в реальном времени позволяет выявлять рецидивы раньше и у большего количества пациентов, чем при применении STR-ПЦР ( $p = 0,06$ ).

У пациентов с ПДХ/уменьшающимся СХ по сравнению с пациентами с увеличивающимся СХ чаще выявлялась негативная МОБ – в 31 (68,9 %) из 45 случаев vs. в 2 (22,2 %) из 9,  $p = 0,020$ ; чаще происходил клиренс МОБ – в 5 (11,1 %) случаев vs. 0,  $p = 0,576$ , реже наблюдалось персистирование МОБ – в 9 (20 %) случаев vs. 7 (77,8 %),  $p = 0,0016$ .

У пациентов с положительной МОБ при увеличивающемся СХ был высокий риск развития рецидивов. В группе пациентов с негативной МОБ (при любом уровне химеризма), пациентов с положительной МОБ при ПДХ/уменьшающемся СХ, пациентов с положительной МОБ при увеличивающемся СХ СИ рецидивов составила – 0 %,  $37,8 \pm 24,4$  %,  $71,4 \pm 21,6$  %,  $p = 0,0001$ ; EFS –  $83,1 \pm 6,9$  %,  $45,9 \pm 20,7$  %,  $14,3 \pm 13,2$  %,  $p < 0,0001$ ; OS –  $79,2 \pm 7,7$  %,  $80,8 \pm 12,3$  %,  $38,1 \pm 19,9$  %,  $p = 0,115$ . При комбинации мониторинга МОБ и химеризма чувствительность достигла 71 %, а специфичность 96 %.

У пациентов с ОГЗ наличие МОБ после аллотГГСК не всегда связано с развитием рецидивов, и при наличии ПДХ или уменьшающегося СХ может наблюдаться проявление эффекта «трансплантат против лейкоза» (в 36 % случаев). При этом одновременное выявление нарастания МОБ и СХ тесно связано с развитием рецидивов (в 100 % случаев).

Определение субпопуляции клеток, ответственной за развитие СХ, позволяет лучше дифференцировать пациентов с риском возврата заболевания. Из 31 обследованного пациента у всех 5 с увеличивающимся СХ в CD34+ субпопуляции развился рецидив, в то время как только у 1 из 26 пациентов с ПДХ/уменьшающимся в CD34+ клетках,  $p < 0,0001$ : EFS – 0 % vs.  $83,2 \pm 9,5$  % ( $p = 0,0005$ ) соответственно, рисунок 3.



**Рисунок 3. – Сравнение EFS при различной динамике химеризма в CD34+ клетках**

Таким образом, появление увеличивающегося СХ в CD34+ субпопуляции предшествует развитию рецидива у пациентов с ОЛЛ и ОМЛ, при этом в других субпопуляциях (CD3+, CD19+, CD56+ и при ОЛЛ CD15+) может сохраняться ПДХ даже на момент диагностики рецидива.

У пациентов с ПДХ в КМ/ПК развитие оРТПХ наблюдается чаще, чем у пациентов с СХ ( $p = 0,0004$ ).

### **Химеризм у пациентов с апластической анемией**

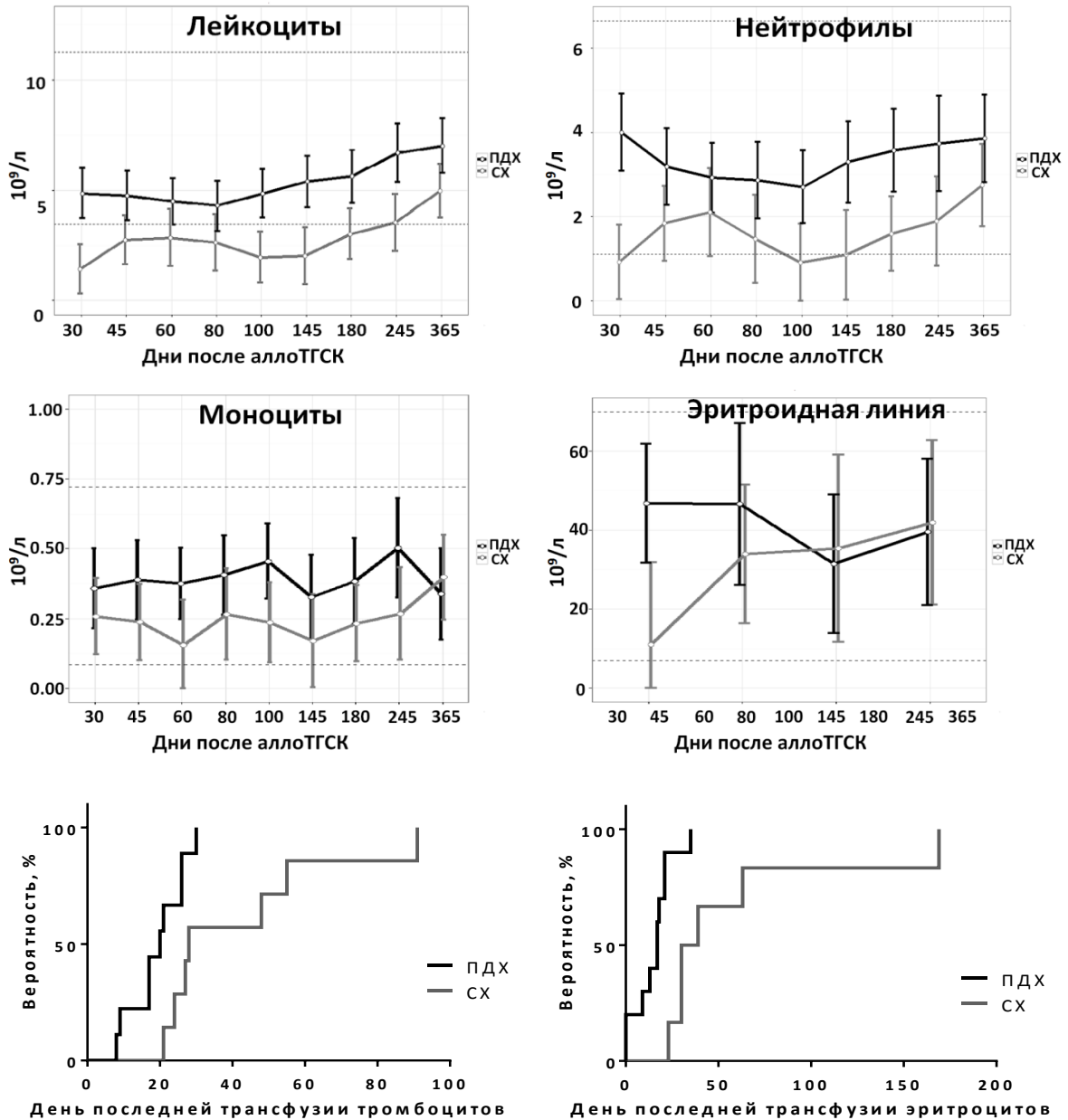
В исследование включено 17 пациентов с АА, которым проведено 20 аллоТГСК с применением РИК.

У пациентов с АА на +30 день ПДХ развился в 50 % ( $n = 10$ ), СХ в 40 % ( $n = 8$ ) и первичное отторжение трансплантата произошло в 10% ( $n = 2$ ). Стабильный ПДХ сохранялся в 35 % ( $n = 7$ ) или происходила конверсия ПДХ в СХ спустя 1–3 года после аллоТГСК в 10 % ( $n = 2$ ) случаев, персистенция СХ наблюдалась в 10 % ( $n = 2$ ), уменьшающийся СХ – в 25 % ( $n = 5$ ) и увеличивающийся СХ – в 10 % ( $n = 2$ ) случаев. Отторжение трансплантата при АА ассоциировано с прогрессивно увеличивающимся СХ ( $p = 0,007$ ).

Факторами, влияющими на развитие СХ на +30 день при АА, являются трансплантация от совместимого сиблинга (MSD) (для ПК  $p = 0,0003$ , для КМ  $p = 0,001$ ), клеточность трансплантата  $\leq 2 \cdot 10^8/\text{кг}$  (для ПК  $p = 0,004$ , для КМ  $p = 0,007$ ), CD34+ клеточность  $\leq 7 \cdot 10^6/\text{кг}$  (для ПК  $p = 0,052$ , для КМ  $p = 0,17$ ). При аллоТГСК от MSD развитие СХ у пациентов с АА ассоциировано с низкой общей (для ПК  $r = 0,93$ ,  $p = 0,0017$ , для КМ  $r = 0,93$ ,  $p = 0,0063$ ) и CD34+ клеточностью

трансплантата (для ПК  $r = 0,73$ ,  $p = 0,046$  и для КМ  $r = 0,61$ ,  $p = 0,167$ ), при трансплантации от другого донора клеточность не влияет на химеризм.

При АА у пациентов с ПДХ наблюдалось более раннее восстановление всех трех ростков кроветворения, в том числе субпопуляций лимфоцитов, по сравнению с пациентами со СХ (рисунок 4).



**Рисунок 4. – Восстановление иммуногемопоэза у пациентов с АА**

В ПК в группе пациентов с ПДХ по сравнению с СХ в первый год после аллотГСК был выше средний уровень лейкоцитов ( $p = 0,004$ ), нейтрофилов ( $p = 0,0001$ ), моноцитов ( $p = 0,007$ ). В КМ на +30 день в группе с ПДХ был выше уровень миелокариоцитов ( $p = 0,011$ ), ядросодержащих клеток эритроидной линии ( $p = 0,008$ ), в последующие дни статистически значимых различий выявлено не было. Уровень мегакариоцитов между группами значимо различался только на +365 день ( $p = 0,037$ ). У пациентов с ПДХ наблюдалась более ранняя независимость от трансфузий эритроцитов ( $p = 0,013$ ) и тромбоцитов ( $p = 0,014$ ), что косвенно

свидетельствует о более раннем восстановлении эритро- и тромбоцитопоеза. Уровень лимфоцитов различался на +245 ( $p = 0,0009$ ) и на +375 дни ( $p = 0,0012$ ). Сходная картина наблюдалась и в В-лимфоцитах на +245 ( $p = 0,0011$ ) и на +375 дни ( $p = 0,0003$ ). Восстановление ЕК- и ЕК-подобных Т-клеток не различалось в группах. Уровень Т-лимфоцитов различался на +245 ( $p = 0,0008$ ) и на +375 дни ( $p = 0,04$ ). При этом уровень Т-хелперных клеток не различался и достигал нормы в обеих группах только на +365 день. Цитотоксические Т-лимфоциты восстанавливались выше нижней границы нормы на +145 день в группе с ПДХ и на +365 день в группе со СХ, уровень Т-лимфоцитов различался на +245 ( $p = 0,0001$ ) и на +375 дни ( $p = 0,017$ ).

Сложная картина наблюдалась в субпопуляции активированных Т-клеток. В группе с ПДХ рост количества активированных Т-лимфоцитов происходил постепенно и достигал нормы приблизительно на +60 день. В группе со СХ количество активированных Т-лимфоцитов находилось в пределах нормы с +30 до +365 дня, однако отмечался быстрый рост количества активированных Т-лимфоцитов на +45 день по сравнению с +30 днем ( $p = 0,031$ ), а затем к +80 дню происходило их снижение. На +45 день уровень активированных Т-лимфоцитов был выше в группе со СХ ( $p = 0,03$ ), а на +245 день наблюдалась обратная картина: уровень активированных Т-лимфоцитов был выше в группе с ПДХ ( $p = 0,0023$ ).

При СХ у пациентов с АА в субпопуляции Т-клеток выявлялось отсроченное становление донорского химеризма и длительное персистирование остаточных Т-клеток реципиента. У 60% ( $n = 3$ ) пациентов со СХ на 2–3 году после аллотГСК наблюдалось установление ПДХ в субпопуляции гранулоцитов и/или В- и ЕК-клеток и, в то время как в Т-клеточной субпопуляции сохраняется СХ на уровне 56–92 %.

У пациентов с СХ происходит неполная абляция Т-клеток реципиента, активацию которых мы и наблюдали на втором месяце после аллотГСК, в то время как у пациентов с ПДХ в первые месяцы остаточных клеток хозяина не было и восстановление активированных Т-лимфоцитов произошло позже. На основании этих данных, считаем, что у пациентов с СХ неполная абляция приводит только к частичной элиминации клеток реципиента, в том числе аутореактивных Т-клеток в случае аутоиммунного генеза АА, подавляющих деятельность или приводящих к апоптозу стволовых клеток.

### **Химеризм у пациентов с первичными иммунодефицитами**

В исследование включены 16 пациентов с ПИД: 5 пациентов с синдромом Вискотта-Олдрича (СВО), 4 с тяжелой комбинированной иммунной недостаточностью (ТКИН), 1 с Омен-синдромом, 1 с недостаточностью МНС II класса, 2 с хронической гранулематозной болезнью (ХГБ), 1 с дефицитом GATA2, 1 с семейным гемофагоцитарным лимфогистиоцитозом (ГЛГ), 1 с LRBA-дефицитом. Тринадцать пациентов получили РИК и 2 – МАК, одному пациенту с ТКИН (Т-В+НК+) была проведена трансплантация без предварительного режима.

Трехлетняя общая выживаемость составила  $72,2 \pm 12,0\%$ , четыре пациента умерли от инфекционных осложнений.

При ПИД у большинства пациентов развивался ПДХ даже при РИК: на +30 день после аллотГСК у 12 (75%) пациентов с ПИД устанавливался ПДХ (>98%). Однако у некоторых пациентов происходило снижение химеризма в течение первых 7–9 месяцев с последующей его стабилизацией. В динамике ПДХ сохранялся в 62,5% ( $n = 10$ ), уменьшающийся СХ выявлялся в 18,75% ( $n = 3$ ), увеличивающийся СХ – в 18,75 % ( $n = 3$ ). Увеличивающийся СХ не был ассоциирован с отторжением трансплантата.

К 1 году после аллотГСК у 13 (81,25 %) пациентов с ПИД удалось достигнуть ПДХ в ПК и у 3 (18,75 %) наблюдалось длительное персистирование СХ. При СХ в ПК Т-клеточная субпопуляция была представлена в основном клетками донора, а гранулоциты - преимущественно или полностью клетками реципиента; уровень химеризма в субпопуляции В-лимфоцитов значительно различается от их полного отсутствия (0 % химеризм) до ПДХ. У пациентов с ПИД может наблюдаться приживление отдельных клеточных линий (расщепленный химеризм).

В группе пациентов с СВО у 4 из 5 развился ПДХ. На данный момент живы 4 пациента, из них 3 пациента с ПДХ без признаков заболевания. У четвертого пациента со СХ спустя 6,5 лет после аллотГСК наблюдается только тромбоцитопения ( $30-100 \cdot 10^9/\text{л}$ ), которая не требует заместительных трансфузий тромбоцитарной массы.

Среди 4 пациентов с ТКИН 3 пациента получили РИК и достигли ПДХ. Из них у 2 пациентов развились летальные инфекционные осложнения. Четвертому пациенту провели гаплотрансплантацию после  $\alpha\beta$  (CD3/CD19) деплеции без предварительного кондиционирования, у данного пациента развился расщепленный химеризм (Т-клетки – донорские, В-лимфоциты и гранулоциты – собственные). У 3 пациентов с периодом наблюдения более 2 лет отмечалось восстановление гематологических и иммунологических показателей. Только у пациента с Т-В<sup>+</sup>ЕК<sup>+</sup> ТКИН, имеющим СХ, уровень Т-хелперов остался ниже нормы. У пациента с Омен-синдромом после аллотГСК развился ПДХ (+28 день). С+100 дня наблюдалось снижение химеризма до 24% (+221 день) на фоне развившихся иммуотоксических осложнений. В последующие точки уровень химеризма колебался на уровне 31–65 % (медиана 47 %) клеток донора. У данного пациента с Омен-синдромом произошло восстановление иммунологических показателей. Два пациента с ХГБ достигли ПДХ после аллотГСК. Один из них умер от инфекционных осложнений. Второй находится в ремиссии с восстановлением нормальных гематологических и иммунологических показателей. У пациентов с GATA2-дефицитом, с дефицитом МНС II класса, с LRBA-дефицитом, ГЛГ установился ПДХ с восстановлением нормальных гематологических и иммунологических показателей без признаков основного заболевания.

Острая РТПХ II-IV степени чаще отмечалась у пациентов с ПДХ, чем у пациентов со СХ (9/11 vs. 1/5,  $p = 0,036$ ), при этом оРТПХ III-IV степени выявлялась только при ПДХ. TRM составила  $27,8 \pm 12,0$  %. У всех 4 пациентов с TRM наблюдался ПДХ, у 3 из них была острая РТПХ III-IV степени.

Развитие ПДХ у пациентов с ПИД в большинстве случаев обеспечивает восстановление всех клеточных линий, участвующих в иммунном ответе независимо от диагноза, однако сопряжено с более частым развитием РТПХ, которая является серьезным осложнением аллотГСК и может стать причиной TRM. СХ/расщепленный химеризм, при котором меньше частота развития РТПХ, также может обеспечить коррекцию проявлений заболевания, но только при замещении дефектных линий клеток в зависимости от диагноза.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

### Основные научные результаты диссертации

1. Метод на основе STR-маркеров подходит для определения гематологического химеризма у 100% пар донор/реципиент (кроме однояйцевых близнецов), метод, основанный на использовании InDel мишеней только – у 88% и FISH только у пар несовместимых по полу – 57%. Чувствительность методов STR-ПЦР, FISH и InDel-ПЦР составляет 1–5 %, 1% и 0,01 % клеток минорной популяции соответственно. Наиболее точные и воспроизводимые результаты количественного определения химеризма получаются при использовании STR-ПЦР в диапазоне 5–95 % донорских клеток с абсолютной погрешностью 0–5,8 % и коэффициентом вариации 2,6–18,8 %. Для InDel-ПЦР точность измерения возрастает при снижении доли минорной субпопуляции: погрешность измерения при  $\geq 10$  % минорной субпопуляции – до 27,5 %,  $10 \pm 4,5$  %,  $5 \pm 2,5$  %,  $3 \pm 1,3$  %,  $1 \pm 0,67$  %,  $0,1 \pm 0,07$  %,  $0,01 \pm 0,006$  %; коэффициент вариации – до 50 %. Оптимальным подходом, лежащим в основе алгоритма для мониторинга гемопоэтического химеризма, является использование метода STR-ПЦР с последующим фрагментным анализом при 5–95 % клеток донора, а при уровне выше 95 % – InDel-ПЦР [1, 6, 7, 8, 9, 10, 18, 22, 23, 25, 26].

2. У пациентов с ОЛ после МАК смешанный химеризм в КМ/ПК на +30 день после аллотГСК развивается у 13,5 % (у 10 из 74 пациентов). Уровень химеризма в КМ значительно ниже чем в ПК,  $p = 0,024$ . В мультивариантном анализе с развитием СХ в ПК и КМ на +30 день после аллотГСК ассоциированы клеточность трансплантата  $\leq 3 \cdot 10^8/\text{кг}$  ( $p = 0,005$  и  $p = 0,041$  соответственно), а также со СХ в КМ возраст реципиента  $> 15$  лет ( $p = 0,007$ ). Уровень химеризма на +30 день в КМ у пациентов с положительной МОБ ниже чем у пациентов с негативной МОБ: 99,04 % (95,1–100 %) vs 99,91 % (95,66–100 %),  $p = 0,036$ . При ОЛ у пациентов со СХ ( $\leq 99\%$  донорских клеток) на +30 день в КМ по сравнению с пациентами с ПДХ значительно выше СИ развития рецидивов –  $59,3 \pm 20,2\%$  vs  $27,0 \pm 8,2\%$  (HR = 94,5,  $p < 0,0001$ ); ниже EFS –  $14,8 \pm 13,3$  % vs  $64,1 \pm 8,3$  % (HR = 6,8,  $p = 0,0001$ ); ниже OS –  $23,8 \pm 19,3$  % vs  $89,7 \pm 4,0$  % (HR = 6,9,  $p = 0,006$ ). Химеризм на +30 день в КМ позволяет выявить 80 % пациентов с риском развития ранних рецидивов в первые полгода [4, 12, 18].

3. После МАК у 70 % с ОГЗ уровень химеризма сохраняется на высоком уровне – 99,4–100 % донорских клеток. Увеличивающийся СХ у пациентов с ОГЗ является неблагоприятным фактором прогноза для EFS (HR = 6,9,  $p < 0,0001$ ) и



ассоциирован с высоким риском развития рецидивов ( $HR = 12,2, p < 0,0001$ ) после аллоТГСК. EFS в группе с ПДХ, уменьшающимся СХ и увеличивающимся СХ составляет  $68,1 \pm 6,4 \%$ ,  $60,0 \pm 21,9 \%$  и  $0 \%$  ( $p < 0,0001$ ), CI развития рецидивов –  $10,8 \pm 4,6 \%$ ,  $0 \%$  и  $81,3 \pm 10,8 \%$  ( $p < 0,0001$ ) соответственно [3, 9, 11, 18, 20].

4. Одновременное выявление нарастание уровня МОБ и СХ при ОГЗ связано с развитием рецидивов (в 100 % случаев). У пациентов с ОГЗ при наличии ПДХ или уменьшающегося СХ может наблюдаться проявление эффекта «трансплантат против лейкоза» и элиминация опухолевого клона в 36 % случаев. Определение субпопуляции клеток, ответственной за развитие СХ, позволяет лучше дифференцировать пациентов с риском возврата заболевания. Появление увеличивающегося СХ в CD34+ субпопуляции при ОЛ ассоциировано с развитием рецидивов: однолетняя EFS составляет 0% при увеличивающемся СХ в CD34+ и  $83,2 \pm 9,5 \%$  при ПДХ/уменьшающемся СХ ( $p = 0,0005$ ). У пациентов с ОГЗ с ПДХ в КМ/ПК развитие оРТПХ наблюдается чаще, чем у пациентов со СХ ( $p = 0,0004$ ) [3, 9, 14, 20, 24, 27].

5. У пациентов с АА на +30 день ПДХ развился в 50 %, СХ – в 40 %, первичное отторжение трансплантата произошло в 10 % случаев. При СХ у пациентов с АА в субпопуляции Т-клеток выявлялось отсроченное становление донорского химеризма. У 60 % пациентов со СХ на 2–3 году после аллоТГСК наблюдалось установление ПДХ в субпопуляции гранулоцитов и/или В- и ЕК-клеток и, в то время как в Т-клеточной субпопуляции сохранялся СХ на уровне 56–92 %. Факторами, влияющими на развитие СХ на +30 день при АА, являются трансплантация от MSD (для ПК  $p = 0,0003$ , для КМ  $p = 0,001$ ), клеточность трансплантата  $\leq 2 \cdot 10^8/\text{кг}$  (для ПК  $p = 0,004$ , для КМ  $p = 0,007$ ), CD34+ клеточность  $\leq 7 \cdot 10^6/\text{кг}$  (для ПК  $p = 0,052$ , для КМ  $p = 0,171$ ). При аллоТГСК от MSD развитие СХ у пациентов с АА ассоциировано с низкой общей (для ПК  $r = 0,93, p = 0,0017$ , для КМ  $r = 0,93, p = 0,0063$ ) и CD34+ клеточностью трансплантата (для ПК  $r = 0,73, p = 0,046$  и для КМ  $r = 0,61, p = 0,167$ ), при трансплантации от другого MUD/MMFD доза клеток не влияет на уровень химеризма. При АА у пациентов с ПДХ наблюдалось более раннее восстановление всех трех ростков кроветворения по сравнению с пациентами со СХ, а также более ранняя независимость от трансфузий эритроцитов ( $p = 0,013$ ) и тромбоцитов ( $p = 0,014$ ). Отторжение трансплантата при АА ассоциировано с прогрессивно увеличивающимся СХ ( $p = 0,007$ ) [2, 9, 13, 15, 16, 19, 27].

6. При ПИД у 75 % пациентов развивается ПДХ на +30 день после аллоТГСК. Увеличивающийся СХ не был ассоциирован с отторжением трансплантата и, в некоторых случаях, возвратом заболевания при ПИД. К 1 году после аллоТГСК у 81 % пациентов с ПИД удалось достигнуть ПДХ в ПК и у 19 % наблюдалось длительное персистирование СХ. При СХ в ПК Т-клеточная субпопуляция представлена в основном клетками донора, а гранулоциты преимущественно или полностью клетками реципиента; уровень химеризма в субпопуляции В-лимфоцитов значительно различается от их полного отсутствия (0 % химеризм) до ПДХ. Острая РТПХ II–IV степени чаще отмечалась у пациентов

с ПДХ, чем у пациентов со СХ ( $p = 0,036$ ), при этом тяжелая форма оРТПХ (III–IV степени) выявлялась только при ПДХ [5, 9, 17, 19, 21, 27].

### **Рекомендации по практическому использованию результатов**

1. Для мониторинга химеризма оптимальным подходом исследования химеризма является использование метода STR-ПЦР при уровне 5–95 % клеток донора, а при уровне 95–100 % – InDel-ПЦР, в частности после МАК, согласно разработанному алгоритму. Определение химеризма рекомендуется проводить в КМ на +30, +60, +100, +180, +365-й день после аллоТГСК и каждые последующие полгода, в ПК на +14, +30, +45, +60, +80, +100, +140, +180, +245, +365-й день после аллоТГСК и каждые последующие полгода. При выявлении СХ в ПК/КМ чаще проводить мониторинг химеризма для выделения пациентов группы риска рецидива или отторжения трансплантата, а также необходимо определить субпопуляцию клеток, в которой присутствуют клетки донора для более точной стратификации и назначения соответствующего лечения (фактор риска – наличие увеличивающегося СХ, особенно в опухоль-ассоциированной субпопуляции) [1, 2, 3, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 14, 18, 20, 22, 23, 25, 26].

2. У пациентов с ОЛ после аллоТГСК с применением МАК рекомендуется исследовать химеризм, в том числе ЛСХ (обязательно в CD34+ субпопуляции при экспрессии данного маркера на опухолевых клетках) в КМ на +30 день для выделения пациентов группы риска развития ранних рецидивов (фактор риска – наличие СХ) [4, 12, 14, 18].

3. При отсутствии маркера МОБ у пациентов высокой группы риска рецидива желателен мониторинг химеризма в опухоль-ассоциированной субпопуляции для определения наличия СХ после аллоТГСК и решения тактики дальнейшего лечения пациентов (фактор риска – наличие увеличивающегося СХ) [14–А].

4. Для оценки риска развития рецидивов и возможности развития эффекта «трансплантат против лейкоза» при ОГЗ необходимо проводить одновременный мониторинг МОБ и химеризма (группа риска – одновременное выявление нарастания МОБ и СХ, а при наличии ПДХ или уменьшающегося СХ может наблюдаться проявление эффекта «трансплантат против лейкоза»).

7. Для оценки замещения дефектных линий клеток и возможности формирования полноценного иммунного ответа, а также коррекции других проявлений заболевания, выявления расщепленного химеризма при СХ у пациентов с ПИД необходимо исследование ЛСХ (при отсутствии приживления клеток необходимой субпопуляции может рассматриваться вопрос о ретрансплантации или другой заместительной терапии) [5, 17].

Отражением практической реализации работы являются 3 инструкции по применению, утвержденных МЗ РБ и 3 рационализаторских предложения, 6 актов внедрения.

## СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ СОИСКАТЕЛЯ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### *Статьи в научных журналах*

1. Количественный анализ химеризма после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток молекулярно-генетическими методами / В. А. Лавриненко, Т. В. Савицкая, Е. В. Волочник, Ю. Е. Марейко, О. В. Алейникова // Онкогематология. – 2014. – №2. – С. 29–36.

2. Химеризм и восстановление гемопоэза при апластических анемиях после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток у детей / В. А. Лавриненко, Ю. Е. Марейко, О. В. Красько, Е. Ю. Березовская, Т. В. Шман, Н. В. Минаковская, Я. И. Исайкина, М. В. Белевцев, О. В. Алейникова // Гематология. Трансфузиология. Восточная Европа. – 2016. – Т. 2, №4. – С. 451–472.

3. Динамика химеризма как фактор прогноза развития рецидивов после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток при онкогематологических заболеваниях / В. А. Лавриненко, Ю. Е. Марейко, Е. Ю. Березовская, О. И. Быданов, М. В. Белевцев, Н. В. Минаковская, О. В. Алейникова // Известия Национальной академии наук Беларуси. Серия медицинских наук. – 2017. – №2. – С. 26–40.

4. Исход аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток у пациентов с острым лейкозом в зависимости от уровня химеризма на 30 день / В. А. Лавриненко, Ю. Е. Марейко, О. В. Красько, Е. Ю. Березовская, С. Н. Доронина, М. В. Стеганцева, Н. В. Минаковская, М. В. Белевцев, О. В. Алейникова // Евразийский онкологический журнал – 2017. – Т. 5, № 3. – С. 429–448.

5. Становление донорского химеризма у пациентов с первичными иммунодефицитами после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток / В. А. Лавриненко, Ю. Е. Марейко, Е. Ю. Березовская, М. В. Стеганцева, Н. В. Минаковская, М. В. Белевцев // Онкогематология. – 2018. – №2. – С. 20–29.

### *Статьи в научных сборниках и материалах конференций*

6. Савицкая, Т. В. Количественный анализ гемопоэтического химеризма у детей после аллогенной трансплантации стволовых клеток крови методом ПЦР-амплификации коротких tandemных повторов участков ДНК / Т. В. Савицкая, Ю. Е. Марейко, В. А. Лавриненко // Актуальные вопросы детской онкологии, гематологии и иммунологии: сборник материалов XII международной научно-практической конференции 15–17 ноября 2012 г. / Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии ; редкол. : О. В. Алейникова [и др.]. – Минск, 2012. – С.197–200.

7. Динамика донорского химеризма и использование рутинных методов для ее оценки после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток у детей / Ю. Е. Марейко, Т. В. Савицкая, Э. Л. Акинфеева, В. А. Лавриненко, Т. В. Ступникова, Н. Н. Савва // Актуальные вопросы детской онкологии, гематологии и иммунологии: сборник материалов XII международной научно-практической

конференции 15–17 ноября 2012 г. / Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии ; редкол. : О. В. Алейникова [и др.]. – Минск, 2012. – С.122–131.

8. Лавриненко, В. А. Короткие тандемные повторы и полиморфизмы инсерция/делеция как мишени для определения химеризма после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток / В. А. Лавриненко, Т. В. Савицкая, Ю. Е. Марейко // Трансплантация стволовых клеток : сборник материалов I Евразийского конгресса 25–27 сентября 2013г. / Профессиональные издания ; рецензионный совет : О. В. Алейникова [и др.]. – Минск, 2013. – С.82–86.

9. Определение химеризма и его клиническое значение у пациентов после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток / Ю. Е. Марейко В. А. Лавриненко, Т. В. Савицкая, Е. В. Волочник, Э. Л. Акинфеева, Н. В. Минаковская, Н. П. Кирсанова, А. В. Алексейчик, Д. В. Прудников, О. В. Алейникова // сб. науч. тр. : Трансплантология и регенеративная медицина: достижения и перспективы ; под ред. М.П. Потапнева А.И. Свирновского – Минск : РНМБ, 2016. – Вып. 1. – С.45–50.

### *Тезисы*

10. Lavrinenko, V. A comparison of multiplex short tandem repeat PCR and real-time PCR insertion/deletion polymorphisms methods for quantification of chimerism after hematopoietic stem cell transplantation / V. Lavrinenko, T. Savitskaya, Y. Mareika // *Experimental Oncology*. – 2013. – Vol. 35. – P. 140.

11. Химеризм после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток как прогноз развития рецидива у детей с онкогематологическими заболеваниями / В. А. Лавриненко, Ю. Е. Марейко, Т. В. Савицкая, М. В. Белевцев, О. В. Алейникова // *Клеточная терапия и трансплантация*. – 2016. – Т. 5, № 1. – С. 53–55.

12. Chimerism on 30 day after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation predicts early relapses / V. Lavrinenko, Y. Mareiko, E. Berezovskaya, M. Belevtsev, O. Bydanov, O. Aleynikova // *Bone Marrow Transplant*. – Vol. 51. – P. S314–S513.

13. Химеризм и восстановление гемопоэза после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток при апластических анемиях у детей / В. А. Лавриненко, Ю. Е. Марейко, Е. Ю. Березовская, Н. В. Минаковская, М. В. Белевцев, О. В. Алейникова // *Лабораторная диагностика. Восточная Европа*. – 2016. – Приложение. – С. 120–121.

14. Линейно-специфический химеризм в оценке риска развития рецидивов после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток при онкогематологических заболеваниях / В. А. Лавриненко, Ю. Е. Марейко, Е. Ю. Березовская, А. А. Мигас, М. В. Белевцев, Н. В. Минаковская, О. В. Алейникова // *Российский журнал детской гематологии и онкологии*. – 2017. – С. 90–91.

15. Отсроченное восстановление гемо- и иммунопоэза после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток при смешанном химеризме у детей с апластической анемией с миелопролиферативными заболеваниями и

миелодиспластическим синдромом / В. А. Лавриненко, Ю. Е. Марейко, О. В. Красько, Е. Ю. Березовская, О. В. Алейникова // Клеточная терапия и трансплантация. – 2017. – Т. 6, № 3. – С. 50–52.

16. Химеризм после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток у детей с апластической анемией / А. В. Пунько, В. А. Лавриненко В.А., Ю. Е. Марейко, Е. Ю. Березовская // Сахаровские чтения 2017 года: экологические проблемы XXI Века : материалы 17-й международной науч. конф., Минск, 18–19 мая 2017 г. / Междунар. гос. экол. ин-т им. А. Д. Сахарова Бел. гос. ун-та; редкол. : С. Е. Головатый [и др.] ; под ред. С. А. Маскевича, С. С. Позняка. – Минск : ИВЦ Минфина, 2017. – Ч. 1. – С. 206–207.

17. Donor cell engraftment in patients with primary immunodeficiency after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation / V. Lavrinenko, Y. Mareika, E. Berezovskaya, N. Minakovskaya, M. Belevtsev // the World Immune Regulation Meeting XII, Davos, 14 – 17 March 2018 / Abstract book of World Immune Regulation Meeting XII, abstract № P092. – P. 81.

18. Improving sensitivity of chimerism testing by InDel-PCR for early relapse prediction in patients after alloHSCT / V. A. Lavrinenko, Y. Mareika, E. Berezovskaya, O. Aleinikova // Biochemistry & Molecular Biology Journal. – 2018. – Vol. 4. – P. 78.

19. Пунько, А. В. Влияние основного заболевания на динамику химеризма после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток / А. В. Пунько, В. А. Лавриненко, Ю. Е. Марейко // Российский журнал детской гематологии и онкологии. – 2018. – Специальный номер. – С. 123–124.

20. Применение трансфузий донорских лимфоцитов для предотвращения рецидивов у детей с гемобластомами после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток/ В.А. Лавриненко, Ю. Е. Марейко, Д. В. Прудников, Н. П. Кирсанова, Н. В. Минаковская, О. В. Алейникова // Российский журнал детской гематологии и онкологии. – 2018. – Специальный номер. – С. 121.

21. Количественный анализ молекул TREC и KREC у пациентов с первичным иммунодефицитом после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток / Е. А. Полякова, М. В. Стеганцева, В. А. Лавриненко, Н. В. Минаковская, М. В. Белевцев, О. В. Алейникова // Российский журнал детской гематологии и онкологии. – 2018. – Специальный номер. – С. 44.

### ***Инструкции по применению***

22. Молекулярно-генетический метод диагностики приживления и отторжения трансплантата у пациентов после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток : инструкция по применению № 234-1213 : утв. МЗ Респ. Беларусь 06.03.2014 г. / Респ. науч.-практ. центр детской онкологии и гематологии ; сост. : О. В. Алейникова, Т. В. Савицкая, Ю. Е. Марейко, В. А. Лавриненко.– Минск, 2014. – 7 С. (<http://med.by/methods/pdf/234-1213.pdf>).

23. Алгоритм диагностики приживления и отторжения трансплантата у пациентов после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток :

инструкция по применению № 202-1215 : утв. МЗ Респ. Беларусь 11.12.2015 г. / Респ. науч.-практ. центр детской онкологии и гематологии ; сост. : Ю. Е. Марейко, Т. В. Савицкая, Е. В. Волочник, В. А. Лавриненко, Э. Л. Акинфеева, О. В. Алейникова. – Минск, 2015. – 15 С. ([https://oncology.by/books/instructions/2015/instr\\_2015\\_7.pdf](https://oncology.by/books/instructions/2015/instr_2015_7.pdf)).

24. Метод диагностики минимальной остаточной болезни у пациентов с острыми лейкозами при аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток : инструкция по применению № 148-1115 : утв. МЗ Респ. Беларусь 11.12.2015 г. / Респ. науч.-практ. центр детской онкологии и гематологии ; сост. : Д. В. Прудников, А. М. Кустанович, И. В. Пахомова, Ю. Е. Марейко, В. А. Лавриненко, А. Н. Мелешко, Т. В. Савицкая, М. В. Белевцев, Н. В. Минаковская, О. В. Алейникова. – Минск, 2015. – 25 С. ([https://oncology.by/books/instructions/2015/instr\\_2015\\_6.pdf](https://oncology.by/books/instructions/2015/instr_2015_6.pdf)).

### *Рационализаторские предложения*

25. Оптимизация метода диагностики гемопоэтического химеризма на основе STR мишеней: рац. предложение № 72 : утв. Сов. Министров Респ. Беларусь 02.12.2012 // Респ. науч.-практ. центр детской онкологии и гематологии от 19.12.2012. сост.: Т. В. Савицкая, В. А. Лавриненко, Ю. Е. Марейко.

26. Определение уровня химеризма методом ПЦР «в реальном времени» на основе полиморфизмов инсерция/делеция (InDel-ПЦР) у пациентов после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (аллоТГСК): рац. предложение № 82 : утв. Сов. Министров Респ. Беларусь 12.12.2013 // Респ. науч.-практ. центр детской онкологии и гематологии от 12.12.2013. сост.: Т. В. Савицкая, В. А. Лавриненко, Ю. Е. Марейко.

27. Определение линейно-специфического химеризма у детей после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток : рац. предложение № 93: утв. Сов. Министров Респ. Беларусь 28.12.2015 // Респ. науч.-практ. центр детской онкологии и гематологии от 29.12.2015. сост.: В. А. Лавриненко, А. А. Мигас, Ю. Е. Марейко, Е. Ю. Березовская.

## Рэзюмэ

Лаўрыненка Вікторыя Аляксандраўна

### Значэнне гемапаэтычнага хімерызма пасля аллогеннай трансплантацыі гемапаэтычных ствалавых клетак у дзяцей і маладых дарослых

**Ключавыя словы:** хімерызм, аллогенная трансплантацыя гемапаэтычных ствалавых клетак, вострыя лейкозы, апластычныя анеміі, першасныя імунадэфіцыты, рэцыдыў, гематалагічнае аднаўленне, іммуналагічнае аднаўленне, адрыньванне трансплантанта, дзеці.

**Мэта працы:** вызначыць дыягнастычнае і прагнастычнае значэнне хімерызма гемапаэтычных ствалавых клетак у дзяцей пасля аллаТГСК.

**Метады даследавання:** клінічныя, лабараторныя, статыстычныя.

**Атрыманыя вынікі:** Найбольш аптымальным падыходам для маніторынгу гемапаэтычнага хімерызма пры 5-95% клетак донара з'яўляецца выкарыстанне STR-ПЛР, а пры ўзроўні 95-100% – InDel-ПЛР. З развіццём СХ пры ВЛ на +30 дзень пасля аллаТГСК звязана нізкая клетканасць трансплантанта. Хімерызм на +30 дзень у КМ дазваляе прадказаць развіццё ранніх рэцыдываў у першыя паўгода пры ВЛ. У пацыентаў з ОГЗ павялічэнне СХ (асабліва пры адначасовым нарастанні мінімальнай рэшткавай хваробы) у КМ і/або ПК, у CD34 + субпапуляцыі звязаны з развіццём рэцыдываў, нізкай безрэцыдыўнай і агульнай выжывальнасці. Фактарамі, якія ўплываюць на развіццё СХ на +30 дзень пры АА з'яўляюцца трансплантацыя ад сумяшчальнага сіблінга, нізкая агульная і CD34 + клетканасць трансплантанта. У пацыентаў з АА пры ПДХ у параўнанні са СХ назіраецца больш ранняе аднаўленне ўсіх трох парасткаў крыватвору, а таксама больш ранняя незалежнасць ад трансфузіі эрытрацытаў і трамбацытаў. Адрыньванне трансплантанта пры АА асацыявана з прагрэсіўным павялічэннем СХ. У пацыентаў з ПД развіццё ПДХ забяспечвае аднаўленне ўсіх клеткавых ліній, аднак спалучана з больш частым развіццём РТПХ у параўнанні са СХ. Пры ПД павялічэнне СХ нясацыявана з адрыньваннем трансплантанта.

**Навуковая навізна:** У першыню ў дзяцей з ВЛ пасля МАК даказана, што наяўнасць СХ на +30 дзень у КМ асацыявана з развіццём рэцыдываў у першыя паўгода. Упершыню паказана сувязь СХ з адтэрмінаваным аднаўленнем нармальнага іммунагемапаэза (у эрытроідным, міелоідным і лімфоідным парастках) і працяглай залежнасцю ад гематрансфузіяў ў пацыентаў з АА.

**Рэкамендацыі па выкарыстанні:** вынікі працы могуць быць выкарыстаны для ацэнкі пражывлення і функцыянавання трансплантанта, вылучэння пацыентаў з рызыкай развіцця рэцыдываў.

**Вобласць ужывання:** гематалогія, анкалогія, транспланталогія, клінічная лабараторная дыягностыка.

## Резюме

**Лавриненко Виктория Александровна**

### **Значение гемопоэтического химеризма после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток у детей и молодых взрослых**

**Ключевые слова:** химеризм, аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток, острые лейкозы, апластические анемии, первичные иммунодефициты, рецидив, гематологическое восстановление, иммунологическое восстановление, отторжение трансплантата, дети.

**Цель работы:** определить диагностическое и прогностическое значение химеризма гемопоэтических клеток у детей после аллоТГСК.

**Методы исследования:** клинические, лабораторные, статистические.

**Полученные результаты:** Оптимальным подходом для мониторинга гемопоэтического химеризма при 5–95 % клеток донора является использование STR-ПЦР, а при уровне 95–100% – InDel-ПЦР. С развитием СХ при ОЛ на +30 день после аллоТГСК связана низкая клеточность трансплантата. Химеризм на +30 день в КМ позволяет предсказать развитие ранних рецидивов в первые полгода при ОЛ. У пациентов с ОГЗ увеличивающийся СХ (особенно при одновременном нарастании МОБ) в КМ и/или ПК, в CD34+ субпопуляции связаны с развитием рецидивов, низкой безрецидивной и общей выживаемостью. Факторами, влияющими на развитие СХ на +30 день при АА являются трансплантация от совместимого sibлинга, низкая общая и CD34+ клеточность трансплантата. У пациентов с АА при ПДХ по сравнению со СХ наблюдается более раннее восстановление всех трех ростков кроветворения, а также более ранняя независимость от трансфузий эритроцитов и тромбоцитов. Отторжение трансплантата при АА ассоциировано с прогрессивно увеличивающимся СХ. У пациентов с ПИД развитие ПДХ обеспечивает восстановление всех клеточных линий, однако сопряжено с более частым развитием РТПХ по сравнению со СХ. При ПИД увеличивающийся СХ не ассоциирован с отторжением трансплантата.

**Научная новизна:** Впервые у детей с ОЛ после МАК доказано, что наличие СХ на +30 день в КМ ассоциировано с развитием рецидивов в первые полгода. Впервые показана связь СХ с отсроченным восстановлением нормального иммуногемопоэза (в эритроидном, миелоидном и лимфоидном ростках) и длительной зависимостью от гемотрансфузий у пациентов с АА.

**Рекомендации по использованию:** результаты работы могут быть использованы для оценки приживления и функционирования трансплантата, выделения пациентов с риском развития рецидивов.

**Область применения:** гематология, онкология, трансплантология, клиническая лабораторная диагностика.



## Abstract

Lavrinenko Victoria

### **The importance of hematopoietic chimerism after allogeneic transplantation of hematopoietic stem cells in children and young adults**

**Key words:** chimerism, allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, acute leukemia, aplastic anemia, primary immunodeficiencies, relapse, hematologic recovery, immunological recovery, transplant rejection, children.

**Purpose of the study:** to determine the diagnostic and prognostic value of chimerism of hematopoietic cells in children after alloHSCT.

**Methods of the study:** clinical, laboratory, statistical.

**Obtained results:** The most optimal approach for hematopoietic chimerism monitoring are the use of STR-PCR at the level of donor cells 5-95% and InDel-PCR at the level of 95-100%. Low cellularity of transplant age associated with the development of MC on +30 day after alloHSCT in AA. Chimerism on +30 day in BM predicted the development of early relapses in the first six months. In patients with hematological malignancies, increasing MC (especially in case of simultaneous increasing in minimal residual disease) in BM and/or peripheral blood, in CD34+ subpopulation associated with the development of relapses, low disease-free and overall survival. In aplastic anemia (AA) factors associated with the development of MC on +30 day are transplantation from compatible sibling, low overall and CD34+ cellularity of the graft. In patients with AA in case of full donor chimerism (FDC) compare to MC, earlier recovery of all three cell lineages of hematopoiesis as well as an earlier independence from red blood cell and platelet transfusions were observed. Graft rejection in AA was associated with progressively increasing MC. In patients with primary immunodeficiency (PID), the development of FDC provided the restoration of all cell lines, but was associated with a more frequent development of GVHD compared to MC. With PID, increasing MC was not associated with transplant rejection.

**Scientific novelty:** For the first time it was shown that in children with acute leukemia after myeloablative conditioning MC on +30 day in BM was associated with the development of relapses during the first six months. In patients with AA the relationship of MC with delayed recovery of normal immunohematopoiesis (in erythroid, myeloid and lymphoid lineages) and with prolonged dependence on blood transfusions was demonstrated for the first time.

**Recommendations for use:** The results of the work can be used for assessing of the engraftment and functioning of the transplant, for distinguishing of patients at risk of impending relapses.

**Field of application:** hematology, oncology, transplantology, clinical laboratory diagnostics.

Научное издание

ЛАВРИНЕНКО ВИКТОРИЯ АЛЕКСАНДРОВНА

**ЗНАЧЕНИЕ ГЕМОПОЭТИЧЕСКОГО ХИМЕРИЗМА ПОСЛЕ  
АЛЛОГЕННОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ  
СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК У ДЕТЕЙ И МОЛОДЫХ ВЗРОСЛЫХ**

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

по специальности 14.01.21 — гематология и переливание крови