

О. В. НЕЧАЙ, Н. Ф. МИЛАНОВИЧ, В. В. СМОЛЬНИКОВА, В. Ю. ГРИНЕВИЧ

ОСОБЕННОСТИ ИММУННОЙ РЕКОНСТИТУЦИИ ПАЦИЕНТОВ ПОСЛЕ АЛЛОГЕННОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТОК

Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии, Минск, Беларусь

Восстановление иммунитета после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (аллоТГСК) представляет собой ключевой фактор, определяющий процесс восстановления после трансплантации, поскольку большинство клинических ситуаций в посттрансплантационном периоде, таких как острая реакция «трансплантат против хозяина» (оРТПХ), инфекционные осложнения, и рецидив связаны со скоростью, количеством и качеством восстановления иммунных клеток.

В статье представлены результаты изучения иммунной реконституции пациентов после аллоТГСК с акцентом на особенности иммунной реконституции пациентов с и без оРТПХ.

Ключевые слова: аллогенная трансплантация стволовых гемопоэтических клеток, иммунная реконституция, реакция «трансплантат против хозяина», реакция «трансплантат против лейкемии».

Immune reconstitution after allogeneic hematopoietic cell transplantation (alloHSCT) is a key factor determining the clinical course after transplantation, since most clinical situations in the post-transplant period, such as acute graft-versus-host disease (aGVHD), infectious complications, and relapse are associated with the speed, quantity, and quality of immune cell reconstitution.

This article presents the results of a study of immune reconstitution in patients after alloHSCT, with an emphasis on the features of immune reconstitution in patients with and without aGVHD.

Key words: allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, immune reconstitution, graft-versus-host disease, graft-versus-leukemia disease.

HEALTHCARE. 2024; 12: 27—34

FEATURES OF IMMUNE RECONSTITUTION IN PATIENTS AFTER ALLOGENEIC HEMATOPOIETIC STEM CELL TRANSPLANTATION

O. Nechay, N. Milanovich, V. Smolnikova, V. Grinevich

Аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (аллоТГСК) создает новую иммунную и гемопоэтическую системы у пациентов, страдающих тяжелыми нарушениями нормального кроветворения или иммунной дисфункцией. В случае злокачественных нарушений кроветворения, таких как острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ) или острый миелоидный лейкоз (ОМЛ), успех аллоТГСК критически зависит от реакции «трансплантат против лейкемии» (РТПЛ), иммунологической реакции, при которой донорские Т-клетки определяют и устраняют минимальные остаточные лейкозные клетки.

АллоТГСК создает одно из самых глубоких иммуносупрессивных состояний в медицине, имеет общие черты с такими состояниями, как врожденный иммунодефицит или вирус иммунодефицита человека (ВИЧ). Давно установлено, что восстановление иммунитета после аллоТГСК должно повторять иммунный онтогенез, но идет иными путями, чем природные [1—3]. В естественном онтогенезе лимфопоэз начинается внутриутробно, оснащен широким репертуаром наивных Т-клеток при рождении

и продолжает созревать в раннем детстве, когда ткань тимуса наиболее активна. Напротив, лимфопоэз после аллоТГСК протекает в aberrантной среде, где тимус активен лишь частично, органы повреждаются в результате химиотерапии и воспаления, а организм подвергается значительному воздействию внутренних и внешних антигенов. Кроме того, иммунная функция должна подавляться при проведении аллоТГСК с помощью иммуносупрессоров для предотвращения или лечения реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ) — иммуноопосредованного ятрогенного заболевания, которое вызвано искусственным столкновением двух иммунных систем в одном организме. Тем не менее способность восстанавливать иммунную систему посредством генерации и пролиферации иммунных эффекторных клеток огромна [4], и при условии целенаправленного вмешательства и поддержки иммунитет может быть восстановлен в течение нескольких месяцев.

Иммунная реконституция — многомерный уникальный процесс, который существенно различается у разных пациентов [5].

Это может зависеть от источника трансплантата, дозы клеток, барьеров человеческого лейкоцитарного антигена (HLA), состояния пациента перед аллотГСК и посттрансплантационных вмешательств, включая те, которые направлены на предотвращение или лечение осложнений аллотГСК. Аллогенный трансплантат помимо того, что является источником гемопоэтических стволовых клеток для восстановления кроветворения, выступает резервуаром иммунных клеток и инициирует сложный процесс иммунной реконституции. Этот процесс достигается за счет двух разных, но дополняющих друг друга волн регенерации иммунных клеток, которые тесно взаимосвязаны, и их трудно разделить. Первая волна опосредована донорскими лимфоцитами, присутствующими в трансплантате. При переливании лимфодеплетированному хозяину эти зрелые лимфоциты обладают способностью расширяться и пролиферировать в ответ на антигенную или цитокиновую стимуляцию в процессе, называемом гомеостатической периферической экспансией, обеспечивая раннюю, но неполную иммунную защиту от вторжения патогенов. Более полная иммунная реконституция основана на лимфопозе *de novo* из донорских стволовых клеток в костном мозге и/или тимусе, и этот процесс может занять до нескольких месяцев.

Иммунное воздействие донорских Т-клеток против остаточных лейкозных клеток хозяина является основным путем, с помощью которого аллотГСК борется с гематологическими злокачественными новообразованиями. В целом большее количество Т-клеток в трансплантате связано с более низкой частотой рецидивов, но за счет более высокой заболеваемости острой РТПХ (оРТПХ) [6]. Пациенты с ранним восстановлением противовирусных Т-клеток имеют более высокую вероятность безрецидивной выживаемости [7], а большое количество интерферон-гамма (IFN γ)-реактивных Т-клеток во время ранней иммунной реконституции связано с улучшением общей выживаемости [7—8]. Однако, конечно, не все донорские Т-клетки способствуют предполагаемому эффекту РТПЛ, и участвующие в нем специфические субпопуляции Т-клеток до сих пор не известны.

Со времени первых сообщений о вкладе иммунологического эффекта РТПЛ в успех

аллотГСК в 1980-х гг. [9] отделение эффекта РТПЛ от оРТПХ считалось «святым Граалем» аллотГСК. В стремлении усилить эффект РТПЛ без увеличения риска РТПХ были изучены два общих подхода. Первый направлен на различие субпопуляций Т-клеток, которые могут опосредовать РТПЛ, от субпопуляций, которые опосредуют оРТПХ, тем самым обеспечивая более безопасный и более эффективный состав Т-клеток с помощью трансплантационной инженерии. Второй подход пытается определить минорные антигены гистосовместимости, которые ограничены гемопоэтической линией, и вызвать специфические ответы Т-клеток против этих антигенов после ТГСК. Однако оба подхода еще не внедрены в рутинную клиническую практику. Поэтому одним из важных аспектов изучения оРТПХ является изучение биологических маркеров, которые позволяют предсказать развитие острой реакции и прогнозировать эффективность ее лечения. Принимая во внимание, что режимы профилактики оРТПХ в настоящий момент быстро меняются и модифицируются, и те факторы риска, которые были важны при классических подходах профилактики, могут утратить свое значение при использовании новых препаратов, изучение клинических факторов риска (в том числе биомаркеров) на фоне использования новых протоколов крайне значимо для современной трансплантологии.

Цель исследования — определить иммунную реконституцию лимфоцитов у пациентов после аллотГСК, установить иммунологические маркеры РТПХ.

Материал и методы

Проведен анализ иммунной реконституции 31 пациента с различными онкогематологическими заболеваниями, прошедших процедуру аллотГСК в гематологическом отделении трансплантации костного мозга ГУ «Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии» в период с 1 января 2019 г. по 31 декабря 2022 г. Клинико-демографическая характеристика пациентов представлена в таблице.

С целью мониторинга иммунной реконституции пациентов за день до начала кондиционирования, в дни +30, +60, +90, +120 после аллотГСК, а также при констатации симптомов, сопряженных с оРТПХ, проводили

Клинико-демографическая характеристика пациентов

Характеристика	Показатель
Количество пациентов	31
Возраст, лет	31,5 [18—59]
Пол:	
— жен.	14 (45,2 %)
— муж.	17 (54,8 %)
Основное заболевание:	
— ОМЛ	13 (41,9 %)
— ОЛЛ	5 (16,1 %)
— бифенотипический лейкоз	2 (6,5 %)
— неходжкинская лимфома	1 (3,2 %)
— хронический миелолейкоз	4 (12,9 %)
— миелодиспластический синдром	4 (12,9 %)
— первичный миелофиброз	2 (6,5 %)
Аллогенная трансплантация:	
— родственная	14 (45,1 %)
— неродственная:	17 (54,9 %)
• полностью совместимая	11 (64,7 %)
• частично совместимая	6 (35,3 %)
Источник трансплантата:	
— периферические стволовые клетки	21 (67,7 %)
— костный мозг	10 (32,3 %)
Режим кондиционирования (для аллоТГСК):	
— миелоаблативный	10 (32,3 %)
— сниженной интенсивности	21 (67,7 %)
— использование TOT в кондиционировании	2 (6,5 %)
Режим профилактики РТПХ:	
— циклоспорин А/такролимус + МТХ	8 (25,8 %)
— АТГ	13 (41,9 %)
— посттрансплантационный циклофосфамид	10 (32,3 %)

Примечание: TOT — тотальное облучение тела; АТГ — антиtimoцитарный глобулин.

исследование иммунных статусов пациентов. Забор периферической крови осуществляли методом венопункции в объеме 2,0 мл в пробирку с этилендиаминтетраацетатом (ЭДТА-K2). Исследование иммунных статусов проводили в клинико-диагностической лаборатории службы трансплантации костного мозга методом проточной цитофлуориметрии на проточном цитофлуориметре BD FACSCantoTM II (Becton Dickinson, США), оснащенный тремя лазерами (488, 633 и 405 нм). Данный прибор в сочетании с цифровой электроникой позволяет анализировать до 10 000 событий в секунду и поддерживать использование до 8 флуорохромов в клинических исследованиях.

Результаты и обсуждение

Исследовали популяцию долгоживущих Т-клеток памяти человека, обладающих повышенной способностью к самообновлению и мультипотентной способностью образовывать Т-клетки центральной памяти, эффекторной памяти, и эффекторные Т-клетки. Клетки

памяти определяли по экспрессии CD45RA, CD197 (CCR7) среди Т-хелперных клеток на 30, 60 и 90-е сут. после аллогенной трансплантации. Особое внимание уделялось иммунной реконституции пациентов с признаками оРТПХ, так как данное осложнение не всегда легко диагностируется и нет установленных лабораторных предикторов данного осложнения.

Нами была исследована популяция Т-хелперов среди пациентов с и без оРТПХ, а именно: «наивные» Т-хелперы с фенотипом CD45RA+CD197+; Т-хелперы центральной памяти с фенотипом CD45RA+CD197–; Т-хелперы эффекторной памяти CD45RA–CD197–; «терминально-дифференцированные эффекторные» Т-хелперы CD45RA–CD62L+ (рис. 1).

Установлено, что у пациентов, у которых не развилась оРТПХ, в периферической крови с +30-х сут. определяется и сохраняется пул «наивных» Т-клеток, тогда как у пациентов с оРТПХ на +30-е сут. полностью отсутствует данный пул клеток, а Т-клетки памяти представлены только Т-хелперами центральной и эффекторной памяти. Также у пациентов

с оРТПХ на +60-е и +90-е сут. после аллогенной трансплантации популяционный состав Т-хелперов характеризовался снижением пула «наивных» Т-клеток менее 10 %, а Т-клетки памяти были представлены преимущественно Т-хелперами центральной и эффекторной памяти.

При сравнительном анализе групп пациентов с и без оРТПХ статистически значимым в последующем развитии оРТПХ стал уровень «наивных» Т-хелперов менее 10 % ($p = 0,00999$) на +60-е и +90-е сут. после аллотГСК (рис. 2).

Снижение уровня «наивных» клеток при оРТПХ может указывать на миграцию

их в различные органы и ткани, при этом в периферической крови регистрируются Т-хелперы центральной и эффекторной памяти. Среди исследуемых пациентов, у которых в последующем констатировали оРТПХ, на +30-е сут. наблюдался высокий уровень экспрессии рецептора IL-2R, CD25 (≥ 15 %, $p = 0,049$) (рис. 3), что может также указывать на наличие пролиферативных процессов. Такая же ситуация сохранялась и на +60-е сут. после аллотГСК — уровень экспрессии рецептора IL-2R (CD25) составил 15 % и более у пациентов с развившейся в последующем оРТПХ.

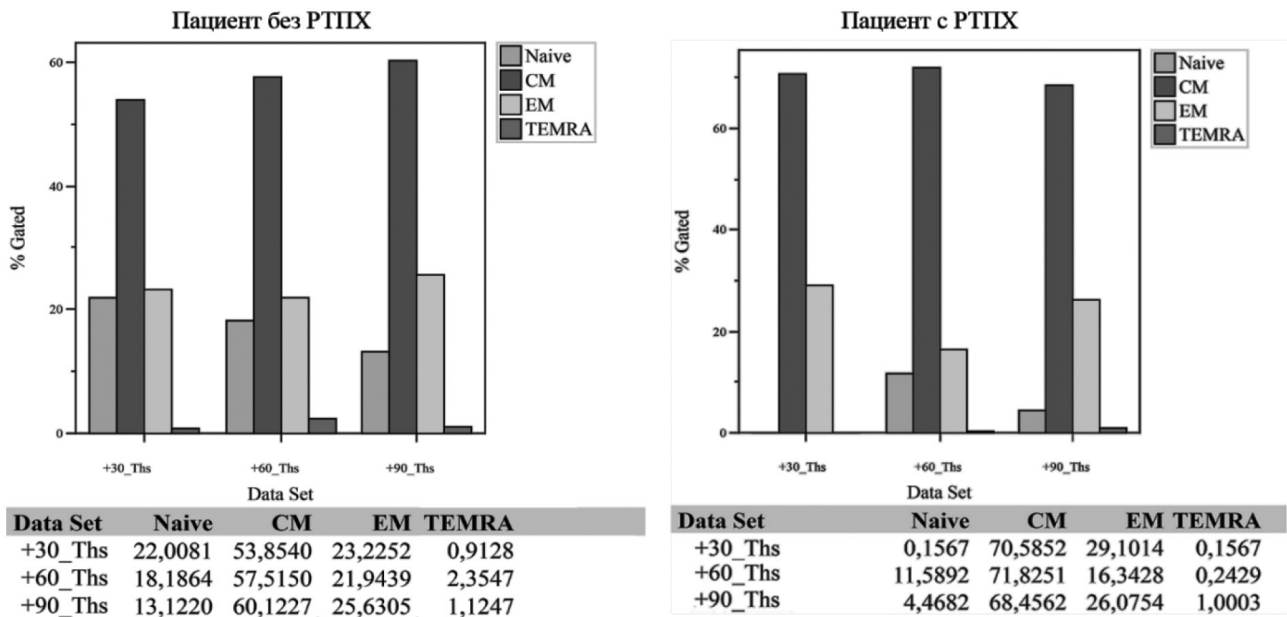


Рис. 1. Распределение Т-хелперных клеток по субпопуляциям клеток памяти на 30, 60 и 90-е сут. после аллогенной трансплантации костного мозга: Naive — «наивные» Т-хелперы; CM — Т-хелперы центральной памяти; EM — Т-хелперы эффекторной памяти; TEMRA — «терминально-дифференцированные эффекторные» Т-хелперы

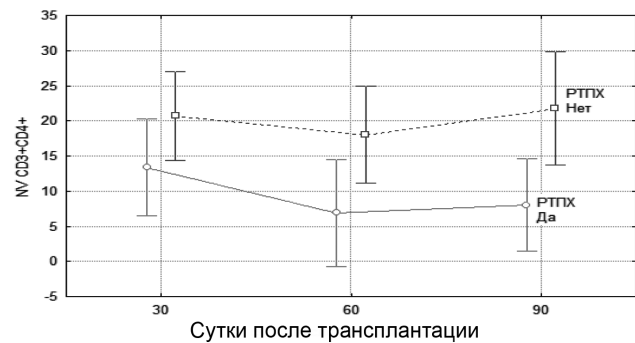


Рис. 2. Уровень «наивных» Т-хелперных клеток на 30, 60 и 90-е сут. после аллогенной трансплантации костного мозга

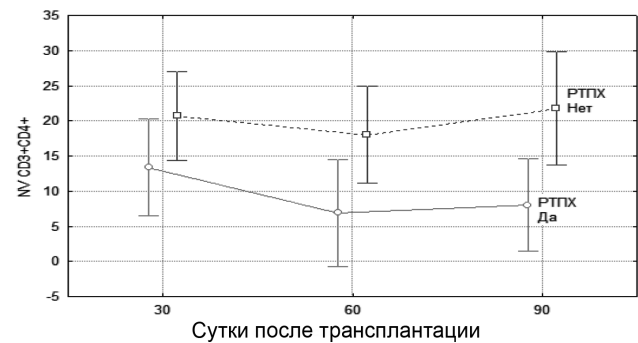


Рис. 3. Уровень экспрессии CD25 CD3+ клетками на 30, 60 и 90-е сут. после аллогенной трансплантации костного мозга

Также мы исследовали экспрессию хемокиновых рецепторов на хелперных Т-клетках центральной и эффекторной памяти. Считается, что именно клетки центральной и эффекторной памяти, но не «терминально-дифференцированные» или «наивные» Т-хелперы, способны менять свою поляризацию и спектр продуцируемых цитокинов. На основании экспрессии CXCR5 и рецепторов «хоуминга» в лимфоидную ткань CCR7 и CD62L Т-хелперами был описан принципиально новый тип Th—Tfh, основной функцией которых является

участие в регуляции и запуске специфического гуморального ответа, опосредованного В-лимфоцитами, за счет синтеза IL-21.

У пациентов с РТПХ установлено снижение или полное отсутствие Tfh в Т-хелперах как центральной, так и эффекторной памяти, что указывает на нарушение регуляции специфического гуморального ответа, опосредованного В-лимфоцитами. Результаты определения типов Т-хелперов центральной и эффекторной памяти у пациентов без и с оРТПХ на +30-е сут. после аллотГСК представлены соответственно на рис. 4 и 5.

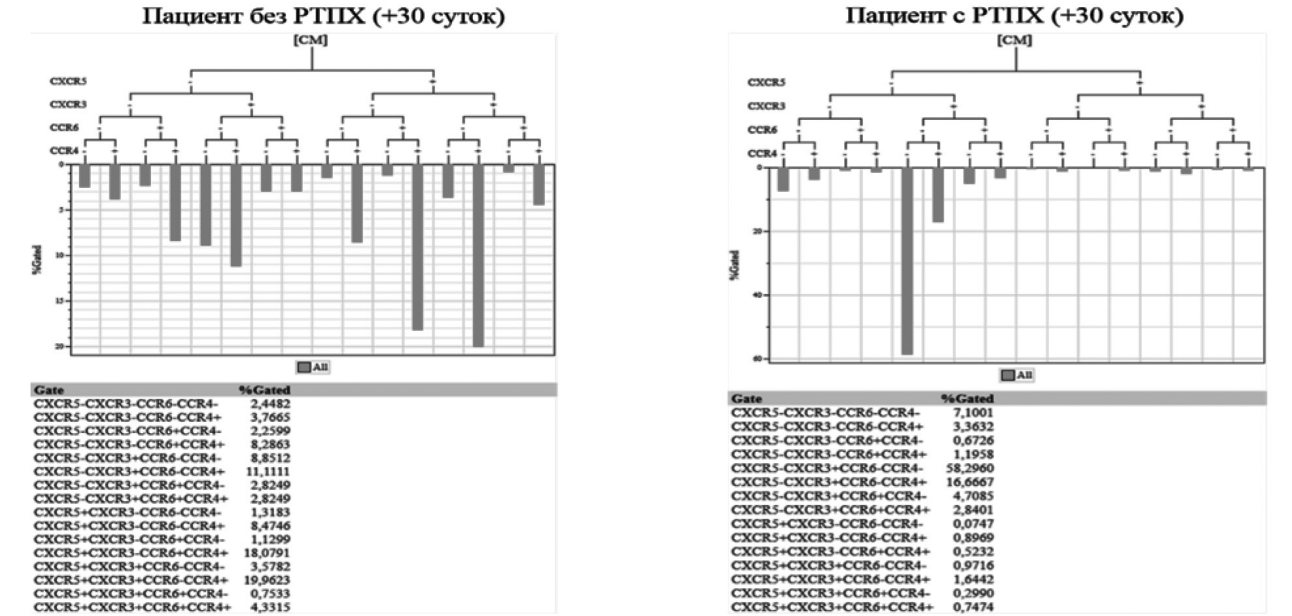


Рис. 4. Типы Т-хелперов центральной памяти у пациентов без и с оРТПХ на +30-е сут. после аллотГСК

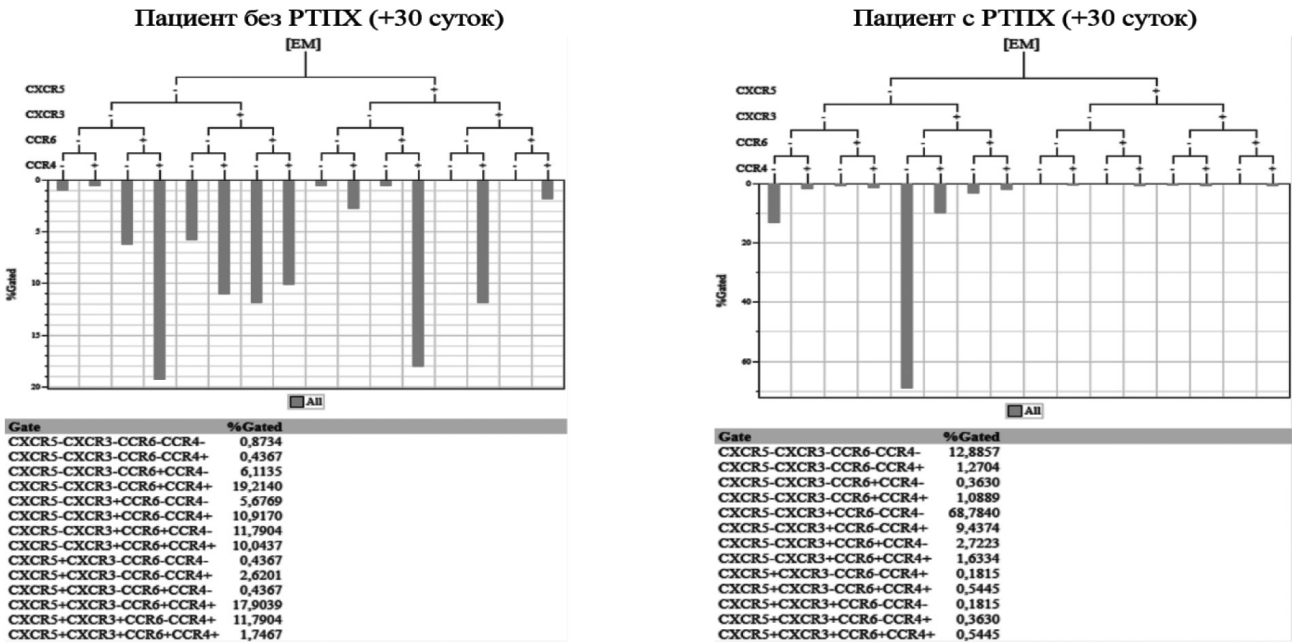


Рис. 5. Типы Т-хелперов эффекторной памяти у пациентов без и с оРТПХ на +30-е сут. после аллотГСК

Аналогичные различия среди Т-хелперов центральной и эффекторной памяти у пациентов с и без оРТПХ сохранялись и на +60-е, и на +90-е сут. после аллотГСК (рис. 6—9).

Хемокины (хемотаксические цитокины) представляют собой большое семейство небольших секретируемых белков, которые передают сигналы через гептаспиральные хе-

мокиновые рецепторы, связанные с G-белком на поверхности клетки. Они наиболее известны своей способностью стимулировать миграцию клеток, в первую очередь лейкоцитов. Следовательно, хемокины играют центральную роль в развитии и гомеостазе иммунной системы и участвуют во всех защитных или деструктивных иммунных и воспалительных реакциях.

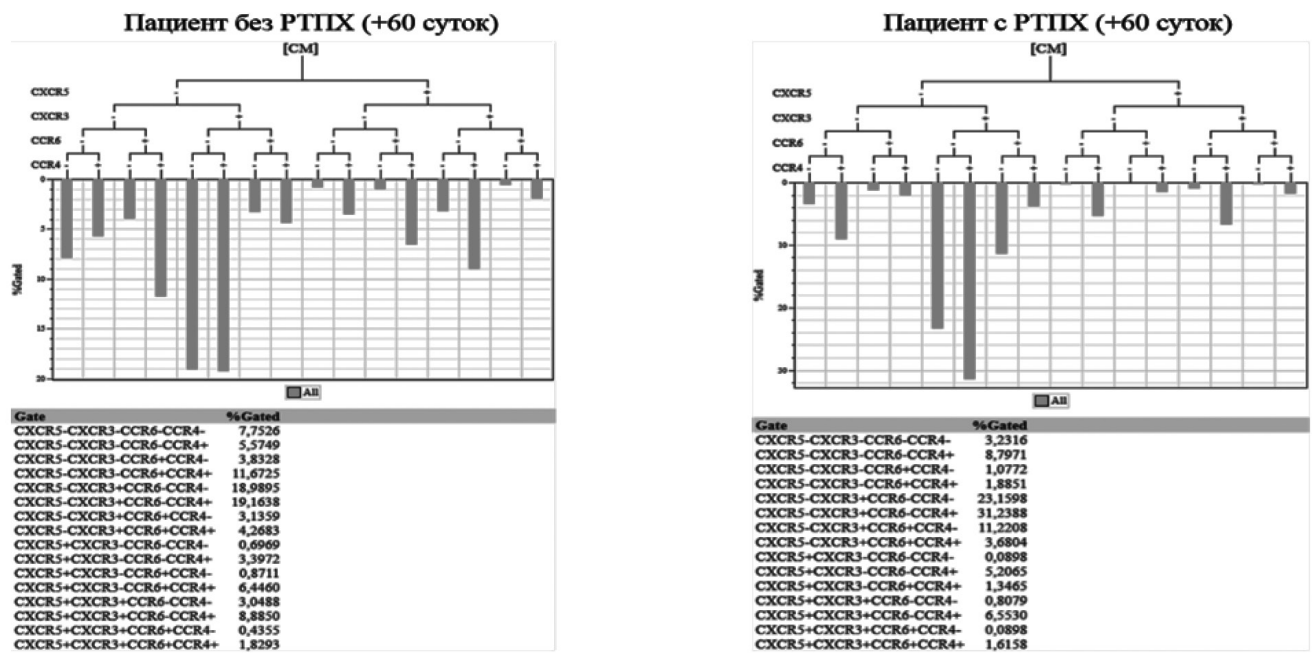


Рис. 6. Типы Т-хелперов центральной памяти у пациентов без и с оРТПХ на +60-е сут. после аллотГСК

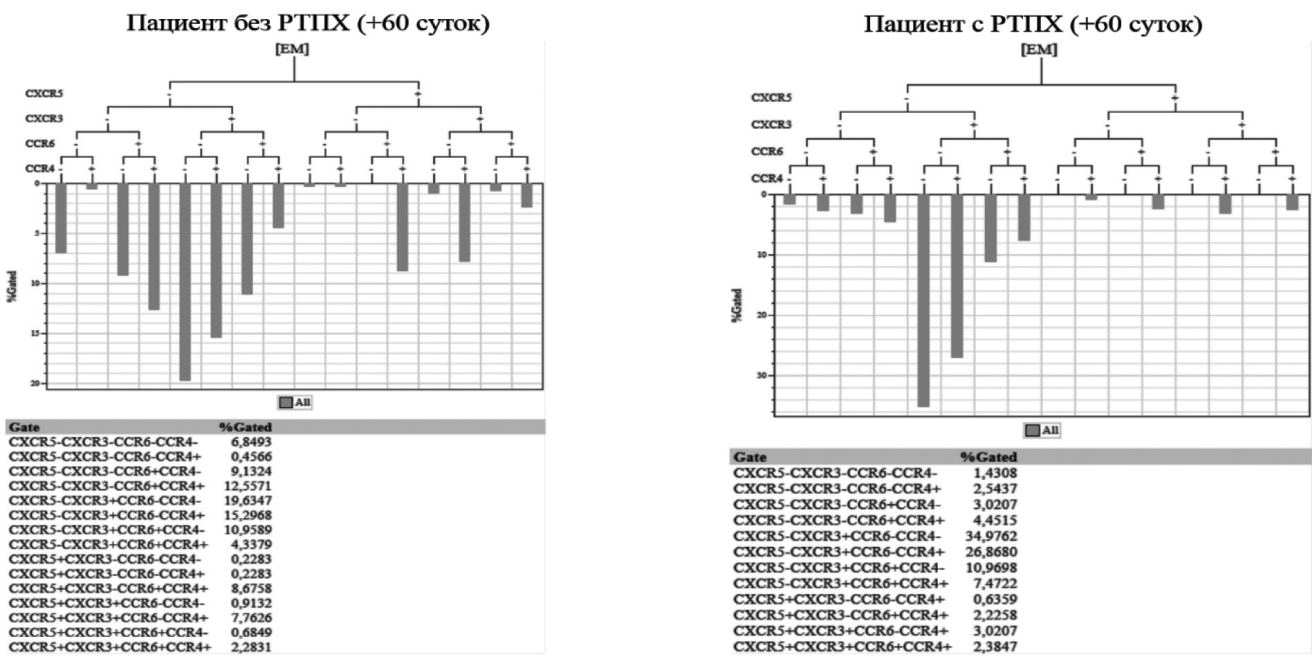


Рис. 7. Типы Т-хелперов эффекторной памяти у пациентов без и с оРТПХ на +60-е сут. после аллотГСК

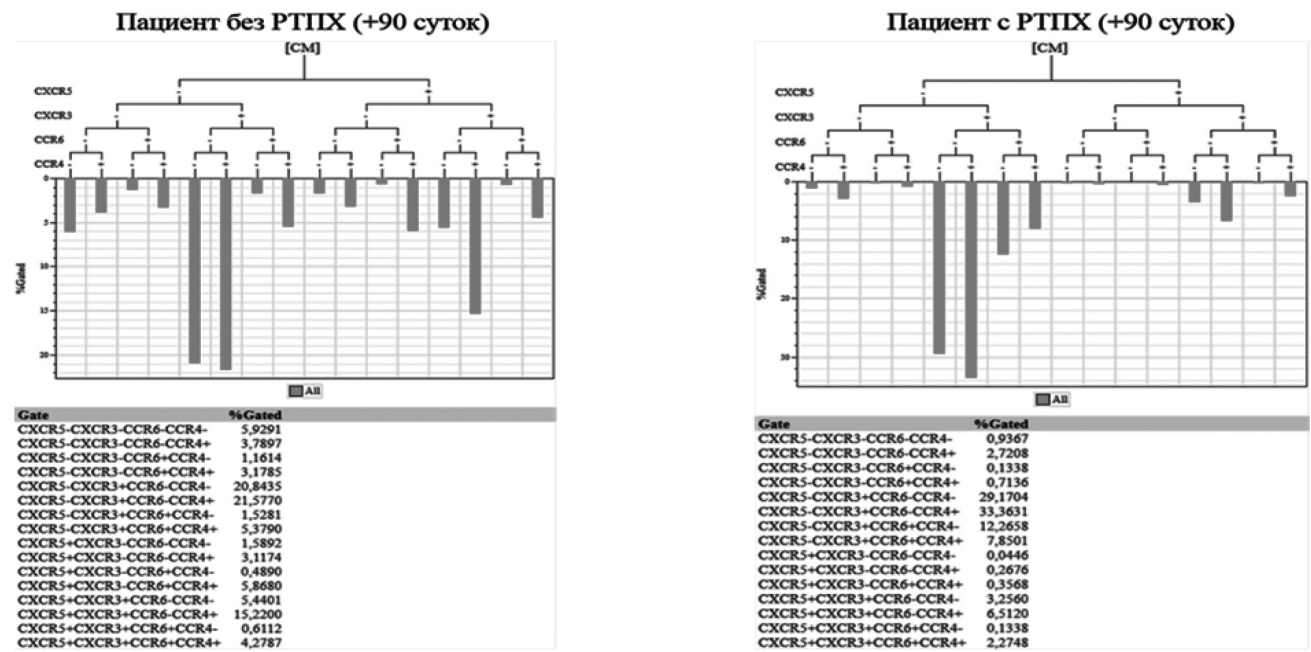


Рис. 8. Типы Т-хелперов центральной памяти у пациентов без и с ОРТПХ на +90-е сут. после аллотГСК

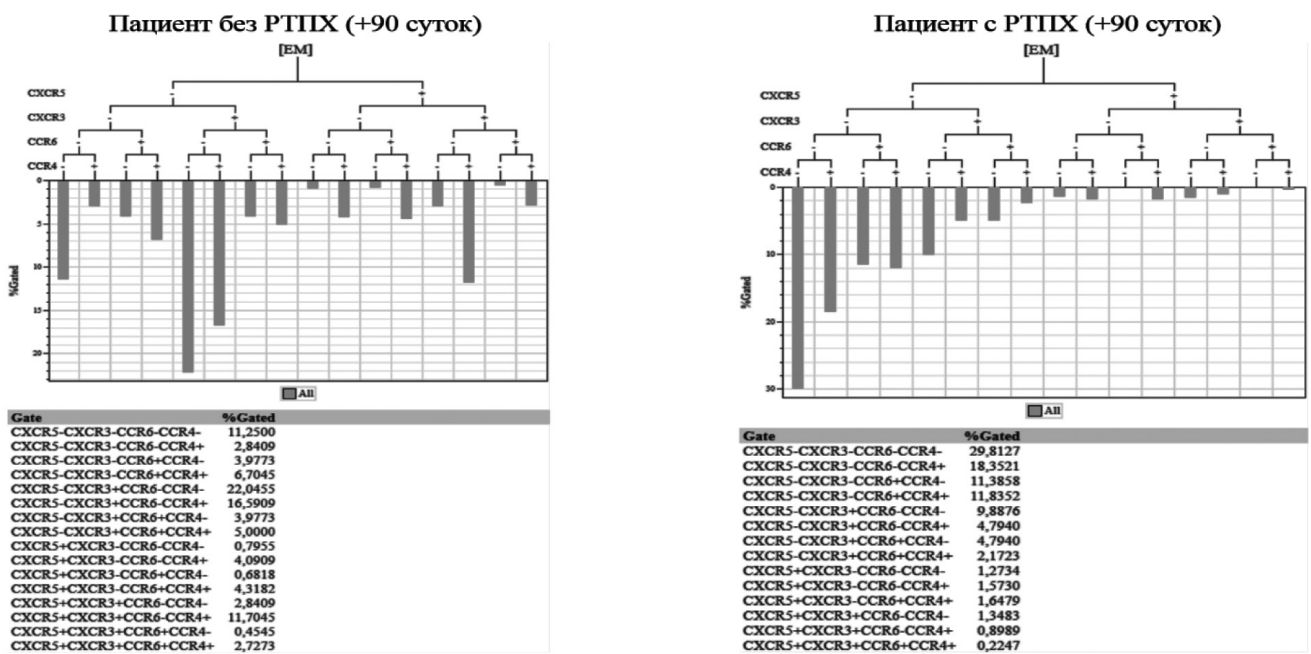


Рис. 9. Типы Т-хелперов эффекторной памяти у пациентов без и с ОРТПХ на +90-е сут. после аллотГСК

Выводы

С момента выполнения первой аллотГСК в 1968 г. специалисты пытаются найти золотую середину между ОРТПХ и РТПЛ, достигнув максимального эффекта после аллотГСК с минимальными осложнениями для пациента в виде ОРТПХ. Поэтому в мире не прекращаются работы по изучению различных особенностей посттрансплантационного периода,

отдельно выделяя иммунную реконституцию. Глубокое понимание данного процесса позволит эффективнее предотвращать инфекционные осложнения, а также позволит персонализировать проводимую профилактику и терапию ОРТПХ. В результате проведенной работы нами были установлены следующие особенности иммунного восстановления у пациентов после аллотГСК.

1. У пациентов с оРТПХ на +30-е сут. полностью отсутствует пул «наивных» Т-хелперов, а Т-клетки памяти представлены только Т-хелперами центральной и эффекторной памяти.

2. У пациентов с оРТПХ на +60-е и +90-е сут. после аллогенной трансплантации популяционный состав Т-хелперов характеризовался снижением пула «наивных» Т-клеток менее 10 %, а Т-клетки памяти представлены преимущественно Т-хелперами центральной и эффекторной памяти.

3. Для пациентов, у которых в последующем была констатирована оРТПХ, статистически значимым в развитии оРТПХ стал уровень «наивных» Т-хелперов менее 10 % ($p = 0,00999$) на +60-е и +90-е сут. после аллотГСК.

4. Для пациентов, у которых в последующем была констатирована оРТПХ, статистически значимым в развитии данного осложнения установлен уровень экспрессии рецептора IL-2R (CD25) 15 % и более на +30-е и +60-е сут. после аллотГСК.

5. У пациентов с оРТПХ установлено снижение или полное отсутствие Tfh в Т-хелперах как центральной, так и эффекторной памяти во все дни исследований, что указывает на нарушение регуляции специфического гуморального ответа, опосредованного В-лимфоцитами.

Полученные результаты можно использовать как «ранние предикторы» развития оРТПХ, что позволит при возможности усилить иммуносупрессивную терапию данной категории пациентов, улучшить результативность проводимых аллотГСК, а также расширить использование альтернативных доноров (гаплоидентичные, частично несовместимые).

ЛИТЕРАТУРА

1. Berger, M. Lymphocyte subsets recovery following allogeneic bone marrow transplantation (BMT): CD4+ cell count and transplant-related mortality / M. Berger, O. Figari, B. Bruno // *Bone marrow transplantation*. — 2008. — Vol. 41, № 1. — P. 55—62.
2. Buckner, J. H. Mechanisms of impaired regulation by CD4(+)CD25(+)FOXP3(+) regulatory T cells in human autoimmune diseases / J. H. Buckner // *Nature reviews. Immunology*. — 2010. — Vol. 10, № 12. — P. 849—859.
3. Bueger, M. Tissue distribution of human minor histocompatibility antigens. Ubiquitous versus restricted tissue distribution indicates heterogeneity among human cytotoxic T lymphocyte-defined non-MHC antigens / M. Bueger, A. Bakker, J. J. Van Rood // *Journal of immunology*. — 1992. — Vol. 149, № 5. — P. 1788—1794.
4. Carlson, M. J. In vitro differentiated TH17 cells mediate lethal acute graft-versus-host disease with severe cutaneous and pulmonary pathologic manifestations / M. J. Carlson, M. L. West, J. M. Coghill // *Blood*. — 2009. — Vol. 113, № 6. — P. 1365—1374.
5. Chklovskaja, E. Reconstitution of dendritic and natural killer-cell subsets after allogeneic stem cell transplantation: Effects of endogenous flt3 ligand / E. Chklovskaja, P. Nowbakht, C. Nissen // *Blood*. — 2004. — Vol. 103, № 10. — P. 3860—3868.
6. Cohen, J. L. CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T Cells: new therapeutics for graft-versus-host disease / J. L. Cohen, A. Trenado, D. Vasey // *J. Exp. Med.* — 2002. — Vol. 196, № 3. — P. 401—406.
7. Robb, R. J. The interferon-dependent orchestration of innate and adaptive immunity after transplantation / R. J. Robb, G. R. Hill // *Blood*. — 2012. — Vol. 119, № 23. — P. 5351—5358.
8. Serody, J. S. T-lymphocyte production of macrophage inflammatory protein-1alpha is critical to the recruitment of CD8(+) T cells to the liver, lung, and spleen during graft-versus-host disease / J. S. Serody, S. E. Burkett, A. Panoskaltsis-Mortari // *Blood*. — 2000. — Vol. 9, № 9. — P. 2973—2980.

Поступила 03.10.2024
Принята к печати 16.11.2024

Контактная информация:

Нечай Оксана Валерьевна — врач-гематолог гематологического отделения трансплантации костного мозга № 3.
Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии.

Ул. Семашко, 8, 220045, г. Минск.
Сл. тел. +375 17 207-96-34.

Участие авторов:

Концепция и дизайн исследования: О. В. Н., Н. Ф. М.
Сбор информации и обработка материала: О. В. Н., В. В. С., В. Ю. Г.
Написание текста: О. В. Н., В. В. С.
Редактирование: Н. Ф. М.

Конфликт интересов отсутствует.