

УДК 616.411-006.44:616-08-039.35

Д.С. Баранова<sup>1</sup>, Л.В. Сахно<sup>1</sup>, И.В. Крючкова<sup>1</sup>, Н.В. Пронкина<sup>1</sup>, М.А. Тихонова<sup>1</sup>, Е.В. Баторов<sup>1</sup>,  
 А.В. Гилевич<sup>1</sup>, В.В. Сергеевичева<sup>1</sup>, С.А. Сизикова<sup>1</sup>, Г.Ю. Ушакова<sup>1</sup>, А.А. Останин<sup>1</sup>,  
 Т.И. Поспелова<sup>2</sup>, Е.Р. Черных<sup>1</sup>

## СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СУБПОПУЛЯЦИОННОГО СОСТАВА И ЦИТОКИН-ПРОДУЦИРУЮЩЕЙ ФУНКЦИИ КЛЕТОК ПРОДУКТА СЕПАРАЦИИ БОЛЬНЫХ ЛИМФОМАМИ И ОСТРЫМИ ЛЕЙКОЗАМИ

<sup>1</sup> НИИ клинической иммунологии СО РАМН (Новосибирск)

<sup>2</sup> Новосибирский государственный медицинский университет (Новосибирск)

Проанализированы субпопуляционный состав и цитокиновый профиль продуктов афереза больных лимфомами и острыми лейкозами. Показано, что продукты сепарации больных острыми лейкозами характеризуются более высоким относительным содержанием наивных Т-клеток, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>-клеток и общего количества Т-лимфоцитов — на уровне тенденции, и более низким количеством гранулоцитов. Обнаружено достоверное повышение относительного количества активно делящихся CD34<sup>+</sup>-клеток (в фазе S, G<sub>2</sub>/M), полученных у больных острыми лейкозами, а в сепаратах пациентов с лимфомами наблюдалось увеличение содержания CD34<sup>+</sup>-клеток в фазе G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>. Клетки сепаратов больных острыми лейкозами также отличались более высокими уровнями продукции провоспалительных цитокинов: IL-1, IL-6, MIP-1β, TNF-α, IL-8, IFN-γ (последние два — в виде тенденции), и цитокинов, стимулирующих гуморальный иммунный ответ (IL-4 и — в виде тенденции — IL-10). Имеющиеся различия не сказывались на эффективности ранней реконституции лимфоцитов.

**Ключевые слова:** трансплантация гемопоэтических стволовых клеток, продукт афереза

## THE COMPARATIVE ANALYSIS OF GRAFT CELL SUBTYPES AND ITS CYTOKINE PRODUCTION OF LYMPHOMA AND LEUCOSIS PATIENTS

D.S. Baranova<sup>1</sup>, L.V. Sakhno<sup>1</sup>, I.V. Kruchkova<sup>1</sup>, N.V. Pronkina<sup>1</sup>, M.A. Tikhonova<sup>1</sup>,  
 E.V. Batorov<sup>1</sup>, A.V. Gilevich<sup>1</sup>, V.V. Sergeevicheva<sup>1</sup>, S.A. Sizikova<sup>1</sup>, G.Yu. Ushakova<sup>1</sup>,  
 A.A. Ostanin<sup>1</sup>, T.I. Pospelova<sup>2</sup>, E.R. Chernykh<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Federal State Research Institute of Clinical Immunology SB RAMS, Novosibirsk

<sup>2</sup>Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia

Cell subtypes and cytokine profile of apheresis products collected from lymphoma and acute leucosis patients were analyzed. It was shown, that acute leucosis patients' grafts contained higher relative numbers of naïve T-cells, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> T-cells, T-lymphocytes (non-significant trend) and lower counts of granulocytes. Significant increase of relative numbers of dividing CD34<sup>+</sup> cells (in S, G<sub>2</sub>/M phases of the cell cycle) was demonstrated in acute leucosis patients' grafts. In lymphoma grafts the levels of CD34<sup>+</sup> cells in G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phases were found to be increased. Cells isolated from grafts of acute leucosis patients characterized by higher levels of proinflammatory cytokines production, such as IL-1, IL-6, MIP-1β, TNF-α, IL-8, IFN-γ (the last two ones — non-significant trend) and cytokines, essential for humoral immune response (IL-4 and — in trend — IL-10). The existing differences didn't influence on effectiveness of early lymphocyte recovery.

**Key words:** autologous hematopoietic stem cell transplantation, apheresis product

Высокодозная химиотерапия с последующей аутологичной трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток (АТГСК) является одним из эффективных методов лечения гематологических заболеваний. В последние годы большое внимание уделяется содержащимся в продукте афереза иммунокомпетентным клеткам и их функциональной активности, как важным факторам, влияющим на исход АТГСК.

Гомеостатическая пролиферация трансплантируемых зрелых лимфоцитов — один из основных путей восстановления популяций Т-клеток после АТГСК. Со сроками выхода из лимфопении прямо коррелирует количество реинфузируемых лимфоцитов, либо отдельных субпопуляций: CD8<sup>+</sup>-клеток, NK-клеток [1, 5, 6]. При этом раннее восстановление лимфоцитов является независимым фактором увеличения общей выживаемости и времени до прогрессии заболевания после

АТГСК при неходжкинских лимфомах, лимфомах Ходжкина, миеломной болезни, остром миелоидном лейкозе [7]. Трансплантируемые моноциты и дендритные клетки, помимо участия в восстановлении собственных популяций, также рассматриваются как источник цитокинов, необходимых для быстрой и эффективной реконституции лимфоцитов. [3, 4, 8], а количество реинфузируемых гранулоцитов, наоборот, негативно коррелирует с продолжительностью цитопении [9]. Не изучено влияние регуляторных Т-клеток (Treg) на содержание продукта афереза при имеющихся данных о возможном увеличении их количества в связи с резистентностью к химиотерапии [2].

Несмотря на идентичность мобилизации и сепарации гемопоэтических стволовых клеток (ГСК), неизбежны, но не изучены различия в субпопуляционном составе и функциональной активности клеток продуктов сепарации у больных

лимфомами и лейкозами, связанные с патогенезом данных болезней и, соответственно, подходами к терапии. При этом острые лейкозы по сравнению с лимфомами отличаются более агрессивным течением с меньшим ответом на проводимую терапию и остаются нерешенной проблемой современной медицины.

**Целью** настоящей работы стала сравнительная оценка субпопуляционного состава и цитокинового профиля клеток продукта афереза больных лимфомами и острыми лейкозами.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Пациенты.** В исследование было включено 40 больных, из них 29 человек со злокачественными лимфомами и 11 — с острыми лейкозами, 19 мужчин и 21 женщина в возрасте от 19 до 58 лет, получивших АТГСК за период с 2010 по 2012 г. Обследование и лечение пациентов проводилось на базе отделения гематологии и трансплантации костного мозга НИИ клинической иммунологии СО РАМН и Городского Гематологического Центра г. Новосибирска. Неходжкинские лимфомы (НХЛ) диагностировалась у 7, лимфома Ходжкина (ЛХ) — у 11, множественная миелома (ММ) — у 11, острый миелоидный лейкоз — у 9 и острый лимфобластный лейкоз — у 2 пациентов. Забор крови и все иммунологические исследования проводили после получения письменного информированного согласия пациентов.

**Мобилизация периферических гемопоэтических стволовых клеток (ГСК).** Мобилизацию ГСК у большинства больных проводили с использованием различных режимов химиотерапии с последующим введением препаратов гранулоцитарного колоние-стимулирующего (Г-КСФ) фактора 5 мкг/кг/день. Г-КСФ в режиме монотерапии (10 мкг/кг/день) применялся только у 3 больных острым лейкозом. Процедуру афереза начинали по достижении концентрации  $1 \times 10^4$  CD34<sup>+</sup> клеток/мл периферической крови и продолжали до получения  $\geq 2,0 \times 10^6$  CD34<sup>+</sup> клеток/кг, используя сепараторы клеток крови AS TEC 204 (Fresenius) и Spectra LRS 07 (COBE).

Образцы для исследования брались сразу после завершения процедуры сепарации из пакета с продуктом афереза, при проведении нескольких сеансов — после первого. Забор периферической крови проводился в день сепарации и на момент выхода из лимфопении (лимфоциты  $\geq 0,5 \times 10^9$ /л).

**Оценка клеточных популяций.** Общий анализ крови проводили на автоматическом гематологическом анализаторе Hema-Screen 18 (Hospitex Diagnostics, Italy). Относительное содержание субпопуляций Т-лимфоцитов (CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>), в том числе T<sub>per</sub> (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>, CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>), NK-клеток (CD16<sup>+</sup>), В-лимфоцитов (CD19<sup>+</sup>), моноцитов (CD14<sup>+</sup>) оценивали в лейкозвеси методом проточной цитофлюориметрии (FACSCalibur, Becton Dickinson), используя FITC-, PE- и PerCP-меченные

моноклональные антитела («Сорбент», Россия, Becton Dickinson, США).

**Оценка цитокинового профиля.** Продукцию цитокинов (IL-1, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17, G-CSF, MCP-1, MIP-1b) оценивали в супернатантах нестимулированных и стимулированных липополисахаридом 10 мкг/мл (LPS *E. coli* 0111:B4, Sigma-Aldrich) клетках ( $1,5 \times 10^6$ /мл) продукта афереза, культивированных в течение 48 часов в присутствии 5% FCS (Биолот), методом проточной флюориметрии на двухлучевом лазерном автоматизированном анализаторе Bio-Plex Protein Assay System («Bio-Rad», США) с использованием коммерческих тест-систем 17-Plex в соответствии с инструкцией фирмы-производителя.

Статистическую обработку данных проводили при помощи пакета программ Statistica 6.0 для Windows (StatSoft). Для оценки значимости различий между показателями продуктов афереза больных использовали критерий Вилкоксона-Манна-Уитни. Различия считали достоверными при уровне значимости  $p < 0,05$ .

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Чтобы оценить количественные и функциональные особенности продуктов афереза в зависимости от заболевания был проведен сравнительный анализ относительного количества популяций клеток сепарата и спонтанную и стимулированную продукцию клетками цитокинов у больных с лимфомами ( $n = 29$ ) и острыми лейкозами ( $n = 11$ ). Сравнимые группы значительно не различались по возрасту, полу, а также режимам мобилизации и количеству вводимых CD34<sup>+</sup> клеток (медиана  $4,5 \times 10^6$ /кг и  $3,8 \times 10^6$ /кг у пациентов с лимфомами и острыми лейкозами, соответственно).

Продукты афереза, полученные от больных острыми лейкозами, характеризовались более высоким относительным количеством наивных CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> лимфоцитов (табл. 1) при статистически не отличающемся содержании клеток памяти и достоверным увеличением индекса CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> ( $p = 0,015$ ). Относительное содержание CD4<sup>+</sup>- и CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов в сравниваемых группах не отличались, однако была выявлена тенденция к более высокому содержанию CD3<sup>+</sup> Т-клеток в сепаратах больных острыми лейкозами (табл. 1).

Продукты афереза пациентов с лимфомами отличались высоким (более чем в 2–3 раза) по сравнению с оппозитной группой содержанием нейтрофилов всех стадий созревания, при этом достоверное увеличение показано для юных нейтрофилов и гранулоцитов в целом (табл. 1).

Зарегистрировано одинаковое относительное количество В-лимфоцитов, NK-клеток, а также моноцитов в обеих группах обследованных пациентов.

Анализ содержания Трег показал, что относительное количество CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> и CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> Т-клеток в продуктах афереза боль-

Таблица 1

Относительное содержание субпопуляций клеток в продукте афереза

Параметры <i>M ± SEM, (Me)</i>	Больные с лимфомами (n = 29)	Больные с острыми лейкозами (n = 11)	Достоверность различий
CD3 <sup>+</sup> , %	66,3 ± 2,8 (67)	75 ± 5,1 (82)	<i>p</i> = 0,078
CD4 <sup>+</sup> CD45RA <sup>+</sup> , %	9,99 ± 1,5 (7)	13,8 ± 2,1 (13)	<i>p</i> = 0,076
CD8 <sup>+</sup> CD45RA <sup>+</sup> , %	8,3 ± 0,8 (7)	11,98 ± 1,6 (10)	<i>p</i> * = 0,030
CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>high</sup> , %	1,49 ± 0,2 (1,2)	2,3 ± 0,25 (2,3)	<i>p</i> * = 0,011
Юные, %	6,14 ± 1,14 (4)	1,63 ± 0,64 (0)	<i>p</i> * = 0,029
Гранулоциты, %	23,37 ± 3,17 (19)	7,63 ± 1,82 (6)	<i>p</i> * = 0,010
CD34 <sup>+</sup> -клетки в фазе G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	97,35 ± 0,52 (98)	93,69 ± 1,96 (95,65)	<i>p</i> * = 0,007
CD34 <sup>+</sup> -клетки в фазе S, G <sub>2</sub> /M	2,55 ± 0,47 (2)	5,99 ± 2,03 (4,35)	<i>p</i> * = 0,042

Примечания: \* – *p* < 0,05, достоверность различий по U-критерию Вилкоксона – Манна – Уитни.

ных не различалось, в отличие от CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>-клеток, относительное количество которых было достоверно больше в сепаратах больных острыми лейкозами (табл. 1).

При изучении гемопоэтических предшественников было обнаружено, что в продуктах сепарации больных острыми лейкозами достоверно повышено относительное количество CD34<sup>+</sup>-клеток в фазе S, G<sub>2</sub>/M, т.е., активно делящихся, а в сепаратах пациентов с лимфомами, наоборот, наблюдалось увеличение содержания CD34<sup>+</sup>-клеток в фазе G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> (табл. 1)

Анализ цитокин-секреторной активности показал, что клетки продуктов сепарации, полученные от пациентов с острыми лейкозами, характеризовались более высокой спонтанной продукцией IL-8 (на уровне тенденции) и MIP-1β, LPS-стимулированной продукцией IL-1, IL-4, IL-6, TNFα и G-CSF, а также тенденцией к более высокой LPS-стимулированной секреции IFN-γ и IL-10 (табл. 2).

Анализ ранней реконституции лимфоцитов в обеих группах пациентов, не выявил достоверных различий. Восстановление лимфоцитов до

0,5 × 10<sup>9</sup> и более клеток/л в сроки до 15 дней чаще наблюдалось у пациентов с лимфомами (у 86 % по сравнению с 60 % пациентов с острыми лейкозами (P<sub>ТКФ</sub> = 0,13).

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Таким образом, продукты сепарации больных острыми лейкозами отличались более высоким содержанием наивных Т-клеток и регуляторных Т-клеток, с тенденцией к повышенному содержанию Т-лимфоцитов, при сниженном относительном количестве гранулоцитов. Также обращает на себя внимание более высокая провоспалительная активность клеток сепарата больных острыми лейкозами и более высокая способность к продукции цитокинов, поддерживающих гуморальный иммунный ответ (IL-4, IL-10). Выявление более низкой продукции провоспалительных и иммунорегуляторных цитокинов в продукте афереза больных лимфомами возможно связано с наличием в сепаратах у этих пациентов более высокого относительного количества гранулоцитарных клеток, что может быть обусловлено присутствием в по-

Таблица 2

Продукция цитокинов клетками продукта афереза

Параметры <i>M ± SEM, (Me), пг/мл</i>	Больные с лимфомами (n = 24)	Больные с острыми лейкозами (n = 10)	Достоверность различий
IL-1-стимулированная	2316 ± 226 (2434)	3360 ± 290 (3553)	<i>p</i> * = 0,015
IL-6-стимулированная	10213 ± 891 (10653)	13226 ± 611 (12910)	<i>p</i> * = 0,025
IFN-γ-стимулированная	1272 ± 110 (1213)	1619 ± 90 (1610)	<i>p</i> = 0,056
TNF-α-стимулированная	2311 ± 721 (1086)	3723 ± 1111 (2225)	<i>p</i> * = 0,037
IL-4-стимулированная	13,5 ± 0,7 (13,9)	16,8 ± 0,8 (17,3)	<i>p</i> * = 0,009
IL-8-спонтанная	4341 ± 245 (4502)	5105 ± 413 (4742)	<i>p</i> = 0,064
IL-10-стимулированная	918 ± 141 (791)	1500 ± 273 (1353)	<i>p</i> = 0,058
MIP1β-спонтанная	2912 ± 316 (3024)	4272 ± 478 (4528)	<i>p</i> * = 0,028
G-CSF-стимулированная	3785 ± 418 (4083)	6017 ± 749 (5971)	<i>p</i> * = 0,009

Примечания: \* – *p* < 0,05, достоверность различий по U-критерию Вилкоксона – Манна – Уитни.

пуляции гранулоцитов миелоидных супрессорных клеток [10]. Невысокая частота раннего восстановления лимфоцитов после АТГСК при достаточном количестве реинфузируемых лимфоцитов, возможно, является следствием более агрессивных режимов химиотерапии, оказывающих негативное влияние на пролиферативный потенциал клеток. Дальнейшие исследования, в частности, анализ исходов АТГСК у больных лимфомами и острыми лейкозами, а также изучение взаимосвязи исходов с особенностями субпопуляционного состава и функциональной активностью трансплантируемых клеток, возможно, позволит выявить новые предикторы исходов и обосновать новые стратегии оптимизации ТГСК.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Atta E.H., de Azevedo A.M., Maiolino A. High CD8+ lymphocyte dose in autograft predicts early absolute lymphocyte count recovery after peripheral hematopoietic stem cell transplantation // *Am. J. Hematol.* — 2009. — Vol. 84, N 1. — P. 21–28.
2. Condomines M., Quittet P., Lu Z.Y. Functional regulatory T cells are collected in stem cell autografts by mobilization with high-dose cyclophosphamide and granulocyte colony-stimulating factor // *J. Immunol.* — 2006. — Vol. 176, N 11. — P. 6631–6639.
3. Damiani D., Stocchi R., Masolini P. Dendritic cell recovery after autologous stem cell transplantation // *Bone Marrow Transplantation.* — 2002. — Vol. 30. — P. 261–266.
4. Dean R., Masci P., Pohlman B. Dendritic cells in autologous hematopoietic stem cell transplantation for diffuse large B-cell lymphoma: graft content and post transplant recovery predict survival // *Bone Marrow Transplantation.* — 2005. — Vol. 36. — P. 1049–1052.
5. Hiwase D.K., Hiwase S., Bailey M., Bollard G. et al. Higher infused lymphocyte dose predicts higher lymphocyte recovery, which in turn, predicts superior overall survival following autologous hematopoietic stem cell transplantation for multiple myeloma // *Biol Blood Marrow Transplant.* — 2008. — Vol. 14, N 1. — P. 116–124.
6. Kim D.G., Won D.I., Lee N.Y. Non-CD34+ cells, especially CD8+ cytotoxic T cells and CD56+ natural killer cells, rather than CD34 cells, predict early engraftment and better transplantation outcomes in patients with hematologic malignancies after allogeneic peripheral stem cell transplantation // *Biol Blood Marrow Transplant.* — 2006. — Vol. 12. — P. 719–728.
7. Porrata L.F., Litzow M.R., Markovic S.N. Graft engineering for autologous stem cell transplantation // *Gene Therapy and Molecular Biology.* — 2005. — Vol. 9. — P. 121–134.
8. Porrata L.F., Inwards D.J., Micallef I.N. Interleukin-15 Affects Patient Survival through Natural Killer Cell Recovery after Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Non-Hodgkin Lymphomas // *Clin Dev Immunol.* — 2010. — Vol. 14. — P. 13.
9. Trébéden-Negre H., Rosenzweig M., Tanguy M.-L. Delayed recovery after autologous peripheral hematopoietic cell transplantation: potential effect of a high number of total nucleated cells in the graft // *Transfusion.* — 2010. — Vol. 50, N 12. — P. 2649–2659.
10. Vieweg J., Su Z., Dahm P., Kusmartsev S. Reversal of tumor-mediated immunosuppression // *Clin. Cancer Res.* — 2007. — Vol. 13, N 2. — P. 727–732.

#### Сведения об авторах

**Баранова Дарья Сергеевна** – врач-гематолог отделения гематологии с блоком трансплантации костного мозга, аспирант кафедры терапии, гематологии и трансфузиологии ФПК и ППВ НГМУ, Новосибирск  
**Сахно Людмила Васильевна** – старший научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии научно-исследовательского института клинической иммунологии, кандидат медицинских наук  
**Крючкова Ирина Валентиновна** – заведующая отделением гематологии с блоком трансплантации костного мозга научно-исследовательского института клинической иммунологии, кандидат медицинских наук  
**Пронкина Наталья Викторовна** – заведующая лабораторией научно-исследовательского института клинической иммунологии, кандидат медицинских наук  
**Тихонова Марина Александровна** – старший научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии научно-исследовательского института клинической иммунологии, кандидат медицинских наук  
**Баторов Егор Васильевич** – аспирант лаборатории клеточной иммунотерапии научно-исследовательского института клинической иммунологии, ФГБУ «Научно-исследовательский институт клинической иммунологии» СО РАМН (630090, г. Новосибирск, ул. Жемчужная, 32-43; тел.: +7-953-877-82-19; e-mail: Eborov@gmail.com)  
**Гилевич Андрей Викторович** – заведующий отделением реанимации и интенсивной терапии научно-исследовательского института клинической иммунологии, кандидат медицинских наук  
**Сергеевичева Вера Васильевна** – врач-гематолог отделения гематологии с блоком трансплантации костного мозга научно-исследовательского института клинической иммунологии, кандидат медицинских наук  
**Сизикова Светлана Анатольевна** – врач-гематолог отделения гематологии с блоком трансплантации костного мозга научно-исследовательского института клинической иммунологии, кандидат медицинских наук  
**Ушакова Галина Юрьевна** – врач-гематолог отделения гематологии с блоком трансплантации костного мозга научно-исследовательского института клинической иммунологии, кандидат медицинских наук  
**Останин Александр Анатольевич** – ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии научно-исследовательского института клинической иммунологии, доктор медицинских наук, профессор  
**Поспелова Татьяна Ивановна** – заведующая кафедрой терапии, гематологии и трансфузиологии ФПК и ППВ, доктор медицинских наук, профессор  
**Черных Елена Рэмовна** – заведующая лабораторией клеточной иммунотерапии, чл.-корр. РАМН, доктор медицинских наук, профессор (630110, г. Новосибирск, ул. Б. Хмельницкого, 62, кв. 4; тел.: 8-(383)-228-57-49; e-mail: bmt-novosibirsk@mail.ru)