

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева» Министерства здравоохранения Российской Федерации

На правах рукописи

Захарова Виктория Витальевна

**Влияние аллореактивности естественных киллеров донора
на исход аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток
у детей с острыми лейкозами**

14.03.10 – клиническая лабораторная диагностика

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва 2020

Работа выполнена в ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научный руководитель:

Доктор медицинских наук

Кочетов Анатолий Глебович

Научный консультант:

Доктор медицинских наук

Масчан Михаил Александрович

Официальные оппоненты:

Луговская Светлана Алексеевна – доктор медицинских наук, профессор, профессор кафедры клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России.

Грачева Людмила Александровна – доктор медицинских наук, заведующая лабораторией клинической иммунологии РДКБ ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита диссертации состоится «___» _____ 20__ г. в ___ часов на заседании диссертационного совета Д 208.073.05 по присуждению ученой степени кандидата медицинских наук в ФГБУ «НМИЦ кардиологии» Минздрава России по адресу: 121552, Москва, ул.3-я Черепковская, д. 15а.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБУ «НМИЦ кардиологии» Минздрава России и на сайте <http://cardioweb.ru>.

Автореферат разослан «___» _____ 20__ г

Ученый секретарь диссертационного совета, д.м.н.

Ускач Т.М.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Совместимость донора и реципиента по молекулам человеческого лейкоцитарного антигена, Human Leukocyte Antigen - HLA, исторически является важнейшим фактором, определяющим исходы трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК). Ряд исследований показал влияние на исход ТГСК других генов, а именно генов, кодирующих семейство иммуноглобулиноподобных рецепторов естественных киллерных клеток, killer cell immunoglobulinlike-receptors - KIRs, [Cooley S., 2009]. KIR-рецепторы играют важнейшую роль в регуляции функциональной активности NK-клеток. Лигандами для ингибирующих KIR-рецепторов являются антигены HLA I класса, лиганды большинства активирующих KIR пока остаются неизвестными [Mandelboim O., 1996, Thananchai H., 2007]. NK-клетки являются одной из первых популяций лимфоцитов, которая восстанавливается после аллогенной ТГСК. Считается, что NK-клеточная аллореактивность определяется различием в активирующих и ингибирующих сигналах, посылаемых активирующими и ингибирующими KIR-рецепторами NK-клеток, другими словами KIR-HLA несоответствием между донором и реципиентом и наличием определенных активирующих KIR-рецепторов. Каждая NK-клетка экспрессирует множество ингибирующих и активирующих KIR-рецепторов, связывание которых с соответствующими лигандами определяет функциональные последствия взаимодействия NK-клетки с потенциальной мишенью. Толерантность NK-клеток к собственным неповрежденным тканям организма приобретает в процессе так называемого «обучения» и «лицензирования», при котором в ходе созревания NK-клетки, ее KIR-рецепторы взаимодействуют с молекулами HLA I класса и вследствие чего исключается развитие аутореактивности. Однако, при вирусной инфекции или опухолевой трансформации клетки, экспрессия молекул HLA I класса часто снижается, что приводит к преобладанию сигналов от активирующих KIR-рецепторов на NK-клетках и запуску механизмов цитотоксичности. Это уникальное свойство NK-клеток было описано как «missing self» гипотеза или гипотеза «отсутствия своего» [Ljunggren H.G., 1990; Rajalingham R., 2012]. Эффективность развития реакции «трансплантат-против-лейкоза» после ТГСК, основанной на донорской NK-аллореактивности, зависит от множества факторов, основные среди

которых это KIR-генотип донора и сам трансплантационный протокол. В настоящее время опыт изучения NK- аллореактивности при гемобластозах в Российской Федерации очень небольшой и ограничивается исследованиями преимущественно на взрослых пациентах. Имеющиеся исследования крайне противоречивы и объясняют разнообразие результатов влияния NK-аллореактивности на эффективность ТГСК, главным образом, особенностями трансплантационных протоколов. В связи с вышесказанным, клиничко-лабораторная интерпретация KIR-генотипирования донора и оценка его возможного влияния на риск развития рецидива и выживаемость у пациентов с острым миелобластным лейкозом (ОМЛ) и острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ) после аллогенной гаплоидентичной и неродственной ТГСК является актуальной и важной, поскольку может помочь улучшить исходы ТГСК.

Цель исследования

Определить необходимость проведения молекулярно-генетического типирования KIR-генов естественных киллерных клеток для подбора донора перед проведением аллогенной ТГСК с α/β деплецией у пациентов с острыми лейкозами.

Задачи исследования:

1. Определить и охарактеризовать генотипы родственных и неродственных доноров на основании молекулярно-генетического метода KIR-типирования с использованием ПЦР с сиквенс-специфическими праймерами.

2. Оценить значимость молекулярно-генетического метода KIR-типирования донора в прогнозе рецидива у пациентов после проведения ТГСК.

3. Изучить ценность KIR-типирования доноров в прогнозе выживаемости у пациентов после ТГСК.

4. Оценить прогностическую значимость молекулярно-генетического метода KIR-типирования доноров в риске развития рецидива и выживаемости в группах пациентов по варианту лейкоза и типу донора.

5. Изучить влияние KIR-генотипа донора на прогноз исходов ТГСК при одинаковом режиме иммуносупрессивной терапии пациентов.

Научная новизна

В результате проведенного исследования впервые в репрезентативной выборке российских пациентов охарактеризовано влияние KIR-генотипа донора по трем известным моделям аллореактивности NK-клеток на исходы аллогенной ТГСК с

использованием селективного удаления (деплеции) α/β Т-лимфоцитов из трансплантата в группе у детей с диагнозами ОМЛ и ОЛЛ.

На основании данных KIR-генотипирования по различным моделям NK-аллореактивности проведена оценка влияния потенциально NK-аллореактивных доноров на риск развития рецидива, общую и бессобытийную выживаемость у пациентов, получивших гаплоидентичную и неродственную аллогенные ТГСК.

Впервые оценено раздельное влияние количества активирующих, ингибирующих и общего числа KIR-генов в генотипе донора на исходы ТГСК у пациентов с различными видами аллогенных трансплантаций и различными типами лейкозов.

Изучено влияние KIR-генотипа донора на риск развития рецидива и выживаемость в контексте режимов иммуносупрессивной терапии, применяемых у пациентов.

Теоретическая и практическая значимость работы

Проведено исследование значимости результатов KIR-типирования доноров и влияние NK-аллореактивности на исходы ТГСК в контексте относительно нового метода обработки трансплантата. Деплеция α/β Т-лимфоцитов используется недавно и представляет собой метод процессинга, при котором в трансплантате сохраняются не только гемопоэтические стволовые клетки, но и большое количество эффекторов врожденного иммунитета, в первую очередь – зрелые NK-клетки и γ/δ Т клетки, что позволяет успешно выполнять ТГСК от неродственных и гаплоидентичных доноров и сопряжено с низким риском отторжения и развития РТПХ.

Определена низкая значимость KIR-генотипа донора, предсказанная по модели NK-аллореактивности «рецептор-лиганд», в прогнозе риска развития рецидива после ТГСК с α/β деплецией для пациентов с различными типами лейкоза, видами ТГСК и режимами иммуносупрессивной терапии. Результаты исследования свидетельствуют о том, что на увеличение риска развития рецидива влияют неродственный тип донора и диагноз ОЛЛ у пациента.

Выявлена высокая значимость большего числа активирующих KIR-генов в генотипе донора в прогнозе летального исхода у пациентов с ОЛЛ.

Показано, что при потенциальной аллореактивности донора по модели «рецептор-лиганд» и наличии наилучшего («best») В-контента в генотипе у донора наблюдается тенденция к лучшей выживаемости пациентов, получивших HLA-гаплоидентичную ТГСК с α/β деплецией.

Наличие наилучшего («best») В-контента и центромерного В-мотива (KIR2DS2/2DL2) в генотипе у донора способствуют более низкому риску развития рецидива и лучшей выживаемости пациентов, имеющих одинаковый краткосрочный режим иммуносупрессивной терапии.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Молекулярно-генетическое типирование генов KIR-локуса донора с помощью ПЦР с сиквенс-специфическими праймерами может использоваться в лабораторной практике в качестве дополнительного метода к основной методике для подбора донора HLA-типированию при изучении влияния аллореактивности естественных киллеров донора на исходы аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток у детей с острыми лейкозами.

2. Генотип донора, определенный с использованием молекулярно-генетического метода KIR-типирования, и предсказанная по модели «рецептор-лиганд» аллореактивность не значимы в оценке риска развития рецидива лейкоза у пациентов после проведения родственной и неродственной ТГСК.

3. Выживаемость пациентов после ТГСК ассоциирована с отсутствием в генотипе донора, определенного с использованием молекулярно-генетического метода KIR-типирования, генов теломерного В-мотива 2DS1/3DS1/2DL5A и с наличием донорской аллореактивности по модели «рецептор-лиганд».

4. Общая и бессобытийная выживаемость пациентов имеет неодинаковую связь с генотипом донора, определенным с использованием молекулярно-генетического метода KIR-типирования: при остром лимфобластном лейкозе большее количество активирующих KIR-генов у доноров связано с более высокой общей и бессобытийной выживаемостью пациентов; при остром миелобластном лейкозе и у пациентов, получивших HLA-совместимую неродственную и HLA-гаплоидентичную родственную ТГСК, KIR-генотип донора не значим в оценке исходов ТГСК.

5. При одинаковом режиме иммуносупрессивной терапии у пациентов генотип донора, определенный с использованием молекулярно-генетического метода KIR-

типирования, не влияет на риск развития рецидива и выживаемость после проведенной ТГСК.

Личный вклад автора в проведенное исследование.

Автором лично проведен углублённый анализ отечественной и зарубежной научной литературы по тематике исследования, планирование научной работы, подбор лабораторных и статистических методов, выполнение лабораторных исследований, анализ и интерпретация клинических, лабораторных и инструментальных данных, их систематизация, статистическая обработка и описание полученных результатов, написание и оформление основных публикаций по выполненной работе.

Основные положения диссертационной работы были представлены на международных и Всероссийских конференциях: 21th European Hematology Association Congress – 2016, 33rd European Immunogenetics and Histocompatibility Conference – 2019, Российский Конгресс Лабораторной Медицины — 2018, Межрегиональное совещание НОДГО – 2019.

Внедрение результатов исследования. Результаты научно-исследовательской работы используются в лечебно-диагностической работе отделений трансплантации гемопоэтических стволовых клеток №1 и №2 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России.

Публикация результатов и апробация работы. По материалам диссертации опубликовано 9 печатных работ, в том числе 3 в изданиях, рекомендуемых ВАК и 4 в рецензируемых изданиях, индексируемых в международных базах публикационной активности «Scopus» и «Web of Science», из которых 2 публикации в иностранных журналах. Апробация диссертации состоялась 28 января 2020 года на совместном заседании Ученого совета ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России и отдела клинической лабораторной диагностики ФГБУ «НМИЦ кардиологии» Минздрава России.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 111 страницах машинописного текста и состоит из введения, четырех глав (обзор литературы, материал и методы, результаты исследования и их обсуждение), выводов, практических рекомендаций, списка использованной литературы и приложения. Работа иллюстрирована 9 таблицами и 22 рисунками. Библиографический указатель содержит 104 отечественных и иностранных источника.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материал и методы

Характеристика больных и методы исследования. В соответствии с целью и задачами исследования дизайн был выбран простой, структура – продольная, ретроспективная. В исследование включены 142 пациента (51 девочка и 91 мальчик) с диагнозами ОЛЛ и ОМЛ, получившие первую аллогенную ТГСК от HLA-гаплогидентичных родственных (78 пациентов) и HLA-идентичных неродственных доноров (64 пациента от полностью (51 пациент, 10/10) и частично (13 пациентов, 9/10, 8/10, 6/10) HLA-совместимых доноров) с деплецией α/β Т лимфоцитов в качестве процессинга трансплантата на базе ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России в период с января 2012 по июнь 2016 года (табл.1). Медиана возраста пациентов на момент ТГСК составила 11 лет (1-18 лет).

Таблица 1. Характеристика пациентов.

Всего	Число пациентов, N(%)
	142
Диагноз	
ОЛЛ	72 (50,7)
ОМЛ	70 (49,3)
Медиана возраста на момент трансплантации, годы	11 (диапазон 1-18)
Пол пациентов	
женский	51 (35,9)
мужской	91 (64,1)
Статус заболевания на момент трансплантации	
Полная клинико-гематологическая ремиссия	142 (100,0)
Тип донора	
HLA-гаплогидентичный родственный	78 (54,9)
Полностью HLA-идентичный неродственный	51 (35,9)
Неполностью HLA-идентичный неродственный	13 (9,2)
Режим кондиционирования	
Основанный на тотальном облучении тела	21 (14,8)
Основанный на треосульфане	121 (85,2)
Текущий статус	
Живы в полной ремиссии	86 (60,6)
Рецидив	38 (26,8)
Смерть, не связанная с рецидивом	18 (12,6)
Медиана наблюдения, годы	1,54 (диапазон 0,01-4,63)

Диагноз лейкоза и его морфологический вариант были установлены на основании данных анамнеза, клинической картины, цитологического и цитохимического исследования мазков костного мозга и периферической крови, мультипараметрической проточной цитофлюорометрии клеток костного мозга и цитогенетического и молекулярно-генетического анализа в соответствии с разработанными критериями [Румянцев А.Г., 2013, 2015]. Критериями включения пациентов в исследование являлись: - диагнозы ОМЛ и ОЛЛ; - полная клинико-гематологическая ремиссия на момент ТГСК; - одинаковый источник трансплантата (мобилизованные рекомбинантным гранулоцитарным колониестимулирующим фактором стволовые клетки (CD34+) периферической крови, полученные в ходе процедуры автоматического афереза мононуклеаров). Критериями исключения являлись: - рефрактерное течение лейкоза; - более одной ТГСК с деплецией α/β Т лимфоцитов в анамнезе; - отторжение трансплантата после ТГСК.

Схема исследования представляла собой регистрацию обследования пациентов с момента их поступления в отделение, на этапе подготовки к ТГСК и после ТГСК. План обследования зависел, главным образом, от варианта лейкоза и протокола лечения [Румянцев А.Г., 2013, 2015]. При поступлении всем пациентам проводились стандартные лабораторные (общий и биохимический анализ крови, общий анализ мочи, коагулограмма), инструментальные исследования (узи брюшной полости, рентгенография грудной клетки, ЭКГ, Эхо-КГ, ЭЭГ, КТ или МРТ головного мозга) и вирусологический скрининг (гепатит, ВИЧ, сифилис, цитомегаловирусная инфекция), а так же цитологические исследования ликвора и пунктата костного мозга с целью верификации типа лейкоза. На дальнейших этапах регулярность выполнения лабораторных и инструментальных исследований определялась по индивидуальным показаниям и в зависимости от выбранного протокола лечения (табл. 2). Стандартные лабораторные и инструментальные обследования проходили все доноры при подготовке к ТГСК.

Медиана количества CD34 позитивных клеток на кг массы тела пациента в трансплантате составила $8,59 \times 10^6$ (диапазон $3,9-18,8 \times 10^6$). После ТГСК дополнительно проводился регулярный мониторинг инфекций и приживления трансплантата в динамике до одного года после ТГСК.

Таблица 2. Схема исследования.

Вид исследования	Пациент			Донор	
	При поступлении	До ТГСК	После ТГСК	До ТГСК	После ТГСК
Стандартные лабораторные исследования	+	+	+	+	
Миелограмма	+	+	+		
Цитогенетический и молекулярно-генетический анализ	+				
Исследование ликвора	+				
Иммунофенотипирование лимфоцитов	+	+	+	+	
Инструментальные исследования	+			+	
Микробиологический и вирусологический статус	+	+	+	+	
HLA-типирование		+		+	
KIR-типирование					+
Мониторинг химеризма			+		
Мониторинг минимальной остаточной болезни			+		
Регистрация осложнений			+		

Ранние и поздние осложнения после ТГСК развивались, главным образом, до одного года после проведения трансплантации. Наиболее частыми осложнениями были вирусные инфекции, связанные с применением системной иммуносупрессивной терапии и развитие острой (до 100 дня после ТГСК) или хронической РТПХ.

Режимы кондиционирования и иммуносупрессивной терапии. Всем пациентам было проведено миелоаблативное кондиционирование. У 121 пациента использовался режим со сниженной токсичностью в виде комбинации двух алкилирующих агентов: треосульфан и мельфалан (102 пациента), либо треосульфан и тиотепа (19 пациентов). У оставшихся 21 пациента применялся режим кондиционирования, основанный на тотальном облучении тела, в комбинации с тиотепой (3 пациента) или вепезидом (18 пациентов). В качестве серотерапии пациенты получали АТГАМ (55 пациентов) или антитимоцитарный глобулин (82 пациента). С целью профилактики развития РТПХ всем пациентам была проведена стандартная на момент ТГСК посттрансплантационная иммуносупрессивная терапия (длительная такролимусом или краткосрочная бортезомибом).

Лабораторные исследования. Подбор донора осуществлялся по результатам молекулярно-генетического HLA-типирования на основании совместимости HLA-

антигенов донора и реципиента по 5 основным аллелям 1 класса (HLA-A,-B,-C) и 2 класса (HLA-DRB1,-DQB1). Всем родственным донорам и реципиентам было проведено HLA-типирование по высокому или низкому разрешению с помощью одной из следующих методик: полимеразная цепная реакция с сиквенс-специфическими праймерами, секвенирование по Сэнгеру, высокопроизводительное секвенирование следующего поколения согласно протоколу производителя. Результаты типирования неродственных доноров были предоставлены международными регистрами. Для аллелей первого класса HLA-A*, -B* были определены эквивалентные им серологические группы Bw4 или Bw6, все аллели I класса HLA-C* были отнесены к группам C1 или C2 согласно современной классификации. Всем родственным и неродственным донорам было проведено молекулярно-генетическое KIR-типирование. KIR-генотипы доноров были отнесены к одной из групп – «A» или/и «B» – в зависимости от присутствия и количества определенных активирующих и ингибирующих генов и согласно геномной организации KIR-локуса [Biassoni R., 2012]. Распределение доноров на группы в соответствии с их KIR B-контентом («neutral», «better», «best») проводилось с помощью KIR B-content group калькулятора. Потенциальная аллореактивность донора оценивалась по модели «лиганд-лиганд» в группе пациентов, получивших гаплоидентичную ТГСК. По модели «рецептор-лиганд», а также в зависимости от количества KIR-генов аллореактивность оценивалась в общей группе пациентов. В том числе, выполнялись следующие исследования: мониторинг химеризма в периферической крови у пациентов после ТГСК, иммунофенотипирование лейкоцитов, микробиологическая диагностика.

Статистический анализ. Статистическая обработка данных проводилась с использованием программного обеспечения XLSTAT 2015 («Addinsoft», Франция) и SPSS («SPSS: An IBM Company», США). Различия между параметрами считались статистически значимыми при p-value менее 0,05. Оценивались риск рецидива основного заболевания с помощью кумулятивной оценки частоты событий (КВ, cumulative incidence), вероятность общей выживаемости (ОВ) и бессобытийной выживаемости (БВ) с помощью метода Каплана-Майера. Сравнение функций выживаемости проводилось по log-rank критерию, для сравнения кумулятивных рисков использовался критерий Грея. Факторный анализ взаимосвязи лабораторных и трансплантат-ассоциированных параметров проводился методом главных компонент,

их значимость в риске развития рецидива и выживаемости пациентов исследовалась методом пошагового логистического регрессионного анализа. На основании результатов ROC-анализа осуществлялось определение пороговых значений количественных переменных относительно выбранных событий и их дополнительная оценка с применением критерия Хи-квадрат по таблице сопряженности.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Оценка донорской NK-аллореактивности по результатам KIR-генотипирования. Три гена (2DL4, 3DL2, 3DL3) и один псевдоген (3DP1) были обнаружены у всех доноров, поскольку они являются «структурными» и присутствуют во всех гаплотипах. Наиболее часто встречающимся активирующим KIR-геном оказался 2DS4, обнаруженный у 130 доноров (92%), а самым частым ингибирующим – 2DL1 (93%, 132 доноров). Гены 2DS1, 3DS1 и 2DL5A, находящиеся в теломерной части, обычно наследуются совместно и были обнаружены у 51 донора (36%), что определяло присутствие у таких доноров теломерного мотива TelB. Гены 2DS2 и 2DL2 также косегрегируются и определяют центромерный мотив CenB. Эти гены были обнаружены у 73 доноров (51%), не считая одного донора с делетированным KIR2DL2. В таблице 3 представлены данные по количеству аллореактивных доноров по моделям «лиганд-лиганд», «рецептор-лиганд» и медиане числа KIR-генов во всех группах.

Таблица 3. Количество аллореактивных доноров во всех группах пациентов.

Группа пациентов (n)	«лиганд-лиганд»	«рецептор-лиганд»	Медиана числа KIR-генов у донора (диапазон)		
			Активирующие KIR-гены	Ингибирующие KIR-гены	Общее число
Общая группа пациентов (n=142)	--	87	2 (1-6)	7 (5-9)	9 (7-15)
Диагноз ОМЛ (n=70)	--	47	2.5 (1-6)	6 (5-9)	9 (7-15)
Диагноз ОЛЛ (n=72)	--	40	2 (1-6)	7 (5-9)	9 (7-15)
HLA-гаплоидентичный донор (n=78)	31	49	2.5 (1-6)	7 (5-9)	9 (7-15)
HLA-идентичный неродственный донор (n=64)	--	38	2 (1-6)	7 (5-9)	9 (7-15)
Пациенты с монотерапией бортезомибом	--	31	2 (1-6)	6 (5-9)	9 (7-15)

Сорок девять доноров (35%) имели KIR-генотип А и 93 (65%) KIR-генотип В. Также отдельно был оценен KIR В-контент донора. Девяносто один донор (64%) имел нейтральный контент, 32 донора (23%) – лучший и лишь 19 доноров (13%) - наилучший, который, согласно литературным данным, оказывает наиболее благоприятный эффект на исходы ТГСК. Распределение генотипов доноров по В-контенту представлено на рисунке 1.

В группе пациентов с одинаковым режимом иммуносупрессивной терапии в виде монотерапии бортезомибом шестнадцать доноров (34%) имели KIR-генотип А и 31 (66%) KIR-генотип В. Дополнительно был проанализирован KIR В-контент доноров: тридцать доноров (64%) имели нейтральный В-контент, 8 доноров (17%) – лучший и 9 доноров (19%) - наилучший. У пациентов, получивших гаплоидентичную ТГСК (n=27) тринадцать доноров (48%) были потенциально аллореактивны по модели «лиганд-лиганд», 17 доноров (63%) - по модели «рецептор-лиганд». Для группы пациентов с неродственной ТГСК модель «рецептор-лиганд» отдельно не использовалась из-за небольшого количества пациентов в данной группе и наличия неполностью HLA-идентичных доноров (30% данной группы).

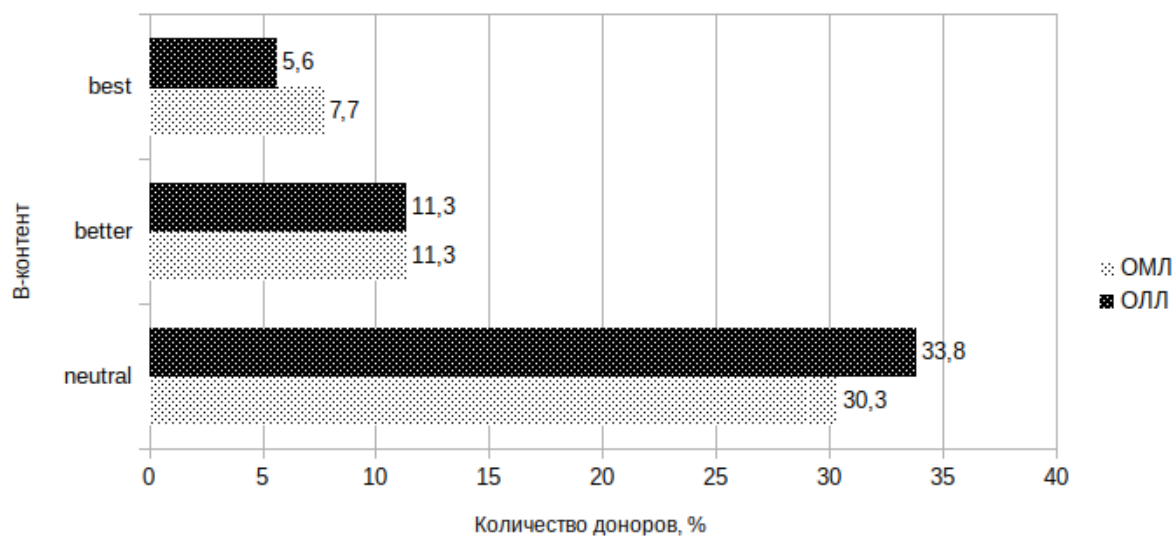


Рисунок 1. Распределение KIR-генотипов доноров согласно В-контенту.

2. KIR-генотипирование донора в оценке риска развития рецидива у пациентов после проведения ТГСК. Три описанные модели аллореактивности NK-клеток донора были применены для оценки влияния потенциальной аллореактивности на риск рецидива и выживаемость у пациента. Модель «лиганд-лиганд» не применима к трансплантациям, где пациент и донор HLA-идентичны и предполагает, что если у

реципиента отсутствуют как минимум один или более KIR-лигандов, которые имеются у донора, то донорские NK-клетки могут быть аллореактивными по отношению к реципиенту. Модель «рецептор-лиганд» не принимает во внимание донорские KIR-лиганды (и, следовательно, применима для любого вида аллогенной ТГСК) и аллореактивность по ней достигается в случае наличия у донора KIR-рецептора, к которому нет лиганда у реципиента. Наименее изученная третья модель анализирует влияние наличия отдельных KIR-генов, а также общего количества KIR-генов донора без учета HLA-антигенов реципиента и донора. При этом предполагается, что чем выше количество KIR-рецепторов на NK-клетке донора, тем больше вероятность, что различие между KIR-лигандами донора и реципиента будет определяться NK-клетками.

При сравнении рисков развития рецидива с помощью кумулятивной оценки частоты событий в зависимости от таких факторов как несоответствие KIR-генов донора и HLA-антигенов пациента по модели «рецептор-лиганд», количество активирующих, ингибирующих и общее число KIR-генов относительно медианы общего распределения, статистически значимых различий при однофакторном анализе не обнаружено.

В результате факторного анализа снижения размерности было показано, что гаплоидентичный тип донора сильно взаимосвязан с низким риском развития рецидива. В тоже время, взаимосвязь средней силы была показана для риска развития рецидива и диагноза пациента (риск ниже при ОМЛ). Несмотря на отсутствие значимости данных KIR-генотипирования в риске развития рецидива, был проведен пошаговый логистический регрессионный анализ на наличие рецидива со всеми параметрами. Результаты показали, что при выборе в пользу неродственного донора риск развития рецидива после ТГСК с α/β деплецией статистически значимо возрастает в 2,7 раза; у пациентов с диагнозом ОЛЛ значимо возрастает риск развития рецидива более чем в 2 раза. Для параметров, ассоциированных с KIR-генотипом донора и аллореактивностью по модели «рецептор-лиганд» значимых результатов получено не было.

Рос-анализ абсолютных значений количества активирующих, ингибирующих и общего числа KIR-генов у донора по наличию рецидива у пациента после ТГСК не подтвердил прогностической значимости данных маркеров, однако наилучший результат был получен для числа ингибирующих KIR-генов — кривая значимости

прошла выше опорной линии с площадью $0,546 \pm 0,055$ (95% ДИ $0,439-0,654$) при $p=0,4$, пороговое значение числа ингибирующих KIR-генов составило 6,5 с чувствительностью 57,9% и специфичностью 48,1%. Соответственно, на кривых Каплана-Майера по группам наличия и отсутствия рецидива у пациентов не наблюдалось значимого расхождения кривых при доноре с числом ингибирующих KIR менее и более порогового значения.

3. Оценка значимости KIR-генотипирования донора в прогнозе выживаемости у пациентов после проведения ТГСК. При сравнении общей и бессобытийной выживаемости в зависимости от таких факторов как несоответствие KIR донора и HLA пациента по модели «рецептор-лиганд», количество активирующих, ингибирующих и общее число KIR-генов, статистически значимых различий при однофакторном анализе не обнаружено. Однако, при сравнении общей выживаемости пациентов в зависимости от присутствия СепВ-мотива (гены KIR2DS2 и KIR2DL2), отмечался тренд в сторону повышения выживаемости у пациентов с присутствием СепВ-мотива у донора, ($n=74$) – $0,70$ (95% ДИ $0,59-0,81$) против $0,60$ (95% ДИ $0,47-0,73$) при его отсутствии ($n=68$), однако без статистической значимости ($p=0,391$).

По результатам факторного анализа, основанного на матрице корреляций, было показано наличие сильной обратной взаимосвязи между выживаемостью пациента и отсутствием потенциальной аллореактивности донора, определённой на основании KIR-генотипа по модели «рецептор-лиганд», отсутствием у донора генов 2DS2/2DL2 – слабой силы обратная (или прямая с присутствием указанных генов), отсутствием в KIR-генотипе генов 2DS1/3DS1/2DL5A – средней силы прямая (табл.4). Пошаговый логистический регрессионный анализ не выявил значимого показателя.

Рос-анализ абсолютных значений активирующих, ингибирующих и общего количества KIR-генов у донора по общей выживаемости у пациента после ТГСК не показал прогностической значимости данных параметров, однако наилучший результат вновь был получен для абсолютно числа ингибирующих KIR-генов — кривая значимости прошла выше опорной линии с площадью $0,530 \pm 0,052$ (95% ДИ $0,427-0,632$) при $p=0,052$, пороговое значение числа ингибирующих KIR-генов по ROC-кривой составило 6,5 с чувствительностью 53,3% и специфичностью 52,2%.

Таблица 4. Матрица компонент факторного анализа данных KIR-генотипирования в общей выживаемости у пациентов после ТГСК с α/β деплецией.

Показатель	Компонента 1	Компонента 2
Общее количество KIR-генов	0,990	
Число активирующих KIR-генов	0,961	
Число ингибирующих KIR-генов	0,876	
KIR_2DS1/3DS1/2DL5A		0,390
KIR_2DS2/2DL2		-0,193
Общая выживаемость		0,698
Отсутствие аллореактивности донора по модели «рецептор-лиганд»		-0,633

Кривые Каплана-Майера по группам наличия и отсутствия смерти у пациентов не показали статистически значимой разницы между периодами развития смерти по пороговому значению количества ингибирующих KIR (рис.2).

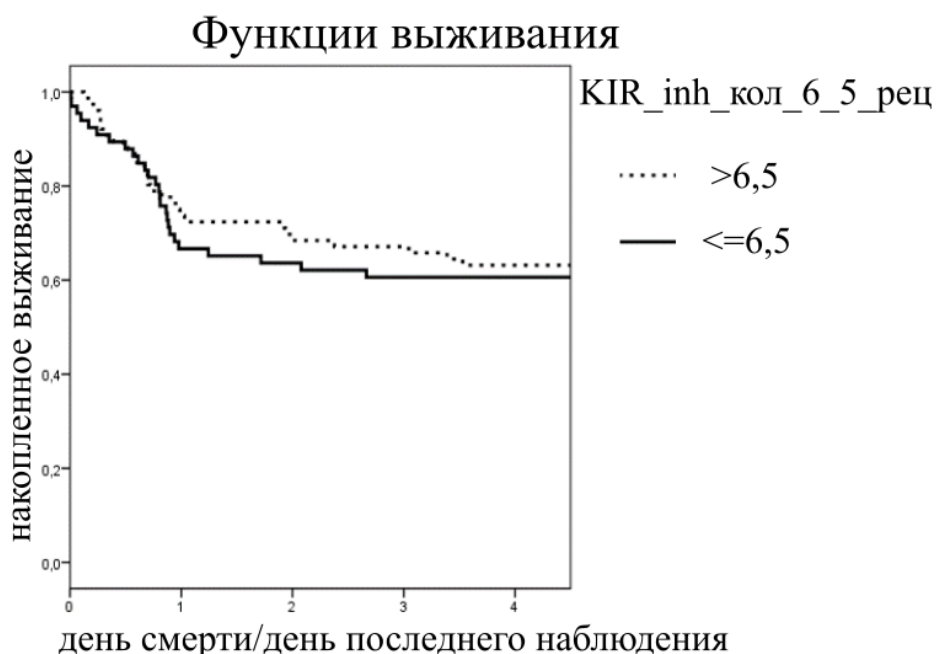


Рисунок 2. Кривые выживаемости Каплана-Майера в зависимости от числа ингибирующих KIR-генов у донора.

Отсутствие статистической значимости результатов KIR-типирования в оценке риска развития рецидива и неоднозначные результаты выживаемости для общей группы пациентов, вероятнее всего, связано, главным образом, помимо методики обработки трансплантата, с вхождением в группу как пациентов с различными диагнозами, так и видами проведенных ТГСК. По-видимому, взаимосвязь выживаемости пациентов с потенциальной аллореактивностью доноров, предсказанной по модели «рецептор-лиганд», получена за счет пациентов с гаплоидентичной ТГСК,

поскольку именно у них при последующем исследовании была выявлена указанная тенденция.

4. Прогностическая значимость KIR-генотипирования донора у пациентов с различными вариантами лейкоза и ТГСК

4.1 Пациенты с диагнозом ОМЛ и пациенты, получившие HLA-совместимую неродственную ТГСК. Риски развития рецидива, общей и бессобытийной выживаемости пациентов в зависимости от предсказанной аллореактивности донора по модели «рецептор-лиганд», от количества активирующих, ингибирующих и общего числа KIR-генов относительно медианы, а также от В-контента донора по итогам однофакторного анализа статистически не отличались, причем для пациентов с неродственной ТГСК выживаемость оказалась даже немного хуже в случае большего числа KIR-генов и наличия наилучшего «best» В-контента у донора. Площадь под характеристической кривой в прогнозе развития рецидива и выживаемости пациентов для абсолютного числа KIR-генов в генотипе донора составила менее 0,6, поэтому дальнейшие расчеты (логистический регрессионный анализ, отношения шансов) не проводились.

4.2 Острый лимфобластный лейкоз. При анализе влияния KIR-генотипа донора на эффективность ТГСК выявлена статистически значимая разница общей выживаемости с худшими результатами в группе пациентов с меньшим числом активирующих KIR-генов (относительно медианы общего распределения) у донора (n=23) - 0,31 (95% ДИ 0,07-0,55) по сравнению с пациентами с большим числом активирующих KIR-генов (n=49) - 0,67 (95% ДИ 0,53-0,81), p=0,016 (рис. 3). Указанная статистически значимая разница подтвердилась и для бессобытийной выживаемости.

Методами описательной статистики с расчетом таблиц сопряженности и отношения шансов было показано, что выживаемость пациентов повышается при количестве ингибирующих KIR-генов донора более или равно медиане (ОШ=2,681, 95%ДИ:0,969-7,420, точная двусторонняя значимость p=0,073). Выявленная зависимость была также подтверждена параметрическим корреляционным анализом с использованием двустороннего критерия Пирсона с величиной коэффициента корреляции $r=-0,227$ (p=0,05), что свидетельствует о невысокой силе взаимосвязи.

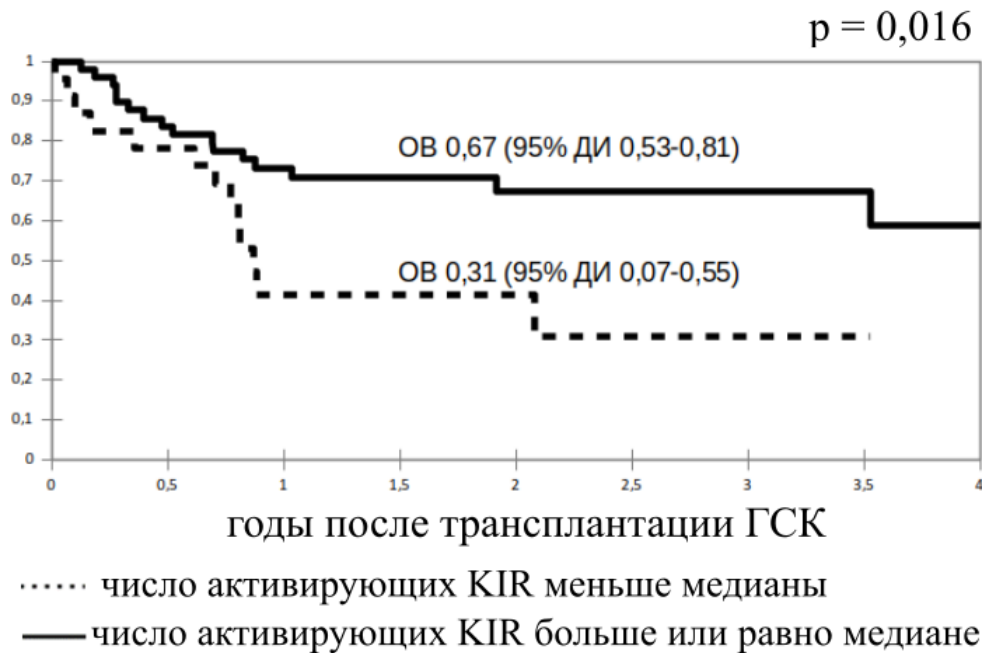


Рисунок 3. Общая выживаемость у пациентов с ОЛЛ после ТГСК с α/β деплецией, в зависимости от количества активирующих KIR-генов.

В детской популяции, в отличие от взрослой, имеется высокий уровень экспрессии молекул межклеточного взаимодействия (inter-cellular adhesion molecule-1 и др., необходимых для активации и взаимодействия с НК клетками) на бластных клетках, что позволяет в большей степени проявиться НК аллореактивности при ОЛЛ у детей.

4.3 HLA-гаплоидентичная родственная ТГСК. При ТГСК от HLA-гаплоидентичных доноров потенциальная НК-аллореактивность доноров, предсказанная по модели «лиганд-лиганд», не оказала влияния на риск развития рецидива и выживаемость пациентов. При анализе по модели «рецептор-лиганд» наблюдалась тенденция к увеличению общей выживаемости пациентов в случае потенциальной НК-аллореактивности донора (n=49) – 0,76 (95% ДИ 0,63-0,88) против 0,56 (95% ДИ 0,32-0,81), (n=29), однако без статистической значимости (p=0,486).

При анализе общей выживаемости пациентов в зависимости от KIR B-контента донора отмечалась тенденция в сторону улучшения выживаемости пациентов, чьи доноры имели наилучший («best») B-контент (n=7) - 1,00 (95% ДИ 0,00-0,00) по сравнению с пациентами, чьи доноры были с лучшим («better») B-контентом (n=17) - 0,51 (95% ДИ 0,22-0,80) и нейтральным («neutral») (n=54) - 0,71 (95% ДИ 0,57-0,85), p=0,153; (рис. 4), однако различие также не достигло статистической значимости.

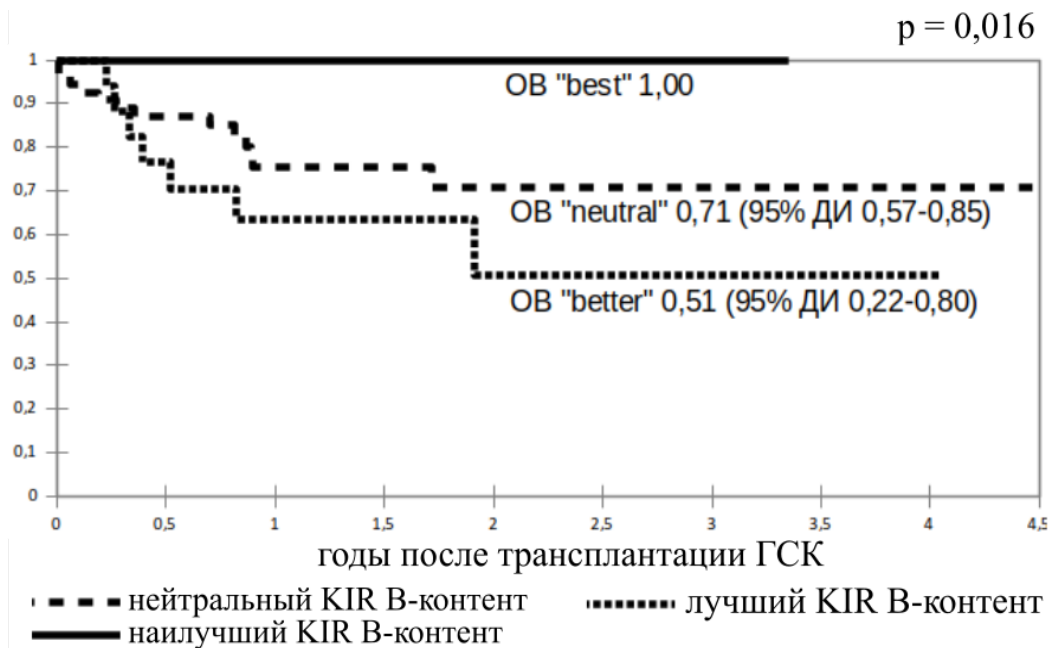


Рисунок 4. Общая выживаемость пациентов, получивших гаплоидентичную ТГСК с α/β деплецией, в зависимости от KIR B-контента донора.

Площадь под характеристической кривой в прогнозе развития рецидива и выживаемости пациентов для абсолютного количества активирующих, ингибирующих и общего числа KIR-генов в генотипе донора составила менее 0,6, поэтому дальнейшие расчеты (логистический регрессионный анализ, отношения шансов) не проводились.

Таким образом, выявлен тренд к лучшей выживаемости пациентов при доноре с наилучшим («best») B-контентом: выжили 100%, все 7 пациентов (4 из них имели диагноз ОМЛ), имеющие донора с генотипом TelBxCenBB, то есть гомозиготные по центромерному B-мотиву. Такой сильный положительный клинический эффект у доноров с CenB-мотивом объясняется, главным образом, присутствием KIR2DS2 и KIR2DL2 в центромерной области, а также отсутствием KIR2DL3 в теломерной, либо комбинацией этих двух факторов. Возможное преимущество наличия активирующего KIR2DS2, для которого до настоящего времени не детектировано взаимодействия с молекулами HLA 1 класса, заключается в способности распознавать различные типы лигандов на клетках пациентов с ОМЛ [Stewart C., 2005; Demanet C., 2004]. В свою очередь, вероятное преимущество наличия KIR2DL2 связано с более сильным взаимодействием с эпитопами обеих групп C1 и C2 HLA-C молекул, чем у KIR2DL3 [Moesta A., 2008]. Поскольку «обучение» NK-клеток посредством взаимодействия с молекулами HLA определяет степень чувствительности NK-клеток, более сильная авидность KIR2DL2 по сравнению с KIR2DL3, вероятно, приводит к более

эффективному «обучению» для уничтожения бластных клеток [Yawata M., 2008; Winter C., 1998]. Соответственно, при гомозиготности *CenBB*, ингибирующий *KIR2DL3* из теломерной области *TelB* отсутствует и не принимает участия в «обучении», что вероятно, объясняет наилучшее влияние таких доноров на исходы ТГСК [Cooley S., 2010].

4.4 Влияние режима иммуносупрессивной терапии пациентам после ТГСК на значимость предтрансплантационного определения KIR-генотипа донора. В группе пациентов с длительным приемом такролимуса в качестве иммуносупрессивной терапии для профилактики РТПХ не было показано значимого влияния KIR -генотипа донора на исходы ТГСК.

Для пациентов с краткосрочной монотерапией бортезомибом были получены следующие результаты. Анализ данных KIR-генотипирования донора для пациентов не выявил значимых в прогнозе развития рецидива и летального исхода показателей (площадь под характеристической кривой составила менее 0,6), поэтому дальнейшие расчеты (логистический регрессионный анализ, отношения шансов) не проводились. Была проведена оценка риска развития рецидива с помощью кумулятивной оценки частоты событий и выживаемости с помощью кривых Каплана-Майера.

При анализе рисков развития рецидива, общей и бессобытийной выживаемости в зависимости от таких факторов как несоответствие KIR донора и HLA пациента по модели «рецептор-лиганд», количество активирующих, ингибирующих и общее число KIR-генов относительно медианы общего распределения, статистически значимых различий при однофакторном анализе не обнаружено.

При анализе влияния KIR В-контента донора на эффективность ТГСК выявлена тенденция к снижению риска развития рецидива с худшими результатами в группе пациентов с донорским нейтральным В-контентом («neutral») (n=30) - 0,35 (95% ДИ 0,18-0,66) по сравнению с группами с лучшим («better») В-контентом (n=8) - 0,28 (95% ДИ 0,09-0,88), и с наилучшим («best») В-контентом (n=9) - 0 (95% ДИ 0,00-0,00) $p=0,264$. Аналогичный тренд обнаружен при оценке риска развития рецидива в зависимости от присутствия *CenB*-мотива у донора (гены *KIR2DS2* и *KIR2DL2*). При анализе общей выживаемости пациентов в зависимости от KIR В-контента донора отмечалась тенденция в сторону улучшения выживаемости пациентов, чьи доноры имели наилучший («best») В-контент (n=9) - 0,89 (95% ДИ 0,68-1,00) по сравнению с

пациентами, чьи доноры были с лучшим («better») В-контентом (n=8) - 0,60 (95% ДИ 0,24-0,96) и нейтральным («neutral») (n=24) - 0,73 (95% ДИ 0,52-0,94), p=0,392, однако различие также не достигло статистической значимости.

При оценке общей и бессобытийной выживаемости пациентов по присутствию СепВ-мотива (гены KIR2DS2 и KIR2DL2), отмечался тренд в сторону повышения выживаемости у пациентов с присутствием СепВ-мотива (данные приведены для общей выживаемости): (n=24) – 0,82 (95% ДИ 0,60-1,00) против 0,66 (95% ДИ 0,45-0,87) при его отсутствии (n=23), однако без статистической значимости (p=0,122).

Таким образом, полученные нами результаты исследования показали, что KIR-типирование донора перед ТГСК нужно делать не всем, а только пациентам с диагнозом острого лимфобластного лейкоза и пациентам, которым планируется проведение HLA-гаплоидентичной ТГСК. Полученные результаты подтверждают современные представления о том, что наилучший эффект НК аллореактивности зависит, главным образом, от трансплантационного протокола — вида режима кондиционирования, процессинга трансплантата и посттрансплантационной профилактики РТПХ, поскольку это влияет на проявление потенциальной аллореактивности НК клеток. По результатам данной работы рекомендуется учитывать данные KIR-типирования при подборе донора для пациентов с острым лимфобластным лейкозом, поскольку большее количество активирующих KIR генов (определяющее KIR В гаплотип) у донора существенно улучшает общую и бессобытийную выживаемость пациента. Однако, выявленные в исследовании тенденции в других группах пациентов, позволяют предположить важность результатов KIR типирования при подборе донора для аллогенной ТГСК и для этих групп.

ВЫВОДЫ

1. Генотипы доноров, определенные с использованием молекулярно-генетического метода KIR-типирования, распределены по трём моделям аллореактивности в равных пропорциях, которые сохранились в когортах пациентов по типу лейкоза, виду ТГСК и режиму иммуносупрессивной терапии. Преобладание доноров с генотипом группы Вх для пациентов сочетается с преимущественно нейтральным В-контентом.
2. Генотип донора, определенный с использованием молекулярно-генетического метода KIR-типирования, и предсказанная аллореактивность по модели «рецептор-лиганд» не значимы в оценке риска развития рецидива лейкоза у пациента после

проведения ТГСК. Риск развития рецидива статистически значимо выше вне зависимости от KIR-генотипа при выборе неродственного донора и у пациентов с диагнозом острого лимфобластного лейкоза.

3. Выживаемость пациентов после ТГСК связана с наличием аллореактивности донора, определённой на основании KIR-генотипа по модели «рецептор-лиганд», и отсутствием в KIR-генотипе генов 2DS1/3DS1/2DL5A.

4. Общая и бессобытийная выживаемость пациентов различно связаны с генотипом донора, определенным с использованием молекулярно-генетического метода KIR-типирования, по типу лейкоза и ТГСК. У пациентов с острым лимфобластным лейкозом увеличение количества активирующих KIR-генов у доноров связано с более высокой общей и бессобытийной выживаемостью пациентов ($p_{\text{Лог-Ранк}}=0,016$). У пациентов, получивших HLA-гаплоидентичную родственную ТГСК, по сравнению с пациентами с HLA-совместимой неродственной ТГСК выше вероятность выживаемости при наличии донора с наилучшим («best») В-контентом, а также при наличии потенциальной аллореактивности донора по модели «рецептор-лиганд».

5. Генотип донора, определенный с использованием молекулярно-генетического метода KIR-типирования, статистически значимо не влияет на исходы ТГСК у пациентов, имеющих одинаковый режим иммуносупрессивной терапии, однако у пациентов с краткосрочным режимом иммуносупрессивной терапии, имеющих доноров с наилучшим («best») В-контентом, а также при наличии в генотипе донора центромерного В-мотива (KIR2DS2/2DL2) ниже вероятность развития рецидива и летального исхода.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Молекулярно-генетический метод типирования генов KIR-локуса рекомендуется использовать при выборе донора для пациентов с диагнозом ОЛЛ в качестве дополнительного метода к основной методике подбора донора – HLA-типированию.

2. Пациентам с диагнозом ОЛЛ необходимо, при возможности, выбирать донора, имеющего большее количество активирующих KIR-генов в генотипе вне зависимости от типа проводимой ТГСК.

3. Доноры, имеющие по результатам анализа KIR-генотипа наилучший «best» В-контент (гомозиготность по центромерному В-мотиву), а также потенциально аллореактивные по модели «рецептор-лиганд» предпочтительны для пациентов с

совместимой HLA-гаплоидентичной ТГСК, в случае если имеется возможность выбора между родственными донорами.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Захарова, В. В. Целесообразность проведения KIR-типирования при подборе донора для аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток: обзор литературы/ В.В. Захарова // Онкогематология. - 2018. - Т. 13, №4. - С. 67–74.
2. Захарова, В.В. Влияние аллореактивности естественных киллерных клеток на эффективность аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток с деплецией альфа/бетаTCR/CD19+ лимфоцитов у педиатрических пациентов с острыми лейкозами/ В.В. Захарова, Ж.Б. Шеховцова, О.А. Шрагина, Е.В. Райкина, М.А. Илюшина [и др.]// Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. - 2018. -Т. 17, №2. -С. 39-50.
3. Захарова, В.В. Анализ влияния профилактики реакции трансплантат против хозяина на аллореактивность естественных киллерных клеток донора после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток с деплецией /TCR/CD19+ лимфоцитов у детей с острыми лейкозами/ В.В. Захарова, Ж.Б. Шеховцова, О.А. Шрагина, Е.В. Райкина, М.А. Илюшина [и др.]// Вестник медицинского института "РЕАВИЗ": реабилитация, врач и здоровье. - 2019. -Т. 37, №1. - С.191-206
4. Shekhovtsova, Z. Control of graft-versus-host disease with rabbit anti-thymocyte globulin, rituximab, and bortezomib in TCR $\alpha\beta$ /CD19-depleted graft transplantation for leukemia in children: a single-center retrospective analysis of two GVHD-prophylaxis regimens [Электронный ресурс]/ Z. Shekhovtsova, L. Shelikhova, D. Balashov, V. Zakharova, M. Ilushina, [et.al]// Pediatric Transplantation. - 2019. - Режим доступа: <https://doi.org/10.1111/petr.13594>.
5. Maschan, M. Outcome of $\alpha\beta$ T cell-depleted transplantation in children with high-risk acute myeloid leukemia, grafted in remission / M. Maschan, L. Shelikhova, M. Ilushina, Z. Shekhovtsova, R. Khismatullina, V. Zakharova, [et.al]// Bone Marrow Transplantation. - 2020. - Vol. 55, №1. - P. 256–259.
6. Захарова, В.В. Роль KIR-типирования для подбора донора при аллогенной HLA-гаплоидентичной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) с деплецией α/β TCR/CD19+ лимфоцитов у детей с острым миелобластным лейкозом (ОМЛ) и острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ)/ В.В. Захарова, Ж.Б. Шеховцова,

О.А. Шрагина, А.Г. Кочетов, Л.Н. Шелихова, М.А. Масчан// Лабораторная служба. - 2018. -Т. 7, №3. -С. 154-155.

7. Захарова, В.В. Особенности иммуноглобулинподобных рецепторов (KIR) естественных киллерных (NK) клеток в случайной выборке доноров для HLA-гаплоидентичной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК)/ В.В. Захарова, Ж.Б. Шеховцова, Е.В. Райкина, М.А. Масчан, А.Г. Кочетов// Лабораторная служба. - 2018. -Т. 7, №3. -С. 154.

8. Zakharova, V. The influence of NK cell alloreactivity on outcome after T-cell-depleted haploidentical hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) in patients with acute leukemia./ V. Zakharova, Z. Shekhovtsova, E. Raykina, O. Shragina, L. Shelikhova, [et.al]// Haematologica. - 2016. - Vol. 101, s1. - P. 631

9. Zakharova V. The distribution of HLA alleles and HLA haplotypes in the Russian children's cohort with acute leukemia / V. Zakharova, O. Shragina, E. Raykina, D. Rudik, A. Maschan, [et.al]// HLA. - 2019. -Vol. 93, N. 5. - P.358.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АТГАМ — лошадиный антиtimoцитарный глобулин

АПК - антиген-представляющие клетки

БВ — бессобытийная выживаемость

ДИ – доверительный интервал

КВ – кумулятивная вероятность

ОВ – общая выживаемость

ОЛЛ – острый лимфобластный лейкоз

ОМЛ – острый миелобластный лейкоз

ТГСК – трансплантация гемопоэтических стволовых клеток

РТПХ – реакция трансплантат против хозяина

CD – cluster of differentiation

Cen - centromeric

HLA – human leukocyte antigen

KIR - killer cell immunoglobulinlike-receptors

NGS – next generation sequencing

NK – natural killer cells

Tel – telomeric