

На правах рукописи

Гринько Екатерина Константиновна

**РАЗРАБОТКА МОДЕЛИ НЕМИЕЛОАБЛАТИВНОГО
КОНДИЦИОНИРОВАНИЯ ПРИ ПЕРЕСАДКАХ КОСТНОГО МОЗГА У
МЫШЕЙ**

3.2.7. Иммунология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Москва – 2026

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, доцент **Донецкова Альмира Дмитриевна**

Официальные оппоненты:

Андреева Елена Ромуальдовна, доктор биологических наук, доцент, ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной физиологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Государственный научный центр Российской Федерации — Институт медико-биологических проблем Российской академии наук, Министерство науки и высшего образования Российской Федерации;

Бигильдеев Алексей Евгеньевич, доктор биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии и оптогенетики Центра исследований молекулярных механизмов старения и возрастных заболеваний Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

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

Защита диссертации состоится «_____» _____ 2026 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета 68.1.002.01 в ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России по адресу: 115522, Москва, Каширское шоссе, д. 24.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России и на сайте: <http://nrcii.ru/dissertatsionnyu-sovet/zashchity-dissertatsiy/>

Автореферат разослан «_____» _____ 2026 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор биологических наук

Шиловский Игорь Петрович

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

На сегодняшний день трансплантация аллогенного костного мозга (ТКМ) или гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) является одним из методов лечения гематологических заболеваний, некоторых солидных опухолей и ряда аутоиммунных заболеваний [В.П. Поп и др., 2017; A. Bazinet et al., 2019]. Согласно данным регистра Всемирной сети по трансплантации крови и костного мозга (WBMТ) доминирующими показаниями к проведению ТГСК являлись злокачественные новообразования кроветворной и лимфоидной тканей [A. Gratwohl et al., 2010]. Также ТГСК может приводить к формированию устойчивой иммунной толерантности у реципиента к органам и тканям донора костного мозга.

Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток сопряжена с необходимостью предварительного кондиционирования реципиента. В настоящее время в основе большинства режимов кондиционирования лежит применение высокодозной химиотерапии и/или тотального облучения тела, обладающих выраженной цитотоксичностью и низкой селективностью и имеющих побочные эффекты [A. Chhabra et al., 2016; B. Ezekian et al., 2018].

В связи с этим, особую актуальность приобретает разработка селективных и малотоксичных режимов кондиционирования. Перспективной альтернативой выступают режимы на основе моноклональных антител (МАТ), селективно элиминирующие субпопуляции клеток при существенно меньшей токсичности по сравнению с химио- и радиотерапией. В качестве мишеней используются маркеры Т-клеток и гемопоэтических стволовых клеток, а также костимулирующие молекулы. Показано, что такое кондиционирование обеспечивает безопасное приживание ГСК (гемопоэтических стволовых клеток) от полностью МНС-несовместимых доноров, что позволяет индуцировать толерантность для приживания донорских органов.

Соответствие темы диссертации паспорту научной специальности

Тема диссертации полностью соответствует паспорту научной специальности «3.2.7. Иммунология» (Направления исследований: №1; №4; №7).

Степень разработанности темы исследования

Создание устойчивой иммунной толерантности к аллогенному трансплантату без применения пожизненной иммуносупрессии представляет собой сложную научно-практическую задачу, в рамках которой были детально изучены фундаментальные механизмы формирования иммунной толерантности, установлены принципы развития костномозгового химеризма, оптимизированы протоколы кондиционирования реципиентов и разработаны стратегии посттрансплантационной иммуносупрессии. Накоплен значительный объем данных, касающихся ограничений и побочных эффектов различных методов миелоабляции и иммуносупрессивной терапии [A. Czechowicz et al., 2007; A.D. Griesemer et al., 2010; B. Gyurkocza et al., 2014]. Несмотря на существенный прогресс в понимании базовых механизмов, внедрение этих знаний в клиническую практику остается ограниченной: на сегодняшний день не разработано широко применимых клинических протоколов, позволяющих добиться долговременного приживания аллогенных трансплантатов без риска развития РТПХ, отторжения трансплантата, токсических осложнений кондиционирования и необходимости пожизненной иммуносупрессии.

Цель исследования

Разработка модели немиелоаблативного кондиционирования на мышах с использованием моноклональных антител для трансплантации аллогенного костного мозга.

Задачи исследования

1. Разработать безопасные режимы кондиционирования перед аллогенной трансплантацией костного мозга.
2. Оценить частоту формирования химеризма у реципиентов после аллогенной трансплантации костного мозга на фоне разработанных режимов кондиционирования.
3. Провести сравнительный анализ уровня донорского химеризма в крови и лимфоидных органах после трансплантации костного при разных режимах кондиционирования.

4. Провести сравнительную оценку темпов и полноты восстановления иммунной системы после применения разработанных режимов кондиционирования мышей и последующей пересадки костного мозга.

5. Оценить формирование иммунной толерантности к аллогенному трансплантату по выживаемости кожного лоскута от мышей-доноров костного мозга при разных режимах кондиционирования.

Научная новизна работы

Впервые разработана и экспериментально апробирована принципиально новая стратегия немиелоаблативного кондиционирования реципиентов перед аллогенной трансплантацией костного мозга, основанная на сочетанном применении подобранной комбинации моноклональных антител и индуктора апоптоза. Данный подход является инновационной альтернативой стандартному сублетальному облучению.

Впервые в практике экспериментальной трансплантологии проведена комплексная сравнительная оценка эффективности кондиционирования комбинацией моноклональных антител и индуктора апоптоза в сопоставлении с классическим режимом на основе сублетального облучения. Критериями оценки послужили уровень и стабильность донорского химеризма, динамика реконституции иммунной системы и индукции толерантности.

Установлено, что все разработанные режимы кондиционирования позволяют достичь устойчивого смешанного или полного донорского химеризма, но не все режимы способны индуцировать длительную иммунную толерантность к аллотрансплантату кожи от донора костного мозга.

Теоретическая значимость работы

Получены новые фундаментальные данные о корреляции между уровнем донорского химеризма, эффективностью восстановления иммунной системы и степенью периферической толерантности к аллогенным трансплантатам. Установлены причинно-следственные связи между режимом кондиционирования, глубиной деплеции собственных гемопоэтических клеток реципиента и

последующим восстановлением иммунной системы реципиентов, что вносит вклад в понимание механизмов функционирования костномозговых клеточных ниш и органов иммунной системы. Кроме того, доказана принципиальная возможность использования ингибиторов апоптоза (венетоклакса) не только в онкогематологии, но и в качестве иммуномодулирующего агента в трансплантологии для преодоления гистонесовместимости.

Показано, что субпопуляция CD4⁺-Т-клеток является более чувствительной у мышей по сравнению с субпопуляцией CD8⁺-Т-клеток после кондиционирования и последующей ТКМ. Продемонстрирована избирательная радиочувствительность лимфоузлов по сравнению с тимусом, селезенкой и костным мозгом. Полученные результаты способствуют углублению знаний о механизмах восстановления иммунной системы после кондиционирования и ТКМ, а также обеспечивают формирование научной базы для оптимизации протоколов кондиционирования и расширяют возможности применения трансплантации аллогенного костного мозга для индукции иммунной толерантности.

Практическая значимость работы

Разработана новая экспериментальная модель индукции иммунной толерантности к трансплантату с помощью комбинированного немиелоаблативного кондиционирования на основе моноклональных антител и индуктора апоптоза.

Разработанные протоколы кондиционирования представляют собой менее токсичную альтернативу традиционным методам кондиционирования для получения химерных животных в доклинических исследованиях и характеризуются низким риском развития РТПХ, осложнений кондиционирования и отторжения трансплантата. Предложенная стратегия создания устойчивого химеризма и иммунной толерантности является основой для разработки протоколов трансплантации солидных органов без необходимости пожизненной иммуносупрессии и строгого подбора полностью HLA-идентичных пар донор-реципиент, что может значительно расширить пул доноров. Потенциальное внедрение полученных данных в клиническую практику может повысить

доступность и безопасность трансплантации для пациентов с гематологическими, онкологическими и аутоиммунными заболеваниями, а также нуждающихся в пересадке органов.

Таким образом, данное исследование вносит значительный вклад как в развитие фундаментальной иммунологии и трансплантологии, так и в создание новых терапевтических стратегий с высоким потенциалом клинического применения.

Внедрение результатов исследования в практику

Результаты включены в материал лекций для аспирантов, обучающихся в ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России. Разработанные режимы кондиционирования мышей-реципиентов перед трансплантацией костного мозга, основанные на использовании комбинации моноклональных антител против молекул CD8 и CD40L, тотального облучения тела в дозе 3 Гр и 1,5 Гр и венетоклакса и приводящие к формированию смешанного гемопоэтического химеризма, внедрены в лаборатории дифференцировки лимфоцитов и используются для проведения исследований (акт внедрения от 1 июня 2024 г. и акт внедрения от 1 сентября 2024 г.).

Методология и методы исследования

Для выполнения диссертационной работы были использованы современные методы исследования. Кондиционирование реципиентов проведено с использованием установки для тотального облучения тела мышей, современных моноклональных антител, полученных гибридомным методом. Трансплантация аллогенных клеток, тканей и органов проведена с соблюдением одобренных протоколов. Оценка иммунной толерантности осуществлена с помощью пересадки аллогенного кожного трансплантата и последующей оценки его приживления. Оценка формирования химеризма и восстановления иммунной системы проведена с использованием проточной цитометрии. Обработка первичных результатов проведена с использованием программных обеспечений Microsoft Excel, GraphPad Prism 9, FlowJo.

Положения, выносимые на защиту

1. Представленные режимы немиелоаблативного кондиционирования по-разному влияют на характер приживания донорских гемопоэтических клеток: при сублетальном облучении формируется полный донорский химеризм, при сочетании облучения и моноклональных антител или моноклональных антител и препарата-индуктора апоптоза формируется смешанный химеризм.

2. Режим кондиционирования влияет на время выживаемости аллогенных кожных трансплантатов в зависимости от степени воздействия на периферические Т-клетки.

3. Режим кондиционирования, основанный на использовании облучения и моноклональных антител, обеспечивает приживание донорских гемопоэтических стволовых клеток и характеризуется наименьшим повреждающим воздействием на процессы иммунной реконституции.

Степень достоверности результатов

Достоверность представленных результатов определяется четко сформулированными целью и задачами, планом исследования, достаточным для статистического анализа количеством наблюдений, использованием статистических методов исследования, адекватных поставленным задачам. Приведённые в диссертации данные получены с использованием современного оборудования, прошедшего своевременную поверку и зарегистрированного в реестре средств измерения. Установлено, что результаты диссертационной работы являются достоверными.

Апробация результатов

Результаты диссертационной работы были представлены на: Научной школе-конференции «Молекулярные механизмы иммунитета и других физиологических процессов» (Сочи, 14-16 декабря 2023 г.); Международном конгрессе по молекулярной иммунологии и аллергологии ИМАС-24 (Москва, 28-29 ноября 2024 г.); Школе по аллергологии и иммунологии им. академика Р.М. Хаитова (Москва, Российская Федерация, 6-7 марта 2025 г.). Апробация диссертации состоялась на заседании секции №1 ученого совета ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России 25 сентября 2025 г.

Личный вклад автора

Личный вклад соискателя состоит в непосредственном участии во всех этапах выполнения исследований для диссертации, непосредственном участии в получении первичных результатов в экспериментах по разработке селективных режимов кондиционирования и оценке их эффективности, их обработке, анализе и интерпретации, а также в подготовке публикаций по теме исследования.

Полнота изложения материалов диссертации в опубликованных работах

По основным материалам диссертационной работы опубликовано 6 статей в рецензируемых периодических научных изданиях, рекомендованных для публикации основных научных результатов диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук и доктора наук.

Объем и структура диссертации

Диссертация оформлена в традиционном стиле, содержит 130 страниц машинописного текста, 32 рисунка и 12 таблиц. Работа включает «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждение», «Заключение», «Выводы», «Список сокращений» и «Список литературы», включающий 105 источников, в том числе 8 отечественных и 97 зарубежных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные. Исследование проводили на линейных мышах в возрасте 6–8 недель. Работы по созданию костномозговых химер осуществляли на самках мышей линии BALB/c (гаплотип H-2d), C57BL/6 (гаплотип H-2b) SPF-статуса.

Получение лимфоидных органов. Для эвтаназии мышей использовали цервикальную дислокацию. Селезенку, 4 лимфатических узла, тимус, костный мозг из 4 костей, трансплантат тимуса извлекали и гомогенизировали.

Облучение животных. Облучение мышей проводили на рентгеновском аппарате «АРДОК-1» (Россия). Контроль отпускаемой дозы и воспроизводимость условий эксперимента осуществляли встроенным клиническим дозиметром с ионизационной камерой. Продолжительность облучения зависела от задаваемой дозы.

Кондиционирование реципиентов. Моноклональные антитела против CD8, CD4, CD117, CD40L вводили внутрибрюшинно. Венетоклакс вводили перорально.

Режим введения МАТ, препаратов и их комбинирование определяли, исходя из задач каждого эксперимента.

Трансплантация аллогенного костного мозга. Костный мозг получали из костей, удаляли эритроциты. Выделенные клетки костного мозга разводили в фосфатно-солевом буфере, доводя концентрацию до 3.75×10^7 клеток/мл из расчета на живые клетки. Реципиентам в боковую вену хвоста вводили суспензию клеток костного мозга (3.0×10^7 клеток на мышшь).

Оценка химеризма и восстановления иммунной системы. Оценку уровня костномозгового химеризма выполняли после пересадки костного мозга методом проточной цитометрии, анализируя соотношение сингенных и аллогенных лейкоцитов крови, тимуса, трансплантата тимуса и лимфоузлов.

Оценку восстановления иммунной системы проводили с помощью проточной цитометрии, анализируя общее число клеток и число клеток в субпопуляциях в тимусе, селезенке, лимфоузлах, костном мозге и тимусном трансплантате. Анализ данных проводили с помощью программного обеспечения FlowJo 7.6.

Хирургические операции на аллогенных химерах. Кожные трансплантаты пересаживали между лопаток мышам-реципиентам от аллогенных мышей-доноров с хвостовой части. Трансплантацию аллогенного тимуса реципиентам производили под капсулу почки.

Для статистического анализа данных использовали программу GraphPad Prism (версия 10.1.1). Значимые различия между группами обозначены: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, ns – статистически недостоверно.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Создание моделей немиелоаблативного кондиционирования

Мыши были разделены на 6 групп. В каждой экспериментальной группе было по 10 голов. В группе «контроль» было 7 мышей. Мышей контрольной группы (группа «контроль») манипуляциям не подвергали.

В 1-й группе (группа «4,5 Гр») мышей облучали в дозе 4,5 Гр в -1 сутки и пересаживали аллогенный костный мозг (аККМ) в 0 сутки. Во 2-й группе (группа «4,5 Гр+аТТ») мышей облучали в дозе 4,5 Гр в -1 сутки и пересаживали аККМ в 0

сутки. Дополнительную трансплантацию аллогенного тимуса проводили для оценки вклада тимуса в восстановление иммунной системы после кондиционирования и ТКМ. В 3-й группе (группа «3Гр+МАТ») мышам вводили МАТ против CD8 в -2 сутки, облучали в дозе 3 Гр в -1 сутки, вводили МАТ против CD40L для блокады костимуляции и пересаживали аККМ в 0 сутки с интервалом в 6 часов. В 4-й группе (группа «1,5 Гр+АВТ-199») мышам вводили венетоклак (АВТ-199) с -3 по + 12 сутки, кроме 0 суток, облучали в дозе 1,5 Гр в -1 сутки, вводили МАТ против CD40L и пересаживали аККМ в 0 сутки с интервалом в 6 часов. В 5-й группе (группа «АВТ-199+МАТ») мышам вводили венетоклак (АВТ-199) с -8 по -2 сутки, МАТ против CD117 в -6 сутки, МАТ против CD8 в -5 сутки, МАТ против CD4 в -2 и -1 сутки, МАТ против CD40L и пересаживали аККМ в 0 сутки с интервалом в 6 часов.

Формирование химеризма при использовании разработанных режимов кондиционирования

В группах «4,5 Гр» и «4,5 Гр+аТТ» использовали ТОТ (тотальное облучение тела) в дозе 4,5 Гр. Суммарно, из 20 животных 19 стали полными (уровень химеризма >90%) костномозговыми химерами, как видно из Рисунка 1.

При использовании режима кондиционирования, включающего в себя ТОТ 3 Гр и анти-CD8 и анти-CD40L МАТ, 10 из 10 мышей стали смешанными (>1% донорских клеток) костномозговыми химерами (Рисунок 1).

Режим кондиционирования, включающий в себя ТОТ 1,5 Гр, введение МАТ против CD40L и венетоклакса, приводит к формированию химеризма у 9 из 10 животных (Рисунок 1).

Режим кондиционирования, основанный на использовании венетоклакса и анти-CD8, анти-CD4, анти-CD40L и анти-CD117 МАТ для деплеции ГСК реципиента, привел к формированию химеризма только у 7 из 10 реципиентов (Рисунок 1).

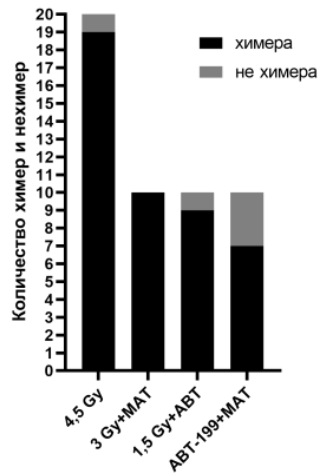


Рисунок 1 – Количество химерных и нехимерных животных при использовании различных режимов кондиционирования и аллогенной ТКМ

Таким образом, сублетальное в дозе 4,5 Гр облучение приводит к формированию полного донорского химеризма, использование селективных режимов кондиционирования приводит к формированию различных уровней смешанного химеризма.

Уровни химеризма в периферической крови реципиентов после использования разработанных режимов кондиционирования

Определен уровень химеризма в периферической крови на 14, 28, 56 и 90 сутки после ТКМ. В группе 1 процент клеток донора среди гранулоцитов, моноцитов, В- и Т-клеток составлял 100,0% во всех точках тестирования. Такая же закономерность была выявлена и в группе «4,5 Гр+аТТ».

В группе «3Гр+МАТ» на 14 сутки среди гранулоцитов было 57,95% донорских клеток, а к 90 суткам уже – 79,00%, среди моноцитов процент донорских клеток так увеличился с 54,15% до 96,25% (90 сутки). Смешанный химеризм наблюдался и в субпопуляции В-клеток, где процент донорских клеток на 14 сутки составил 26,10%, 66,75%, 76,65% и 80,90% на 14, 28, 56 и 90 сутки, соответственно. Химеризм среди Т-клеток крови увеличился с 0,40% до 72,55% с 14 суток до 90 суток.

В группе «1,5 Гр+АВТ-199» процент донорских гранулоцитов и моноцитов уменьшался с 14 до 90 суток с 44,60% до 27,00% и с 88,90% до 69,70%, соответственно. Принципиально другая картина наблюдалась в лимфоидной линии

дифференцировки: процент донорских В-клеток оставался стабильным во всех точках тестирования около 80,00%, а процент Т-клеток увеличился с 1,40% до 48,20% к концу периода тестирования.

В группе «АВТ-199+МАТ» процент донорских гранулоцитов не превышал 30,00%. Уровень химеризма среди моноцитов был еще ниже – не более 10,00% клеток донора во всех точках тестирования. Процент клеток донора среди В-лимфоцитов оставался на уровне 4,00 – 7,00 % в каждой точке тестирования, среди Т-клеток процент химеризма был выше, около 20,00%.

Таким образом, селективные режимы кондиционирования обеспечивают формирование смешанного многолинейного химеризма по сравнению с режимом кондиционирования, основанном на облучении в дозе 4,5 Гр. Однако полный отказ от облучения и замена его на МАТ против CD117 для истощения ГСК обеспечивает низкие уровни смешанного химеризма с преобладанием собственных клеток реципиента, что говорит о необходимости дополнительных воздействий на ГСК реципиента.

Исследование уровня химеризма в лимфоидных органах после использования разработанных режимов кондиционирования

На 180 сутки после ТКМ проведено исследование уровней химеризма среди ГСК в костном мозге, DN-тимоцитов и SP-тимоцитов в тимусе и тимусном трансплантате, т.к. DP-тимоциты не экспрессируют молекулы МНС I класса, и Т- и В-клеток в лимфоузлах реципиентов.

Как и ожидалось, с уменьшением дозы облучения или при отказе от него процент донорских клеток среди ГСК так же уменьшался. В группах «4,5 Гр» и «4,5 Гр+аТТ» процент донорских клеток составлял 99,80% и 99,70%, соответственно. В группе с режимом кондиционирования, основанном на ТОТ 3 Гр и введении МАТ, процент донорских клеток составлял 61,15%. При уменьшении дозы ТОТ до 1,5 Гр и использовании анти-CD40L МАТ и венетоклакса у реципиентов было 9,45% донорских ГСК. В группе «АВТ-199+МАТ» среди ГСК сформировался микрохимеризм: 0,50 % донорских ГСК (<1% донорских клеток).

На 180 сутки в группе «4,5 Гр» и «4,5 Гр+аТТ» процент донорских клеток среди DN-тимоцитов и SP-тимоцитов составлял около 100%, как в собственных тимусах, так и в аллотрансплантате тимуса. В группе «3 Гр+МАТ» уровень химеризма среди DN, SP CD4⁺ и CD8⁺-тимоцитов был 71,07%, 76,57%, 95,79%, соответственно. В группе «1,5 Гр+АВТ-199» среди DN-тимоцитов было 33,12% клеток донора, процент донорских клеток среди SP CD4⁺ и CD8⁺-тимоцитов был 50,53% и 64,65%, соответственно. В группе «АВТ-199+МАТ» в субпопуляции DN-тимоцитов процент донорских клеток составлял 4,41%. В субпопуляциях сингл-позитивных CD4⁺- и CD8⁺-тимоцитов наблюдали 8,04% и 10,08%, соответственно.

После использования ТОТ в дозе 4,5 Гр к 180 суткам после ТКМ процент донорских клеток среди Т- и В-лимфоцитов составлял почти 100%. При использовании селективных режимов кондиционирования наблюдалось формирование смешанного химеризма, и в группе с ТОТ 3 Гр и МАТ около половины Т- и В-лимфоцитов была донорского происхождения: 44,75% и 45,75%, соответственно. В группе «1,5 Гр+АВТ-199» количество клеток донора среди Т-лимфоцитов было 37,60 %, а среди В-лимфоцитов – 43,00 %. В группе «АВТ-199+МАТ» химеризм в лимфоузлах был на низком уровне: 6,80% среди Т-лимфоцитов и 2,20% среди В-лимфоцитов.

Полученные данные показывают, как и при исследовании уровня химеризма в крови, демонстрируют, что режим кондиционирования, основанный только на введении МАТ и венетоклакса, приводит к формированию микрохимеризма в костном мозге реципиентов, и, соответственно, низким уровням химеризма в тимусе и лимфоузлах, и свидетельствует о недостаточном воздействии анти-CD117 МАТ для освобождения клеточных ниш для ГСК донора в костном мозге реципиента.

Эффективность приживления аллогенных кожных трансплантатов при разных уровнях химеризма

Для проверки индукции иммунной толерантности реципиентам трансплантировали аллогенный кожный лоскут. В контрольной группе (n=6) у всех животных отторглись кожные трансплантаты, среднее время выживаемости трансплантата составило 16 суток (Рисунок 2).

В группе «4,5 Гр» (n=10) и «4,5 Гр+aТТ» (n=9) (1 мышь была выведена из эксперимента из-за РТПХ) у всех химерных мышей кожные трансплантаты успешно прижились и функционировали 180 суток до конца периода наблюдения. У одной мыши, которая не являлась химерой, трансплантат был отторгнут на 30 сутки (Рисунок 2).

В группе «3 Гр+МАТ» (n=10) среднее время выживания трансплантата составило 180 суток (Рисунок 2). У мыши с низким уровнем химеризма относительно других мышей наблюдалось воспаление вокруг трансплантата, а затем отторжение на 28 сутки.

В группе «1,5 Гр+АВТ-199» (n=10) у 5 из 10 реципиентов трансплантаты отторглись (Рисунок 2). У 3 из 5 химер к концу периода наблюдения были видны фрагменты трансплантата и воспаление вокруг, что может свидетельствовать о хроническом отторжении, у 2 реципиентов зафиксированы фрагменты трансплантата меньше 10% без воспаления.

В группе «АВТ-199+МАТ» (n=10) у трех мышей-нехимер кожные лоскуты отторглись на 18 сутки после трансплантации, у 7 мышей к концу наблюдения не выявлено видимых фрагментов донорской кожи. Наблюдались лишь единичные черные волосы или волосяные луковицы (Рисунок 2).

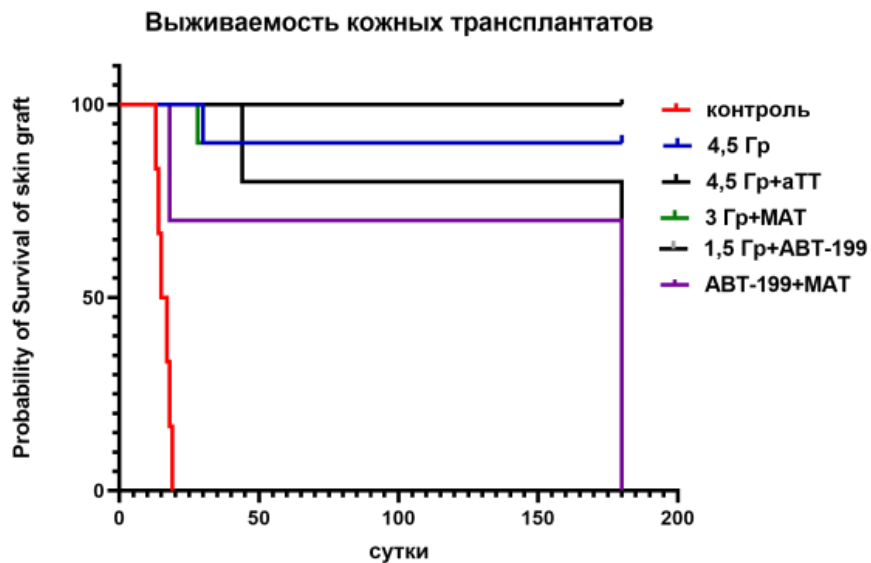


Рисунок 2 – Анализ приживления кожных аллотрансплантатов у мышей-реципиентов при разных режимах кондиционирования

Как и ожидалось, у полных костномозговых химер была индуцирована толерантность к аллогенным кожным лоскутам от того же донора, что и донор костного мозга. Кроме того, дополнительно трансплантированный аллогенный тимус в одной из групп также успешно прижился и функционировал как полноценный центральный орган иммунной системы, генерируя Т-лимфоциты.

Важно отметить, что постоянный низкий уровень химеризма после использования режима кондиционирования без облучения, связан с менее успешным приживлением кожных аллотрансплантатов у всех реципиентов, что может быть связано с иммунным ответом на минорные антигены гистосовместимости.

Восстановление костного мозга после использования разработанных режимов кондиционирования

Для оценки восстановления иммунной системы после разных режимов кондиционирования и ТКМ исследованы лимфоидные органы реципиентов. На 180 сутки после ТКМ обнаружено, что общее количество клеток в костном мозге восстановилось во всех группах до уровня контроля, независимо от режима кондиционирования, только в группе «1,5 Гр+АВТ-199» число лимфоцитов превосходило контрольные значения ($p=0,0032$).

Число ГСК также восстановилось во всех группах, кроме групп «4,5 Гр» и «4,5 Гр+аТТ» ($p=0,0013$ и $p=0,0165$).

Показано, что сублетальное облучение в дозе 4,5 Гр, облучение в более низкой дозе в 3 Гр и 1,5 Гр или использование моноклональных антител против CD117 не приводит к уменьшению общей численности клеток в костном мозге, но облучение в дозе 4,5 Гр влияет на восстановление ГСК.

Восстановление тимопоэза

При исследовании тимуса и тимусного трансплантата установлено, что общее количество тимоцитов во всех тимусах, кроме сингенного тимуса в группе «4,5 Гр+аТТ» и тимуса в группе «4,5 Гр», восстановилось до уровня контроля. ($p<0,0001$ и $p=0,0296$). Число клеток в субпопуляции DN-timoцитов было достоверно меньше также только в группе «4,5 Гр» и сингенном тимусе в группе «4,5 Гр+аТТ». Число DP-timoцитов достоверно уменьшилось в 2 и 10 раз по сравнению с

контролем в группах «4,5 Гр» и сингенном тимусе «4,5 Гр+аТТ» ($p=0,0336$ и $p<0,0001$).

Число SP CD4⁺- и CD8⁺-тимоцитов не отличалось от контроля во всех группах. Исключение составляет сингенный тимус в группе «4,5 Гр+аТТ», где чисто SP CD4⁺ Т-клеток было значительно меньше, чем в контроле ($p=0,0002$).

В данном исследовании продемонстрировано, что тимопоэз успешно восстанавливается во тех группах, где доза облучения меньше 4,5 Гр. Тем не менее, доза 4,5 Гр не приводит к изменению стромы тимуса, которое препятствовало бы эффективному тимопоэзу и регенерации Т-клеточного иммунитета. Также можно говорить об успешном приживлении аллогенного тимусного трансплантата, поскольку его функциональная активность не отличается от функциональной активности тимуса контрольных мышей, которые не подвергались кондиционированию. Кроме того, показано, что донорские предшественники преимущественно выбирают донорский тимус по сравнению с собственным тимусом реципиента для миграции и дальнейшей дифференцировки.

Восстановление иммунных клеток селезенки

Селезенка является важным вторичным лимфоидным органом, в котором происходит адаптивный иммунный ответ, поэтому восстановление лимфоидных субпопуляций после различных режимов кондиционирования на периферии оценивалось в селезенке.

Общее число спленоцитов и В-лимфоцитов полностью восстановилось к 180 суткам во всех группах, при этом важно отметить, что в группе «1,5 Гр+МАТ» число В-лимфоцитов было больше, чем в контроле ($p=0,0223$).

Количество Т-хелперов уменьшилось в группе «4,5 Гр+аТТ» 2,4 раза ($p=0,0196$), а количество ЦТЛ клеток достоверно не отличалось во всех группах от контроля. Вероятно, субпопуляция CD4⁺ Т-клеток является более радиочувствительной и восстанавливается медленнее, чем субпопуляция CD8⁺ Т-клеток.

Интересно, что количество Т-регуляторных клеток в группе «4,5 Гр+аТТ» и в группе «4,5 Гр» было меньше, чем в контроле ($p=0,0050$ и $p=0,0499$, соответственно)

при почти не отличающемся числе Трег в группах с селективным кондиционированием.

Кроме того, оценка вклада гомеостатической пролиферации в восстановление иммунной системы после ТКМ показала, что в группах с облучением количество Tnaive-клеток в субпопуляциях ЦТЛ и Т-хелперов уменьшается, как и количество Tcentral memory-клеток без изменения соотношения между ними. Это свидетельствует об отсутствии конверсии фенотипа наивных клеток в клетки памяти. Только в группе «1,5 Гр+АВТ-199» среди ЦТЛ число наивных Т-клеток уменьшилось, а Tcm – увеличилось, что указывает на конверсию фенотипа.

Восстановление субпопуляций лимфоцитов в лимфоузлах

Общая численность лимфоцитов в группе «4,5 Гр» и «4,5 Гр+аТТ» была меньше, чем в контроле в 12 раз и 5 раз, соответственно ($p=0,0076$ и $p=0,0199$). В группах со сниженными дозами ТОТ или без него общее количество лимфоцитов в лимфоузлах не отличалось от контроля. Количество В-лимфоцитов во всех группах не отличалось от количества В-лимфоцитов у мышей в контроле, кроме группы «1,5 Гр+АВТ-199», где число В-клеток увеличилось в 3,8 раз ($p=0,0047$). Число Т-хелперов было меньше, чем в контроле, в группах с более высокими дозами облучения: 4,5 Гр и 3 Гр: в 17, 11 и 3 раза, соответственно. Количество ЦТЛ не отличалось во всех группах. Как и в лимфоузлах, количество Т-регуляторных клеток было достоверно меньше в группах с ТОТ в дозе 4,5 Гр относительно контроля ($p=0,0006$ и $p=0,0020$, соответственно). Эти данные подтверждают предположение, что субпопуляция CD4⁺-клеток, по-видимому, является чувствительной к облучению и восстанавливается медленнее.

При исследовании возрастного фенотипа Т-клеток обнаружено, что количество Tnaive среди Т-хелперов было достоверно меньше в группах «4,5 Гр», «4,5 Гр+аТТ», «3 Гр+МАТ» по сравнению с группой «контроль». Количество Tcentral memory также достоверно уменьшилось в этих группах.

Число Tnaive среди ЦТЛ было достоверно меньше, чем в контроле в группах «4,5 Гр», «4,5 Гр+аТТ» и «3 Гр+МАТ», число Tcm достоверно не восстановилось

только в группе «4,5 Гр». Число Teffector memory увеличилось в группах «1,5Гр+АВТ-199» и «АВТ-199+МАТ».

Кроме того, при сравнении T_{naive}/T_{cm} в субпопуляции Т-хелперов и ЦТЛ обнаружено, что только в группе «1,5 Гр+АВТ-199» это соотношение для Т-хелперов достоверно меньше, чем в контроле ($p=0,0135$) Это также вызвано не увеличением числа центральных Т-клеток памяти, а низким числом наивных $CD4^+$ Т-клеток. Интересно, что соотношение T_{naive}/T_{cm} среди ЦТЛ также уменьшилось в группе «1,5 Гр+АВТ-199» без уменьшения числа наивных клеток, но с увеличением числа Т-клеток памяти, как центральных Т-клеток памяти, так и эффекторных. Для группы «4,5 Гр+аТТ» соотношение уменьшилось за счет снижения числа, как наивных, так и центральных клеток памяти, что также не является признаком конверсии фенотипа и усиления гомеостатической пролиферации.

Несмотря на полное восстановление тимопоэза количество Т-клеток не восстановилась через полгода после ТКМ. Однако число В-лимфоцитов полностью восстановилось, что может указывать на то, что ниши для В-клеток в строме лимфоузлов менее радиочувствительны.

Таким образом, лимфоузлы оказываются более радиочувствительными органами к относительно низким дозам облучения по сравнению с другими лимфоидными органами, и трансплантация аллогенного тимуса не вносит значительного вклада в пополнение пула Т-клеток в лимфоузлах. И хотя отмечено снижение числа наивных клеток в субпопуляциях Т-хелперов и ЦТЛ, при облучении в дозе 3 Гр, оно не так ярко выражено по сравнению с облучением в дозе 4,5 Гр.

Все это делает режим кондиционирования, основанный на ТОТ в дозе 3 Гр и использовании моноклональных антител, более предпочтительным с точки зрения восстановления иммунной системы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Итоги

В рамках проведенного исследования была впервые разработана и экспериментально апробирована принципиально новая стратегия немиелоаблативного кондиционирования реципиентов перед аллогенной

трансплантацией костного мозга, основанная на сочетанном применении подобранной комбинации моноклональных антител и ингибитора V α 1-2 венетоклакса, что представляет собой инновационную альтернативу стандартному сублетальному облучению. Впервые в практике экспериментальной трансплантологии проведена комплексная сравнительная оценка эффективности данного подхода в сопоставлении с классическим режимом на основе сублетального облучения, где критериями оценки послужили уровень и стабильность донорского химеризма, динамика реконституции иммунной системы и индукция толерантности. Установлено, что разработанные режимы кондиционирования позволяют достичь устойчивого смешанного или полного донорского химеризма, но только режимы кондиционирования с облучением приводят к индукции длительной иммунной толерантности к антигенам донора, что подтверждается долгосрочным приживлением кожного аллотрансплантата. Важным достижением является расширение показаний к применению венетоклакса и доказательство его эффективности в качестве ключевого компонента режима кондиционирования для индукции трансплантационной толерантности в экспериментальной модели.

Детально изучено восстановление иммунной системы после различных режимов кондиционирования, выявлена повышенная чувствительность CD4⁺ Т-клеток к иммуносупрессивным воздействиям по сравнению с CD8⁺ Т-клетками, а также установлено, что даже минимальные дозы облучения приводят к избирательному нарушению восстановления Т-клеточного звена в лимфоузлах без существенного влияния на тимус, костный мозг и селезенку. Полученные данные углубляют понимание механизмов реконституции иммунной системы и формируют научную основу для оптимизации протоколов кондиционирования.

Разработанные протоколы кондиционирования представляют собой менее токсичную альтернативу традиционным методам и открывают перспективы для создания новых клинических подходов к аллогенной трансплантации, направленных на минимизацию рисков РТПХ, токсических осложнений и отторжения трансплантата. Предложенная стратегия является основой для разработки

протоколов аллотрансплантации солидных органов без пожизненной иммуносупрессии.

Таким образом, исследование вносит значительный вклад в развитие фундаментальной и прикладной иммунологии и трансплантологии.

Рекомендации

Для дальнейших экспериментальных исследований рекомендовано использовать режим немиелоаблативного кондиционирования на основе тотального облучения в дозе 3 Гр в комбинации с моноклональными антителами против CD8 и CD40L в качестве оптимального протокола для получения химерных мышей со стабильным смешанным химеризмом и индуцированной иммунной толерантностью. Данный режим демонстрирует наилучшее соотношение эффективности и безопасности, с минимальным повреждением лимфоидных органов. В стандартный алгоритм мониторинга химерных животных предлагается включить оценку восстановления иммунной системы с обязательным анализом клеточности и субпопуляционного состава клеток лимфатических узлов как наиболее чувствительного компартмента к повреждающему действию облучения.

Для перспективных клинических исследований рекомендовано рассмотреть стратегию таргетной деплеции аллореактивных Т-лимфоцитов с помощью моноклональных антител и ингибиторов апоптоза (таких как венетоклакс) в качестве платформы для разработки новых режимов кондиционирования человека, направленных на снижение токсичности и риска развития РТПХ. Предлагается разработать таргетные клинические протоколы на основе моноклональных антител, направленные на достижение устойчивого смешанного химеризма с индукцией толерантности к аллотрансплантатам солидных органов с последующей постепенной отменой иммуносупрессии.

Перспективы дальнейшей разработки темы

Предметом дальнейших исследований является: усовершенствование описанных в работе режимов кондиционирования с полным исключением тотального облучения, например, за счет включения моноклональных антител против CD47 – молекулы, которая защищает ГСК от фагоцитоза, что потенциально усилит клиренс

ГСК реципиента макрофагами и увеличит количество доступных ниш в костном мозге для донорских гемопоэтических стволовых клеток; изучение селективного подавления аллореактивности, включая таргетное подавление иммунного ответа против минорных антигенов гистосовместимости и применение блокады ко-стимулирующих сигналов в день трансплантации кожи для ингибирования активации аллореактивных Т-клеток на периферии; добавление моноклональных антител против Thy1.2 и NK-клеток для усиления деплеции целевых популяций при снижении токсичности; изучение феномена расщепленной толерантности через проведение сочетанной трансплантации кожных лоскутов и других солидных органов для оценки индукции толерантности к разным типам тканей; молекулярно-генетическое исследование аллотрансплантатов кожи для детекции донорских клеток в случаях отсутствия визуальных признаков приживления; исследование молекулярных основ повышенной чувствительности CD4⁺ Т-лимфоцитов к кондиционированию и анализ механизмов избирательного повреждения архитектоники лимфатических узлов при различных режимах кондиционирования; оценка долгосрочной безопасности кондиционирования без облучения, включая мониторинг риска инфекционных осложнений, аутоиммунных патологий и отдаленного онкогенеза. Реализация указанных направлений позволит существенно продвинуться в разработке безопасных и эффективных протоколов индукции трансплантационной толерантности.

ВЫВОДЫ

1. Получены новые данные о корреляции между уровнем донорского гемопоэтического химеризма, эффективностью восстановления иммунной системы и степенью периферической толерантности к аллогенным трансплантатам.

2. Разработаны 5 режимов кондиционирования реципиентов, которые подавляют аллореактивный иммунный ответ, обеспечивают приживление гемопоэтических стволовых клеток донора и приводят к формированию химеризма.

3. Режим кондиционирования с использованием тотального облучения тела в дозе 3 Гр и моноклональных антител против CD8 и CD40L является оптимальным. Режим кондиционирования с использованием облучения в дозе 4,5 Гр не

обеспечивает восстановление лимфоузлов. Режимы кондиционирования с использованием венетоклакса не обеспечивают долгосрочного приживания аллогенного кожного лоскута.

4. При кондиционировании сублетальным облучением (4,5 Гр) химеризм формируется у 95% мышей (19/20), при комбинации облучения (3 Гр) и моноклональных антител – у 100% (10/10), при комбинации облучения (1,5 Гр), моноклональных антител и венетоклакса – у 90% (9/10), при использовании моноклональных антител и венетоклакса – у 70% мышей (7/10).

5. При всех разработанных режимах кондиционирования формируется стабильный многолинейный гемопоэтический химеризм. При облучении тела в дозе 4,5 Гр формируется полный донорский химеризм. При селективных режимах кондиционирования формируется смешанный гемопоэтический химеризм с различным процентом клеток донора в зависимости от воздействия на гемопоэтические стволовые клетки реципиента.

6. При всех режимах кондиционирования происходит восстановление лимфопоэза и численности всех популяций клеток в периферических лимфоидных органах, за исключением лимфоузлов при использовании облучения в дозе 4,5 Гр, а также субпопуляции Т-хелперов в селезенке и лимфоузлах, отсутствие восстановления которых не устраняется трансплантацией аллогенного тимуса.

7. Режимы кондиционирования, приводящие к высокому уровню химеризма, обеспечивают долгосрочное приживание аллогенного трансплантата кожи.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Динамика восстановления субпопуляций Т-лимфоцитов после действия различных повреждающих агентов / Гринько Е.К., Вериго К.С., Мухина Е.А., Шарова Н.И., Комогорова В.В., Литвина М.М., Марзанова С.Н., Донецкова А.Д., Митин А.Н. – Текст: непосредственный // Иммунология. – 2021. – Т. 42, № 4. – С. 346-355. (Категория К2, Q4 по SJR)

2. Гринько Е.К. Усиление гомеостатической пролиферации Т-лимфоцитов после введения циклофосфана у мышей линии С57BL/6 / Гринько Е.К., Марзанова

С.Н., Донецкова А.Д. – Текст: непосредственный // Российский иммунологический журнал. – 2022. – Т. 25, № 1. – С. 37-46. (Категория К2, Q4 по SJR)

3. Роль блокаторов костимуляции в трансплантологии: от эксперимента к клинике / Гринько Е.К., Донецкова А.Д., Варлачев А.В., Митин А.Н. – Текст: непосредственный // Иммунология. – 2023. – Т. 44, № 5 – С. 626-639. (Категория К2, Q4 по SJR)

4. Гринько Е.К. Основные подходы к применению моноклональных антител в иммунотерапии злокачественных новообразований / Гринько Е.К., Донецкова А.Д. – Текст: непосредственный // Иммунология. – 2024. – Т. 45, № 3. – С. 355-366. (Категория К2, Q4 по SJR)

5. Индукция толерантности к аллогенному трансплантату с использованием стратегии смешанного гемопоэтического химеризма: исследования в моделях на крупных лабораторных животных / Никитина О.С., Комогорова В.В., Гринько Е.К., Киреев Б.В., Донецкова А.Д., Митин А.Н. – Текст: непосредственный // Иммунология. – 2025. – Т. 46, № 2. – С.229-242. (Категория К2, Q4 по SJR)

6. Исследование гемограммы и субпопуляционного состава лимфоцитов крови у минипигов после кондиционирования облучением, трансплантации аллогенного костного мозга и васкуляризированного композитного аллотрансплантата / Донецкова А.Д., Муравская М.П., Николаев И.М., Котский М.А., Ткачук Ю.В., Соколова О.Н., Бондаренко А.В., Гринько Е.К., Никитина О.С., Донецков А.Д., Митин А.Н. – Текст: непосредственный // Иммунология. – 2025. – Т. 46, № 5. – С.586-598. (Категория К2, Q4 по SJR)