



ГБОУ ВПО ПСПбГМУ им. И.П. Павлова  
НИИ детской онкологии, гематологии и  
трансплантологии им. Р.М. Горбачевой



# **ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ВЛИЯНИЕ МИКРОХИМЕРИЗМА НА РАЗВИТИЕ ОСЛОЖНЕНИЙ У ПАЦИЕНТОВ С ГАПЛО-ТГСК**

**Смыкова Олеся, Шакирова Алена**

*Санкт-Петербург  
23 апреля 2014*

## МИКРОХИМЕРИЗМ (МХ)

присутствие небольшой популяции генетически отличных клеток от клеток индивидуума в его организме, способных к приживлению и длительной персистенции

### Виды химеризма:

- Фетальный
- Материнский
- Близнецовый
- Трансплантационный
- «Супружеский»
- «От предыдущих беременностей»



## История развития проблемы

- *Начало 1960 годов* – Tuffrey : обнаружение меченных материнских клеток в тканях плода
- *1969* - Walknowska : сообщение о фетальных клетках у матери спустя 2 недели после родов
- *1970* - Шредер : обнаружение Y-содержащих клеток у матери спустя год после родов
- *Конец 1970 годов* – Коллинз : экспериментальное доказательство обмена клеток между двумя эмбрионами
- Liégeois вводит термин «Микрохимеризм»

# Общее значение химерных клеток

- Модуляция иммунных взаимодействий во время беременности
- Взаимодействие с опухолевыми клетками
- Развитие аутоиммунных заболеваний
- *Один из факторов развития РТПХ*

# Антигены при микрохимеризме

- **IRA** – унаследованные отцовские антигены

Представлены на микрохимерных клетках плода

Не представлены на клетках матери

*фетальный микрохимеризм*

- **NIMA** – ненаследуемые материнские антигены

Представлены на материнских микрохимерных клетках

Не представлены на клетках плода (ребёнка) – не наследуются

*материнский микрохимеризм*

# Иммунобиология МХ

- 1) Дендритные клетки
- 2) Т-эффекторные клетки
- 3) Т-регуляторные клетки (CD4 + CD25 + Foxp3 )

*В основе естественного микрохимеризма совместное развитие тимуса и микрохимерных клеток*



## Цель работы

Изучение роли фетального и материнского микрохимеризма  
в развитии посттрансплантационных осложнений  
у пациентов с гаплоидентичной ТГСК

# Цель работы

Изучение роли фетального и материнского микрохимеризма в развитии посттрансплантационных осложнений у пациентов при проведении гаплоидентичной ТГСК

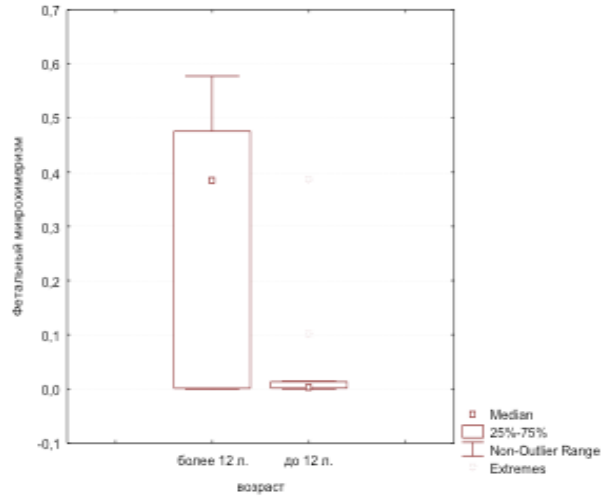
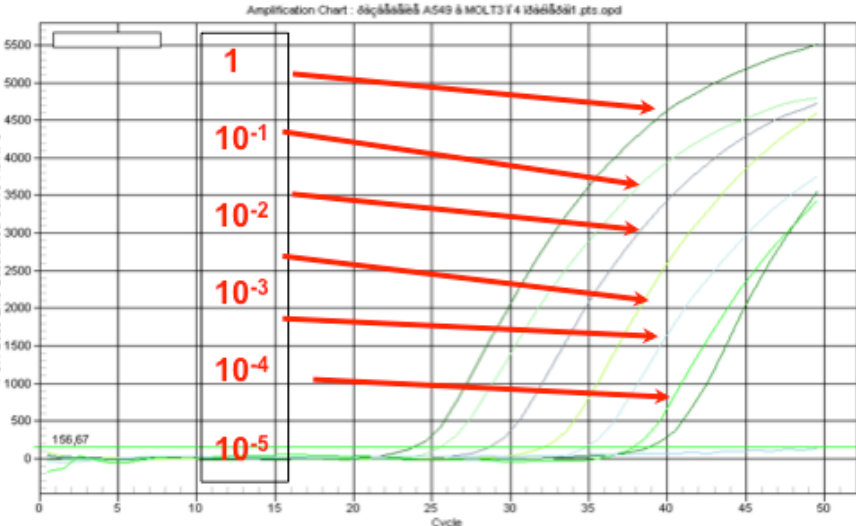
## Основные подходы

- Экспансия нескольких клеточных линий человека (HL60, K562 , 293T, MOLT3, A549 )
- Выделение ДНК из клеточных линий , ПК реципиентов и доноров
- Типирование с помощью аллель-специфичной ПЦР с детекцией продукта в реальном времени
- Создание клеточных разведений, определение чувствительности, воспроизводимости и специфичности методики
- Проведение клинико-лабораторных сопоставлений (20 пар донор-реципиент)

•Возраст: 11 (2-26) лет	
•Острый лимфобластный лейкоз	55% (12)
•Острый миелобластный лейкоз	15% (3)
•Острый бифенотипический лейкоз	10% (2)
•Неходжкинская лимфома	5% (1)
•Ювенильный миеломоноцитарный лейкоз	5% (1)
•Нейробластома	5% (1)



# Определение чувствительности методом клеточных разведений



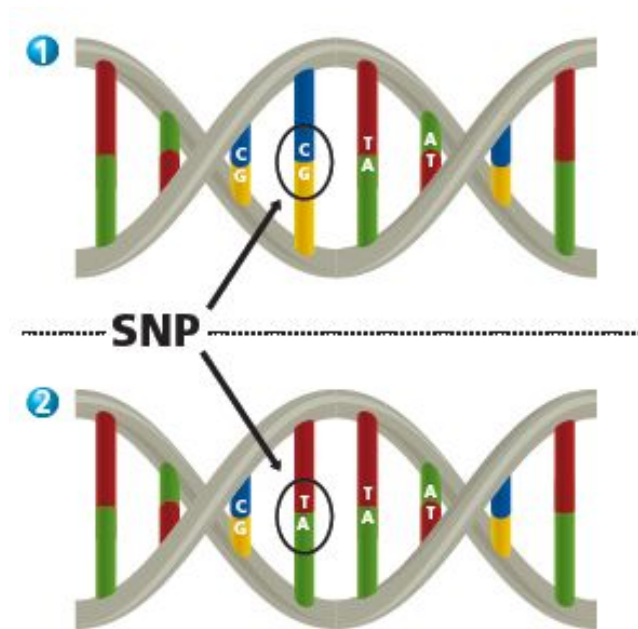
# Влияние уровня фетального микрохимеризма на вероятность развития ОРТПХ

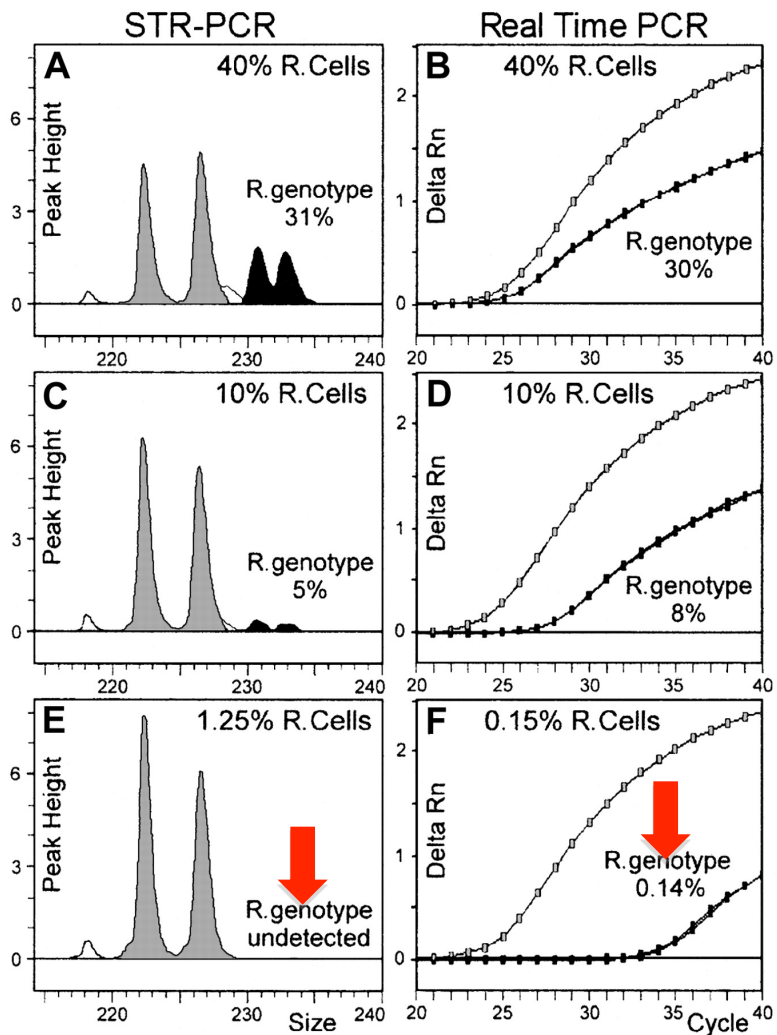
## Материалы и методы

Количество пар донор-реципиент:	20
Возраст:	11 (2-26) лет
Диагноз:	
• Острый лимфобластный лейкоз	55% (12)
• Острый миелобластный лейкоз	15% (3)
• Острый бифенотипический лейкоз	10% (2)
• Неходжкинская лимфома	5% (1)
• Ювенильный миеломоноцитарный лейкоз	5% (1)
• Нейробластома	5% (1)

В качестве маркеров для аллель-специфичной Real-time ПЦР использовались однонуклеотидные последовательности различных генов

**Однонуклеотидный полиморфизм**  
(*Single nucleotide polymorphism, SNP*) —  
отличия последовательности ДНК  
размером в один нуклеотид .





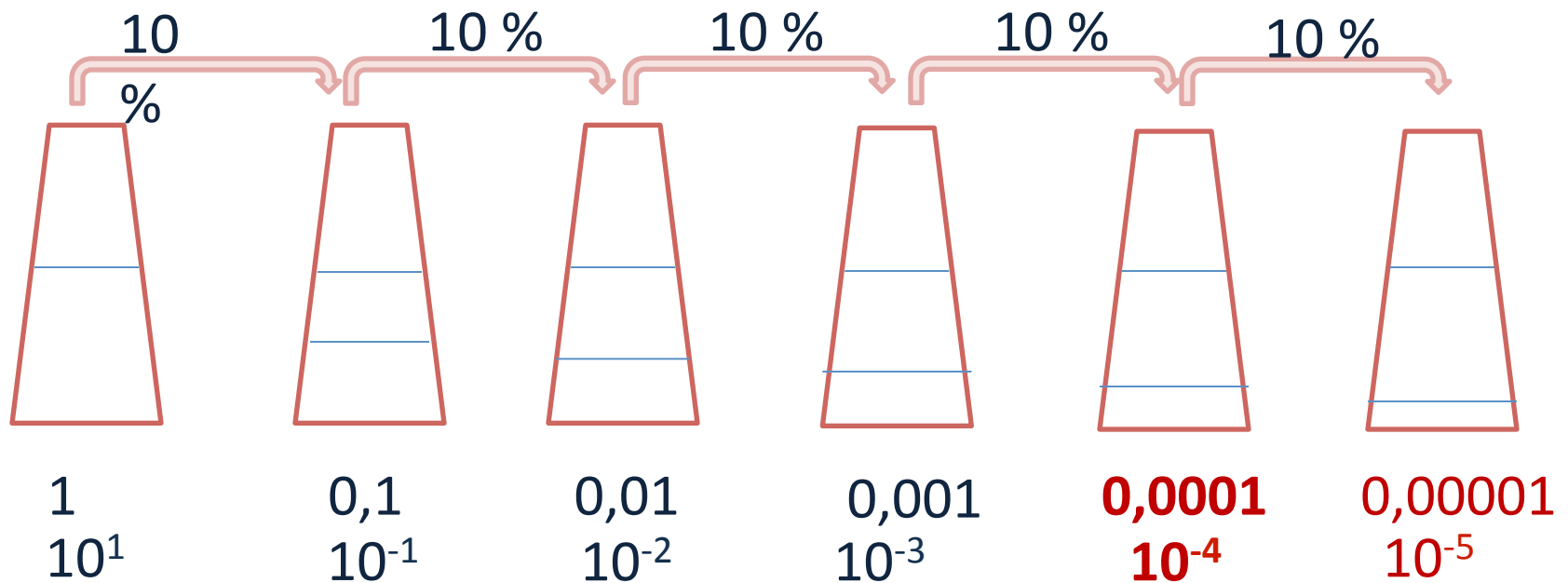
**STR**

**SNP**

## Пациенты были протипированы по 34 SNP-последовательностям

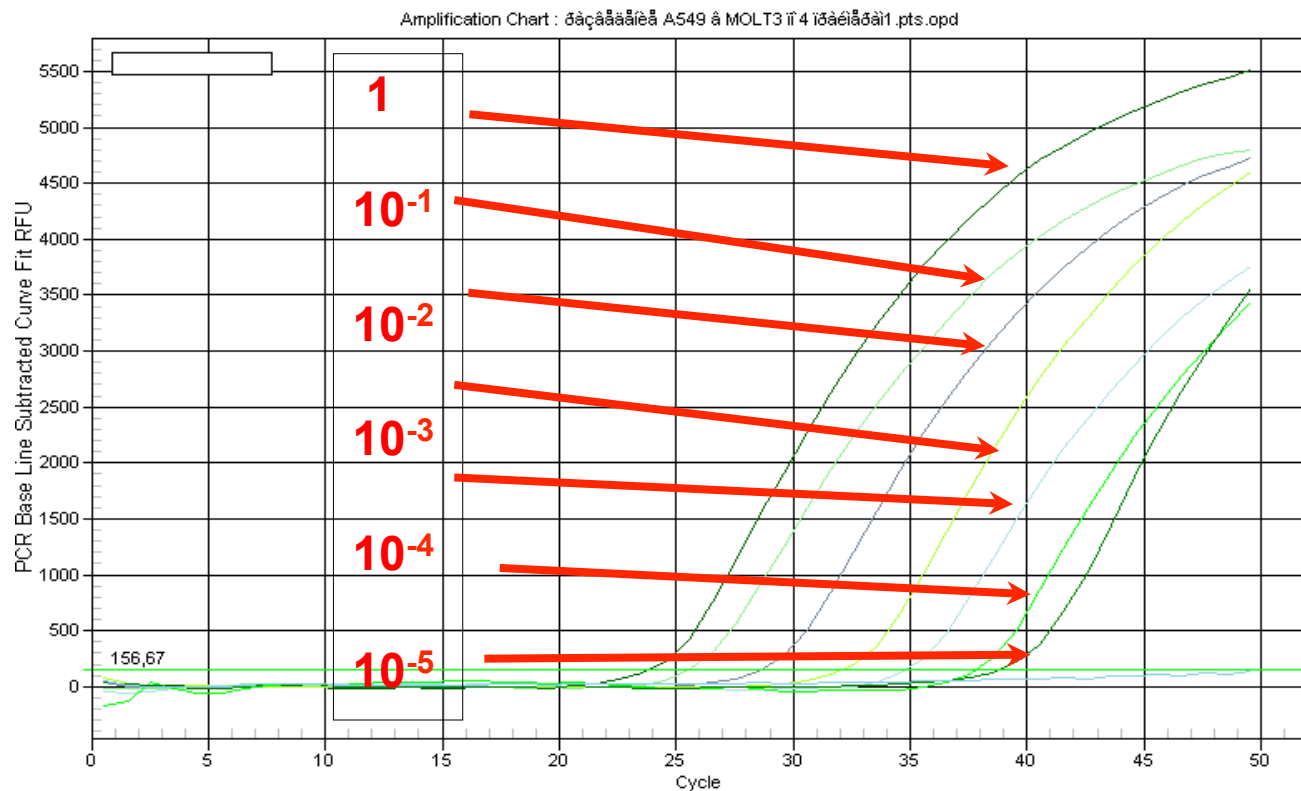
Marker name	Location	Informativity, %	Position	5' Primer 3'	TaqMan (FAM-TAMRA) probe
S 01a	17q	23.6	F	GGTACCGGGTCTCCACATGA	CTGGGCCAGAATCTTGGTCTCACA
			R*	GGGAAAGTCACTCACCCAAGG	
S 01b			F	GTACCGGGTCTCCACCAGG	
S 02	Y	36.4	F	GCTTCTCTGGTTGGAGTCACG	CTGCACCACCAAATCATCCCCGTG
			R	GCTTGCTGGCGGACCCT	
S 03	6q	16.4	F	CTTTTGCTTTCTGTTTCTTAAGGGC	CATACGTGCACAGGGTCCCCGAGT
			R	TCAATCTTTGGGCAGGTTGAA	
S 04a	9	23.6	F*	CTGGTGCCACAGTTACGCT	TCCTGGCAGTGTGGTCCCTTCAGAA
			R	AAGGATGCGTGACTGCTATGG	
S 04b		12.7	R	AGGATGCGTGACTGCTCCTC	
S 05a	20	1.8	F	AAAGTAGACACGGCCAGACTTAGG	CCCTGGACACTGAAAACAGGCAATCCT
			R*	CATCCCCACATAOGGAAAAGA	
S 05b		27.3	F	AGTTAAAGTAGACACGGCCTCCC	
S 06	1p	31.0	F	CAGTCACCCCGTGAAGTCTT	CCCATCCATCTTCCCTACCAGACCAGG
			R	TTTCCCCCATCTGCCTATTG	
S 07a	X	31.0	F	TGGTATTGGCTTTAAAATACTGGG	TCCTCACTTCTCCACCCCTAGTTAAACAG
			R	TGTACCCAAAACCTCAGCTGCA	
S 07b		21.8	F	GGTATTGGCTTTAAAATACTCAACC	
			R	CAGCTGCAACAGTTATCAACGTT	
S 08a	1q	16.4	F	CTGGATGCCTCACTGATCCA	CTCCCAACCCCCATTTCTGCCTG
			R*	TGGGAAGGATGCATATGATCTG	
S 08b		20.2	F	GCTGGATGCCTCACTGATGTT	
S 09a	17q	7.3	F*	GGGCACCCGTGTGAGTTT	TGGAGGATTTCTCCCCTGCTTCAGACAG
			R	TCAGCTTGTCTGCTTTCTGGAA	
S 09b		14.5	R	CAGCTTGTCTGCTTTCTGCTG	
S 10a	18	25.5	F	GCCACAAGAGACTCAG	CAGTGTCCCACTCAAGTACTCCTTTGGA
			R	TGGCTTCCCTGAGGTGGAAT	
S 10b		20.2	F	TTAGAGCCACAAGAGACAACCAG	
S 11a	11	25.5	F	TAGGATTCAACCCTGGAAGC	CAAGGCTTCTCAATTCTCCACCCTTCC
			R*	CCAGCATGCACCTGACTAACA	
S 11b		7.3	F	CCCTGGATCGCCGTGAA	
GAPDH			F	GGAAGTGGAGCTCCACCTTT	CATCCAAGACTGGCTCCTCCCTGC
			R	GCATGGACTGTGGTCTGCAA	

# Создание клеточных разведений

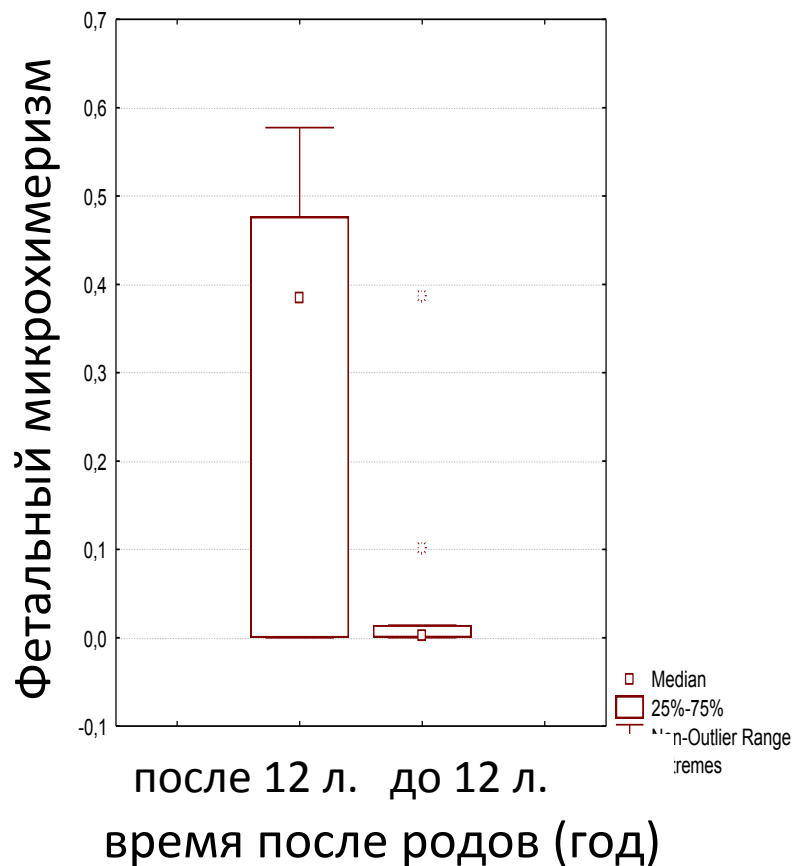


# Определение чувствительности методом клеточных разведений

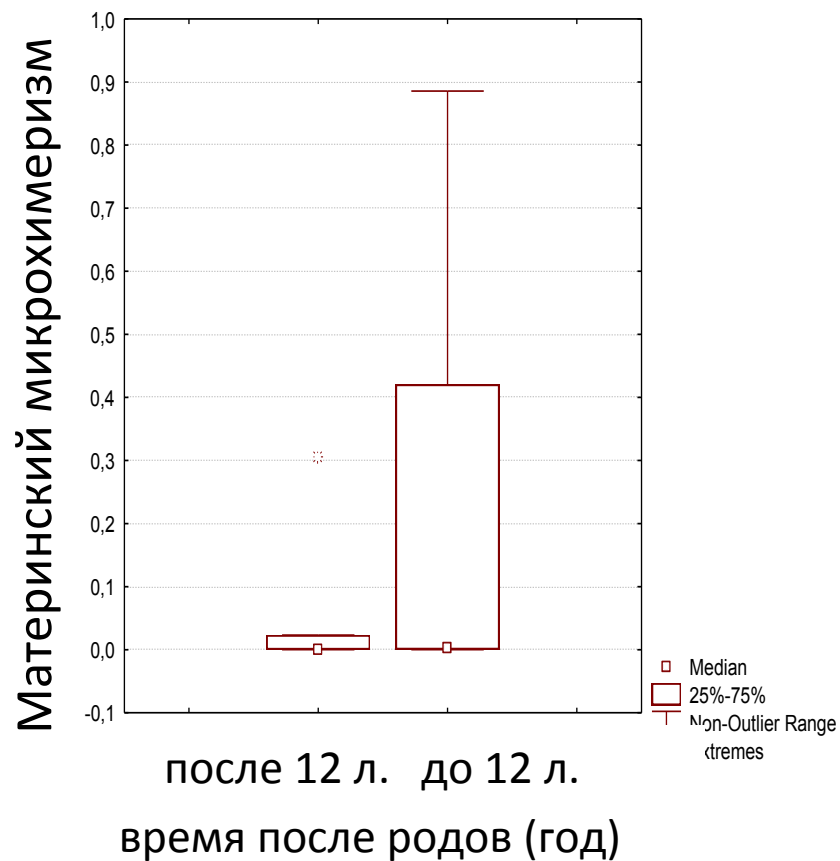
S02	$10^{-5}$
S01B	$10^{-5}$
S05B	$10^{-5}$
S07A	$10^{-5}$
S09B	$10^{-4}$
S01A	$10^{-5}$
S03	$10^{-5}$
S07B	$10^{-5}$
G42863C	$10^{-5}$
HA1GT	$10^{-5}$



# Уровень микрохимеризма после рождения ребенка



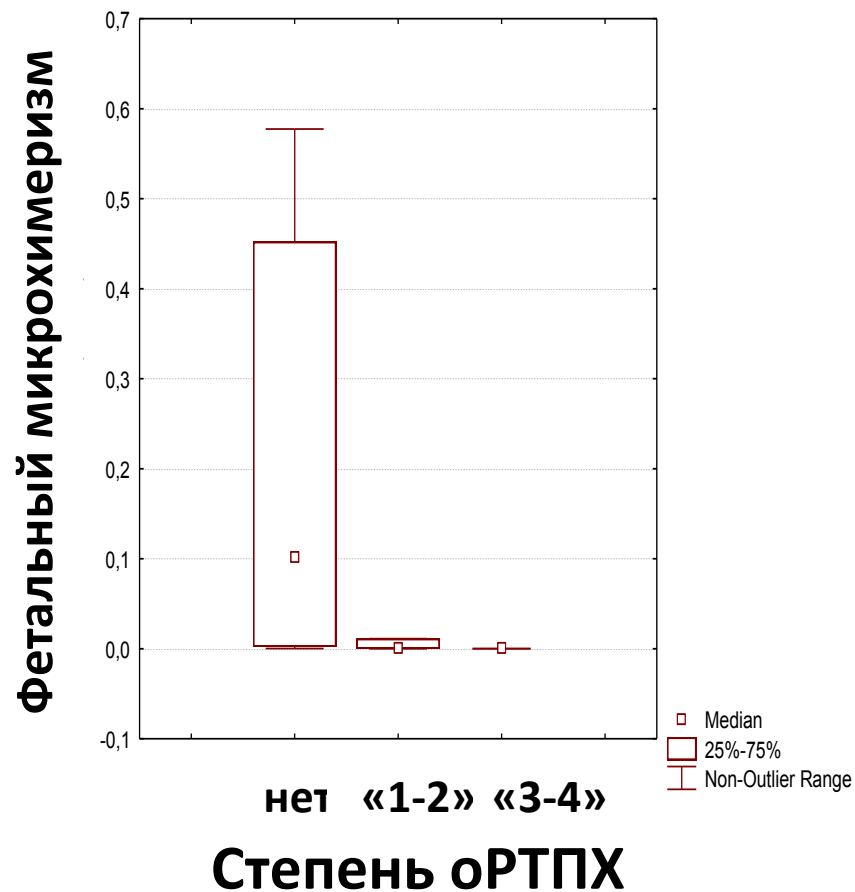
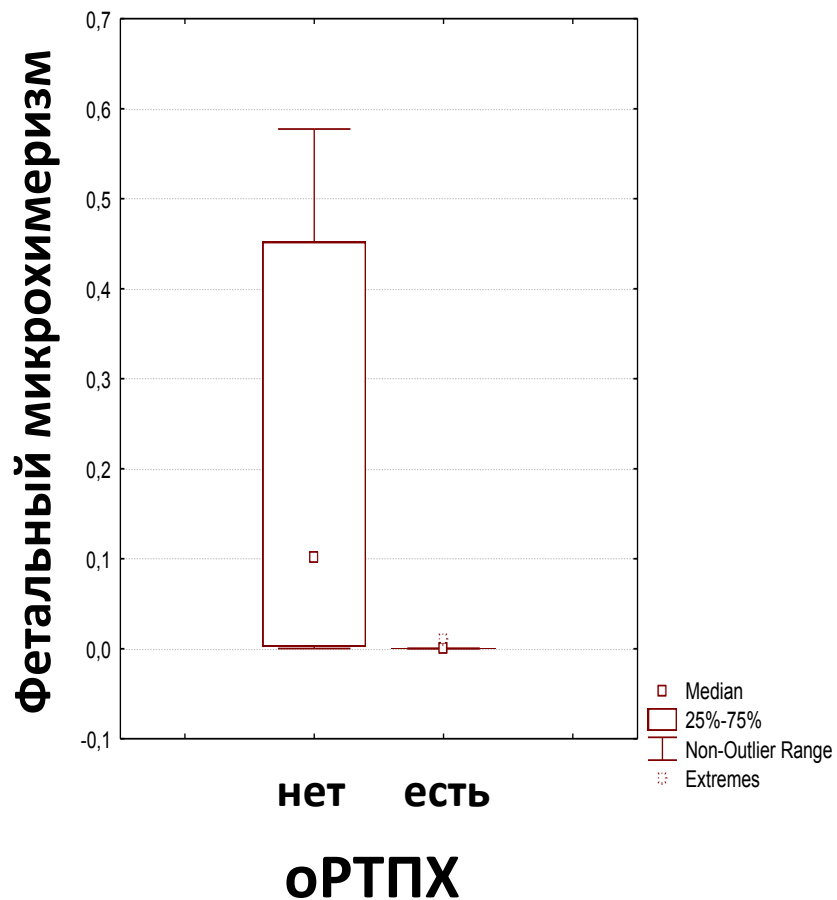
**p=0.048 (T-test)**



**p=0.43 (T-test)**

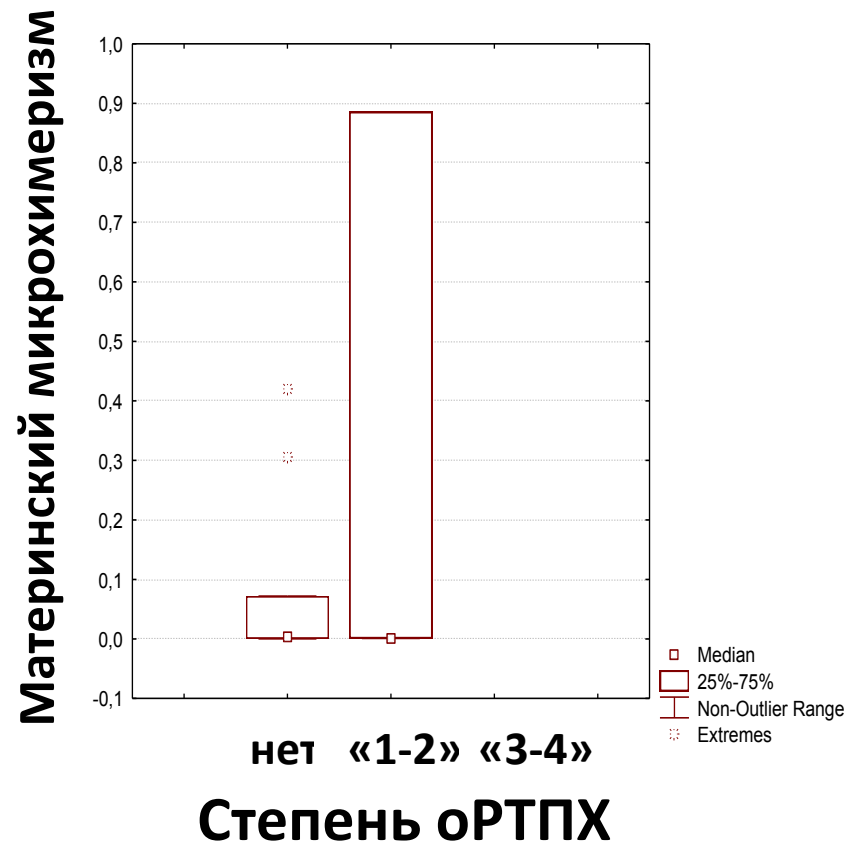
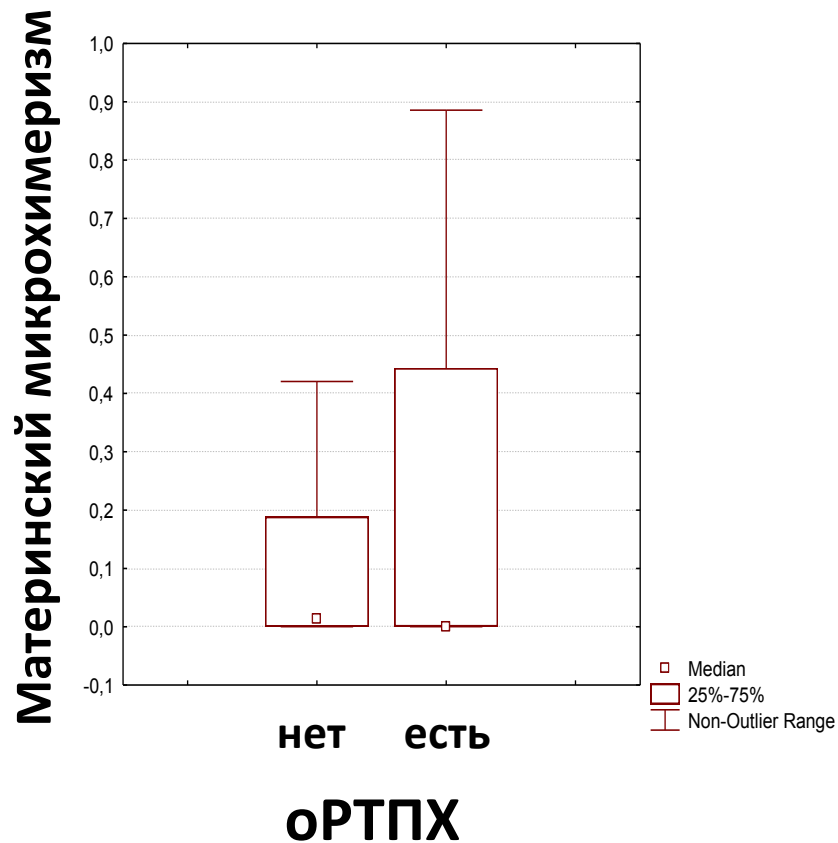


# Влияние уровня фетального микрохимеризма на вероятность развития ОРТПХ



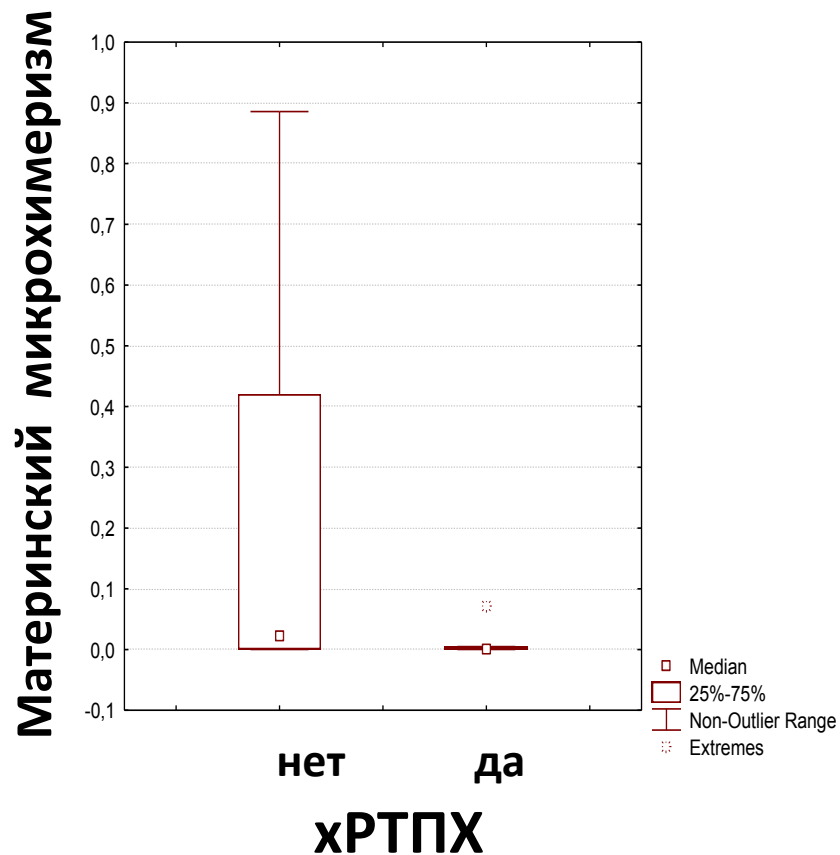
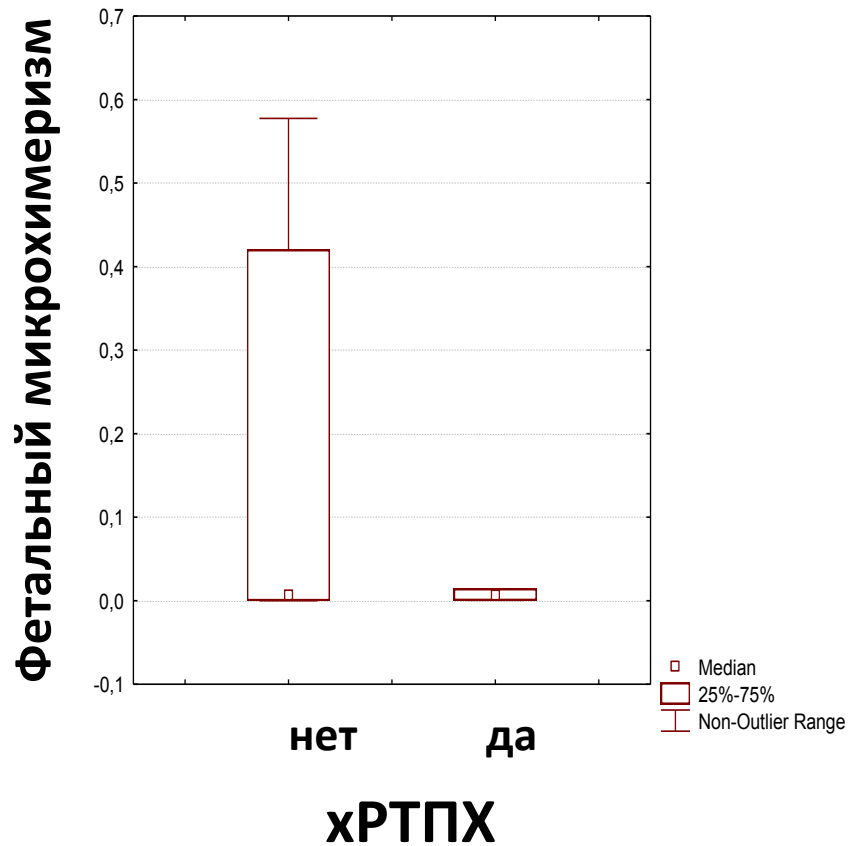
**p=0.014** (Mann-Whitney U Test)

# Влияние уровня материнского микрохимеризма на вероятность развития ОРТПХ



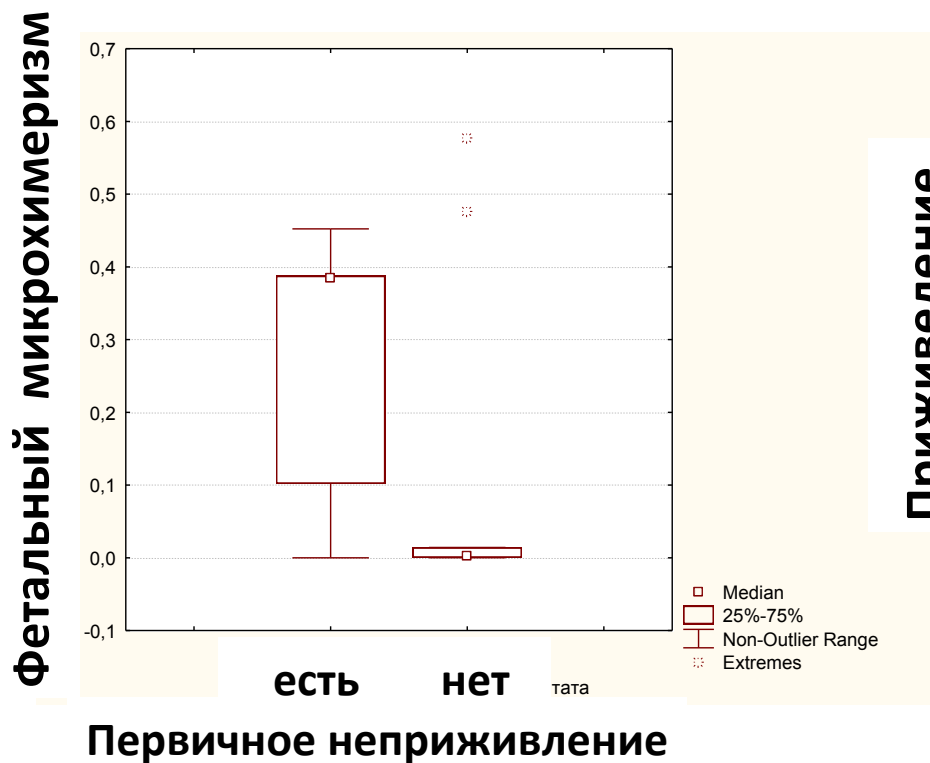
$p=0.86$  (Mann-Whitney U Test)

# Влияние уровня микрохимеризма на вероятность развития хРТПХ

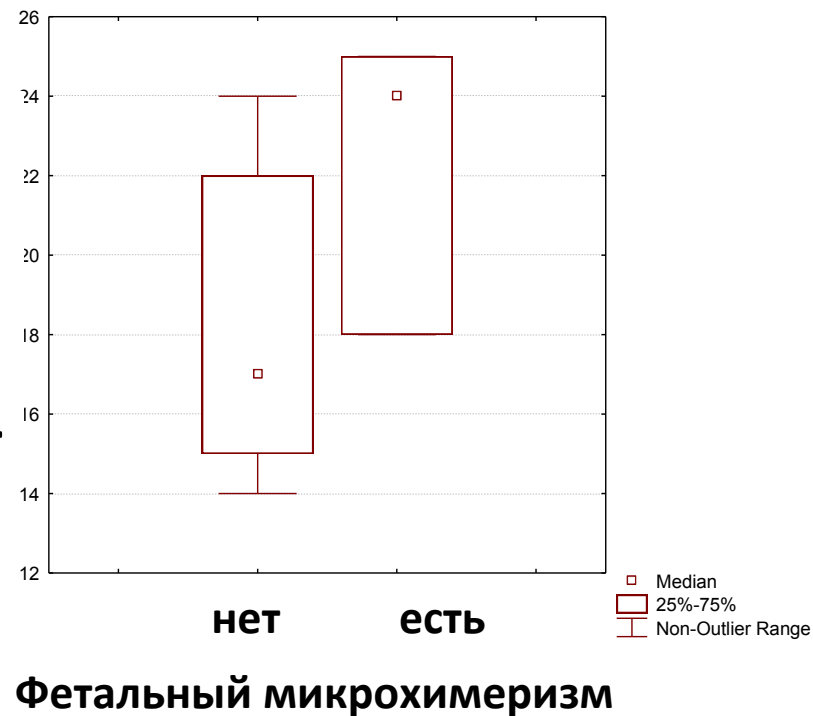


$p > 0.5$  (Mann-Whitney U Test)

# Влияние уровня фетального микрохимеризма на вероятность неприживления трансплантата



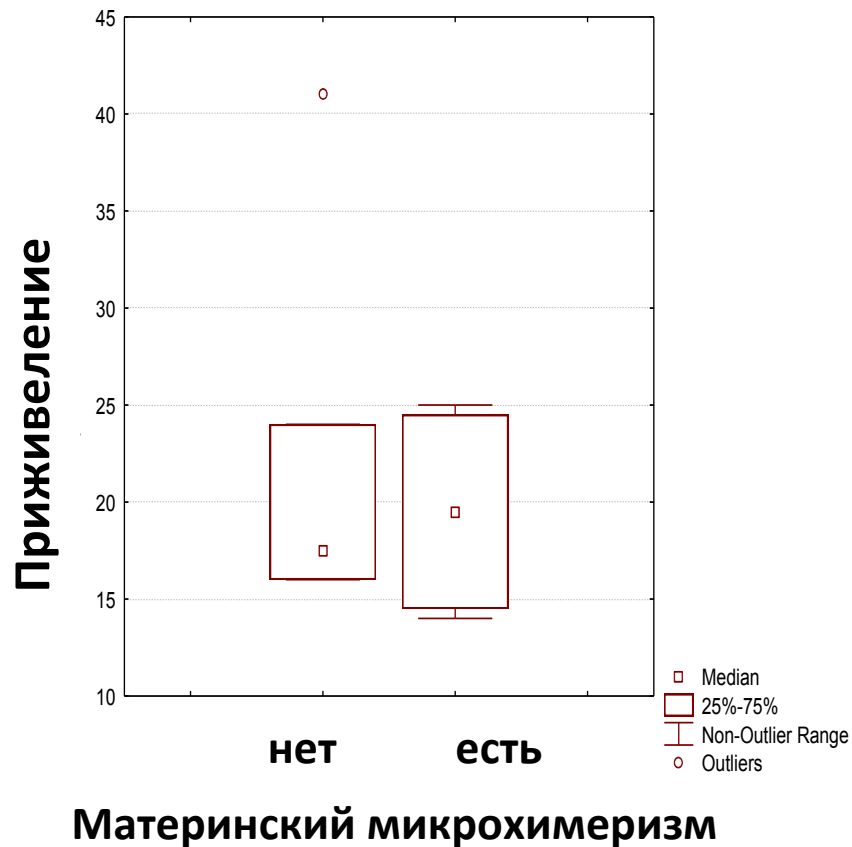
Приживление



$p=0.33$

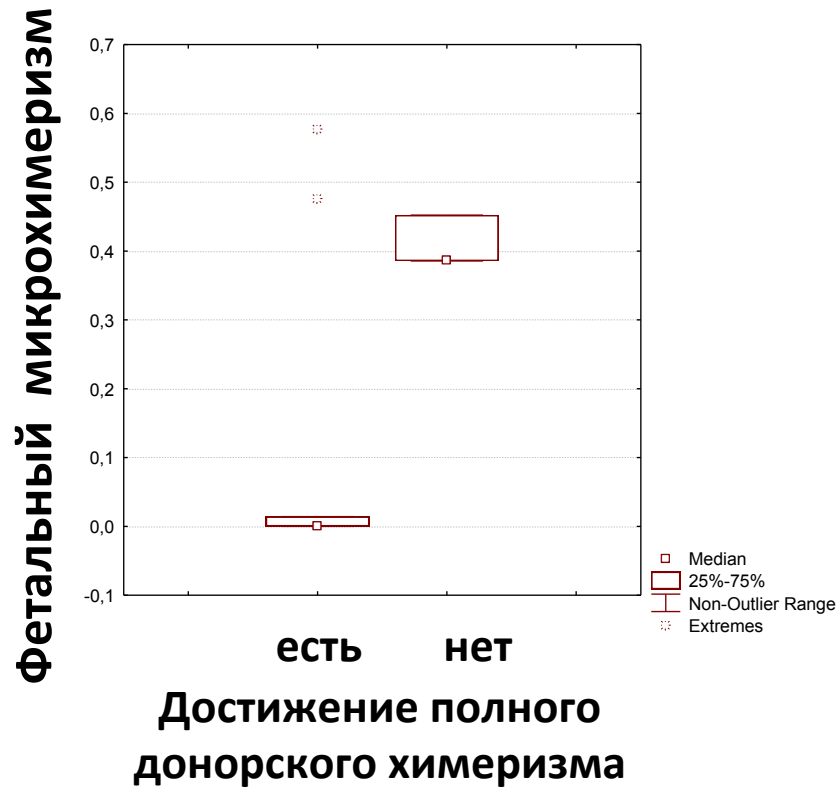
$p=0.12$  (Mann-Whitney U Test)

# Влияние уровня материнского микрохимеризма на кинетику приживления трансплантата



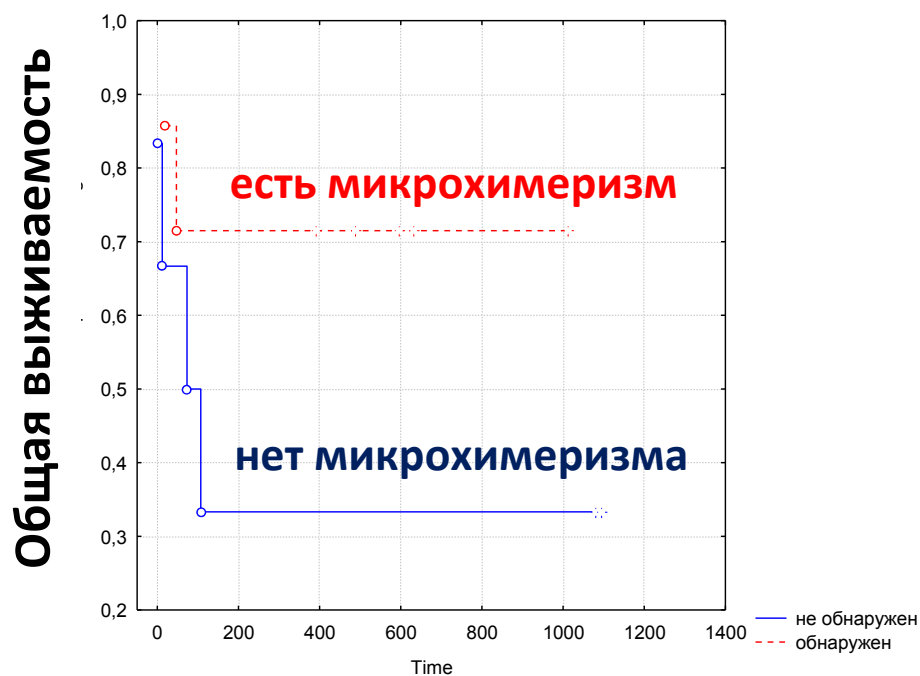
$p > 0.5$  (Mann-Whitney U Test)

# Влияние фетального микрохимеризма на достижение полного донорского химеризма



**p=0.12** (Mann-Whitney U Test)

# Влияние выявления фетального микрохимеризма на общую выживаемость после гапло-ТГСК



$p=0.14$

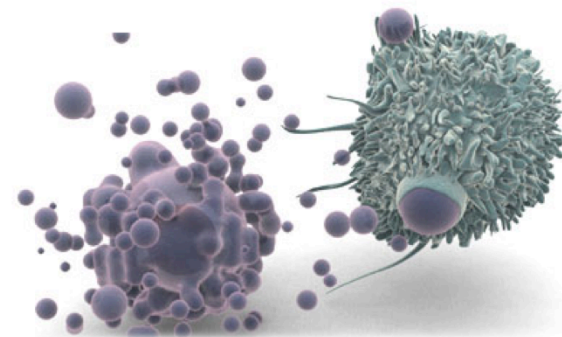
## Выводы:

- ✓ Имеются достоверные различия в уровне фетального микрохимеризма в зависимости от времени после родов.
- ✓ У пациентов с выявленным фетальным микрохимеризмом отмечается меньшая частота развития оРТПХ.
- ✓ Тяжесть оРТПХ находится в обратной корреляционной зависимости от уровня фетального микрохимеризма.
- ✓ Влияния материнского микрохимеризма на развитие и степень оРТПХ выявлено не было.
- ✓ Влияния микрохимеризма на развитие и степень хрРТПХ выявлено не было.
- ✓ При фетальном микрохимеризме имеется тенденция к снижению приживления трансплантата и к уменьшению достижения полного донорского химеризма.
- ✓ Возможна роль фетального микрохимеризма в улучшении ОВ у пациентов после гапло-ТГСК.



## Дальнейшее исследование:

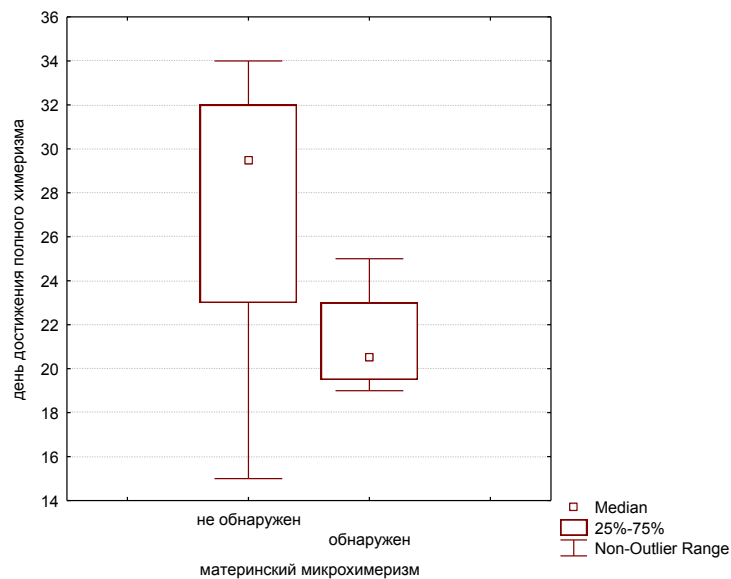
- Исследование микрохимеризма в различных популяциях иммунокомпетентных клеток





**Спасибо за внимание!**

# Влияние материнского микрохимеризма на достижение полного донорского химеризма



$p=0.14$  (Mann-Whitney U Test)

# Чувствительность тест-системы

