

Л.В.ТИХОНОВА,
О.Д.МЯДЕЛЕЦ,
О.-Я.Л. БЕКИШ
Витебский
государственный
медицинский университет,
Витебск, Беларусь

УДК: 616.419-089.843-084

ПРИМЕНЕНИЕ ДОЗИРОВАННОЙ ЭЛИМИНАЦИИ Т-ЛИМФОЦИТОВ ИЗ ДОНОРСКОГО ТРАНСПЛАНТАТА И ТАКРОЛИМА ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ ОСТРОЙ РЕАКЦИИ ТРАНСПЛАНТАТ ПРОТИВ ХОЗЯИНА

Предложен способ снижения тяжести острой реакцией трансплантат против хозяина (РТП) при аллотрансплантации костного мозга методом полной деплеции Т-лимфоцитов из донорского трансплантата при помощи комплекса для иммуномагнитной сепарации с последующим дозированным введением Т-лимфоцитов ($1 \times 10^6/\text{кг}$) и регулированием их иммунологической компетентности назначением иммунодепрессанта такролима ($1 \text{ мг}/\text{кг}$ в течение 5 суток после трансплантации). Использование сочетанного метода позволяет предупредить у реципиента развитие острой РТП выше II степени тяжести, сохранив при этом иммунологическую компетентность трансплантата, что подтверждено морфологическими исследованиями. Комбинированное применение трансплантации очищенного от Т-лимфоцитов костного мозга (ТОКМ), дозированного введения лимфоцитов (ДВЛ) и такролима выявило стабильность селезеночного индекса и высокий процент выживаемости, при этом количественный анализ апоптоза гепатоцитов и кератиноцитов показал их достоверно меньшие значения по сравнению с контрольными сериями.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: реакция трансплантат против хозяина, Т-клеточная деплеция, такролим.

APPLICATION OF DOSED T-LYMPHOCYTES DEPLETED DONOR GRAFT AND TACROLIMUS FOR ACUTE GRAFT VERSUS HOST DISEASE PROPHYLAXIS

L.V.TIKHONOVA, O.D. MYADELETS, O.-J.L.BEKISH
Vitebsk, Medical University, Belarus

The way to reduce gravity of acute GVHD is offered at allotransplantation of bone marrow by a method of full (complete) depletion of T-lymphocytes from a donor graft through a complex for immunomagnetic separation with the subsequent dosed introduction of T-lymphocytes ($1 \times 10^6/\text{kg}$) and adjustment of their immunological competence by assignment of an immunodepressant tacrolimus ($1 \text{ mg}/\text{kg}$ within 5 day after a transplantation). Use of a combined method allows to warn at the recipient development acute GVHD above II of a degree of gravity, having kept thus immunological competence of a graft, that is confirmed by morphological researches. The combined application of T cell depletion, dosed introduction of lymphocytes and tacrolimus revealed stability of a splenic index and high percent of a survival rate, thus the quantitative analysis apoptosis of hepatocytes and keratocytes has shown their authentically smaller meanings in comparison with control series.

KEY WORDS: graft versus host disease, T cell depletion, tacrolimus.

Современный этап в развитии трансплантологии гемопоэтической ткани характеризуется большими достижениями, как в области теории, так и клинической практики. Широкое применение трансплантации костного мозга (ТКМ) связано с тем, что костный мозг является главным гемопоэтическим органом, источником стволовых клеток, способных к дифференцировке и пролиферации, что приводит к регенерации гемопоэза. [2, 28]. Спектр заболеваний, при которых может успешно использоваться аллогенная трансплантация костного мозга (АТКМ), постоянно расширяется. АТКМ является методом выбора при лечении более 60 врожденных и приобретенных иммунодефицитных заболеваний, эффективным методом лечения гемобластозов, солидных опухолей, лучевой болезни [4, 8, 24, 28, 29].

Однако АТКМ характеризуется высокой токсичностью и летальностью, обусловленной развитием реакции трансплантат против хозяина (РТПХ). Это осложнение развивается у 40-80% реципиентов, причем у 1/3 из них приводит к летальному исходу [3]. Сегодня доказано, что РТПХ связана с реакцией донорских Т-лимфоцитов на аллоантигены хозяина [1, 15, 25, 26]. Поэтому новые подходы к профилактике РТПХ, особенно ее острой формы, основаны на трансплантации очищенного костного мозга (ТОКМ) от Т-лимфоцитов (очистка КМ моноклональными антителами (МКАТ) к Т-лимфоцитам, конъюгация анти-Т-клеточных МКАТ с иммунотоксинами, иммуноадсорбция, элютриация, Е-розетирование, иммуномагнитная сепарация) [9, 12, 27, 29, 30]. В результате таких приемов отмечалось существенное сокращение случаев РТПХ, но при этом наблюдалось увеличение отторжения трансплантата и возникновение рецидива заболевания [3, 4, 5, 12, 18].

При статистическом анализе довольно четко выявляется обратная зависимость между числом рецидивов и частотой (степенью тяжести) РТПХ: рецидив реже встречается у реципиентов с РТПХ. Такая реакция получила название реакции трансплантат против лейкоза (РТПЛ). Одним из способов решения этой проблемы может стать сохранение небольшого количества Т-клеток в донорском трансплантате [1, 10, 16, 20, 30].

S. Aizawa и T. Sado [7] утверждают, что для развития эффекта РТПЛ требуются Т лимфоциты в

трансплантате, что и CD4, и CD8 клетки вносят свой вклад в развитие этой реакции. Эффекты РТПЛ в HLA-совместимых комбинациях были очевидны только после того, как РТПХ была преднамеренно увеличена преимунизацией донора или добавлением периферических Т клеток в трансплантат [24].

Подобный эффект наблюдали С. Воссассио, R. Belhocine, J.Y. Perrot et al, [10], которые использовали для профилактики РТПХ и индукции РТПЛ положительную селекцию CD34+ клеток с добавлением лимитированного количества CD3+лимфоцитов в дозе 5×10^5 кл/кг. L. Verdonck et al. [30] вводили малые количества Т-лимфоцитов (1×10^5 Т-клеток/кг веса). С. Herrera [14] после Т-клеточной деплеции обогатил очищенный трансплантат 1×10^6 CD8+клеток/кг.

Анализ этих данных позволил предпринять попытки усовершенствовать протокол аллотрансплантации, позволяющий смягчить течение РТПХ и индуцировать эффекты РТПЛ путем комбинированного применения ТОКМ и дозированного введения Т-лимфоцитов (ДВЛ).

В тоже время при дозированном введении Т-лимфоцитов встает проблема: с одной стороны, имеется опасность РТПХ с другой – «минимальной остаточной лейкемии». В связи с этим возник вопрос о необходимости использования иммунодепрессанта, обладающего иммунокорректирующим действием, направленным на подавление функциональной активности введенных клеток. Наш выбор пал на наиболее перспективный иммуносупрессор такролим (К-506). 14-дневный курс такролима в дозе 1,0 мг/кг/день способен полностью изменить клинические и гистологические проявления РТПХ, вызванные HLA-несовместимостью [18, 23]. В некоторых экспериментах, когда терапия такролимом была остановлена, отмечался рецидив РТПХ, однако его можно было предотвратить назначением низкой дозы препарата в 1.0 мг/кг через день [23].

Таким образом, предлагаемый нами протокол профилактики острой РТПХ при АТКМ основан на комплексном применении полной Т-деплеции донорского трансплантата для предупреждения РТПХ, дозированном введении лимфоцитов селезенки, способствующих индукции РТПЛ и эффективному приживлению трансплантата, иммунокомпетенция которого регулируется назначением такролима.

Целью работы явилась оценка эффективности сочетанного применения полной Т-деплеции донорского трансплантата, дозированного введения лимфоцитов селезенки и назначения такролима как способа профилактики острой РТПХ при АТКМ.

Материалы и методы. Экспериментальной моделью, используемой нами для развития острой РТПХ, служила АТКМ на линейных мышах $C_{57}BL/6$ ($H-2^b$), $СВА/н$ ($H-2^k$), $F1(СВА \times C_{57}BL/6)$ $H-2^{k,b}$, отличающихся по $H-2$ локусу гистосовместимости. Общим антигеном всех популяций Т-лимфоцитов мышей является $Thy-1$ антиген, Т-хелперы и Т-супрессоры / киллеры [19, 20, 26], поэтому иммуномагнитную сепарацию мышинного костного мозга проводили с применением полистироловых микросфер, конъюгированных с МКАТ $Thy-1$ (НПЦ «МедБиоСпектр», Москва). Для удаления Т-лимфоцитов из донорского трансплантата применяли вариационный магнитный сепаратор по схеме, описанной ранее [6].

Суспензию донорских клеток исследовали до и после сепарации для оценки чистоты выделения Т-лимфоцитов методом проточной цитофлуориметрии на аппарате «Epics C» («Coultererics», Франция).

Были поставлены следующие серии опытов по АТКМ:

I - гамма облучение (контроль)

II - ТНКМ (трансплантация неочищенного КМ) (контроль);

III - ТОКМ (трансплантация полностью очищенного от Т-лимфоцитов костного мозга) + ДВЛ (дозированное введение лимфоцитов) (контроль);

IV - ТНКМ + такролим (контроль);

V - ТОКМ + ДВЛ + такролим (опыт);

Оптимальное количество лимфоцитов, способных индуцировать развитие острой РТПХ I степени тяжести, равно 10×10^5 /кг веса. Такролим в дозе 1 мг/кг/день назначали в течение 5 суток с первого дня АТКМ. Подготовительный режим реципиентов включал тотальное облучение тела гамма лучами в дозе 10 ГР.

Для объективной оценки тяжести патологических процессов, вызванных острой РТПХ и контроля ее предупреждения, предлагаемыми нами методом, мы использовали обобщающие показатели (селезеночный индекс и выживаемость), морфофункциональные изменения в печени и анализ апоптоза гепатоцитов и кератиноцитов. Селезеночный индекс (СИ) - отношение массы селезенки к

массе данного животного, умноженное на 100. Апоптоз гепатоцитов и кератиноцитов у мышей-реципиентов на 5, 10, 15, 20, 25, 35 и 45 сутки после АТКМ оценивали методом цитоморфометрии [13, 17].

Результаты и обсуждение

Интегрирующим критерием эффективности профилактики острой РТПХ после аллотрансплантации костного мозга является выживаемость реципиентов. Летально облученные мыши жили в течение 15 дней. Все реципиенты, которым трансплантировали неочищенный аллогенный КМ, погибли в течение первых 35 суток. При этом отмечалось две волны летальности: с 5-х по 10-е сутки - 38% и с 25-х по 30-е сутки - 32% по сравнению с периодом наблюдений с 10-х по 25-е сутки (23%). Собственные данные изменений выживаемости согласуются с известными в литературе [11] и характерны для развития острой РТПХ, которая является причиной летальных исходов при ТКМ. Результаты выживаемости реципиентов при комбинированном методе профилактики РТПХ, в сравнении с контрольными сериями представлены на рис. 1. При сопоставлении кривых выживаемости отмечены их статистически достоверные различия ($p < 0,05$): в опытной серии к 45-м суткам количество выживших особей составило 57%; в III серии опытов (ТОКМ+ДВЛ) к 45-м суткам выживаемость реципиентов была 42%, что на 15% ниже по сравнению с опытной серией. В серии с трансплантацией неочищенного КМ и назначением такролима выживаемость к 45-м суткам составила 34%. Таким об-

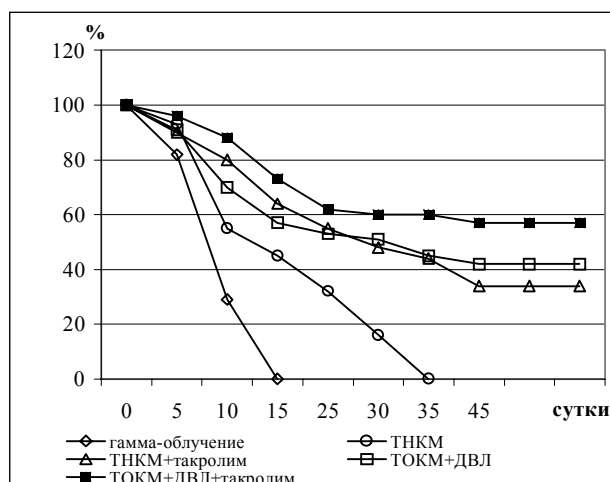


РИС.1 Выживаемость реципиентов при комбинированном методе профилактики РТПХ

разом, результаты профилактики острой РТПХ комбинированным методом оказались лучше результатов контрольных серий.

В норме показатели СИ у интактных животных линии $C_{57}BL/6$ составили $0,6 \pm 0,03$ (рис.2). У животных, которым проводили ТНКМ, наблюдалось достоверное повышение показателей СИ, особенно

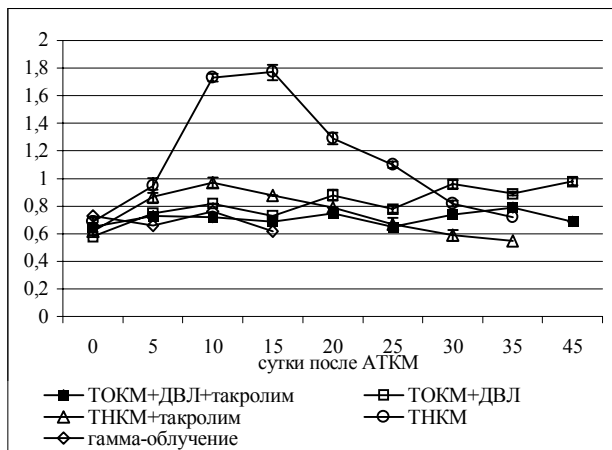


РИС. 2. Уровень СИ при применении комбинированного способа профилактики острой РТПХ.

выраженное на 10-е и 15-е сутки ($1,73 \pm 0,054$; $1,77 \pm 0,03$ соответственно), что значительно превышает показатели опытной группы и характеризует выраженную спленомегалию, свойственную пролиферативной фазе острой РТПХ. В остальных контрольных сериях до 30-х суток изменения СИ были незначительны и недостоверны по отношению к опытной группе, хотя на 30 - 35 сутки в серии TOKM+DVJ они были достоверно выше на 42%, а в серии с ТНКМ+такролим - достоверно ниже (на 21%), чем в опытной серии. Уровень СИ при применении комбинированного способа (опытная группа) профилактики острой РТПХ в течение всего периода наблюдений достоверно не изменялся, его показатели не превышали значений $0,79 \pm 0,017$. Таким образом, сочетанное применение ТОКМ, ДВЛ и такролима, выявило стабильность селезеночного индекса и высокий процент выживаемости в сравнении с контрольными сериями.

После летального воздействия на организм ионизирующей радиации в печени отмечались выраженные морфологические изменения, заключающиеся в развитии венозного полнокровия, которое проявлялось наиболее резко на 5-8-е сутки. Синусоидные капилляры были значительно расширены и переполнены клетками крови. Некоторые клетки,

выстилающие синусоиды, были увеличены в размерах и содержали в цитоплазме мелкую зернистость. Очевидно, эти клетки являются печеночными макрофагами, находящимися в состоянии фагоцитоза. Центральные и собирательные вены также были расширены и полнокровны. В центральных венах отмечалось отслоение эндотелия, формировались микротромбы. В области центральных вен обнаруживались одиночные или в виде небольших очажков гепатоциты в состоянии апоптоза. При этом в ядрах гепатоцитов отмечалась маргинация хроматина, а для цитоплазмы была характерна повышенная оксифилия. Через 10 суток очаги апоптоза появлялись на некотором удалении от центральных отделов долики. Это приводило к формированию мозаичной картины органа. В центральных, собирательных венах и сосудах триад наблюдалась десквамация эндотелия, и формировались микротромбы. В последующем, к 13-м суткам после облучения, описанные патоморфологические признаки еще больше усугублялись. В данной серии наиболее выраженные значения апоптоза гепатоцитов отмечались на 5-е сутки и составляли $29,1 \pm 1,4\%$ в последующем на 10-е и 15-е сутки изменения были не достоверны ($27,9 \pm 1,40\%$ и $27,2 \pm 1,36\%$ соответственно) (рис.3). Уровень апоптоза кератиноцитов в этой группе животных был в пределах $8,7 \pm 0,4$ - $8,9 \pm 0,4\%$ (рис.4).

В настоящем эксперименте трансплантация необработанного костного мозга приводила к развитию у животных острой РТПХ, степень проявления которой прямо пропорционально зависела от времени наблюдения. I-II степень тяжести острой

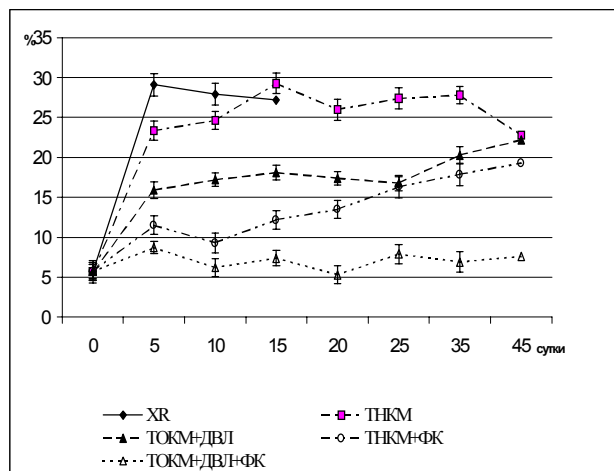


РИС. 3. Динамика уровня апоптоза гепатоцитов при комбинированном способе профилактики острой РТПХ после АТКМ

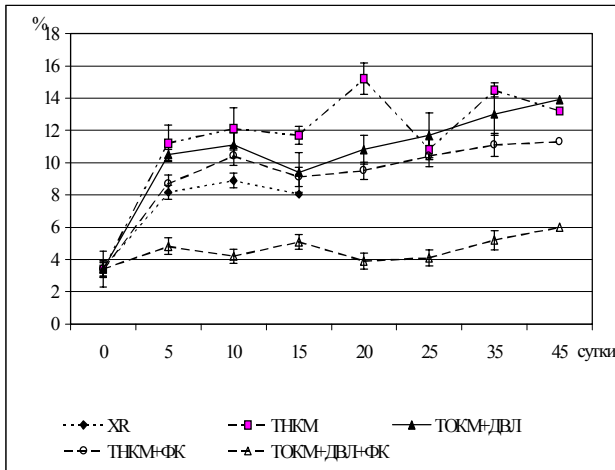


РИС. 4. Динамика уровня апоптоза кератиноцитов при комбинированном способе профилактики острой РТПХ после АТКМ.

РТПХ наблюдались на 10-15-е сутки, а максимальная III-IV степень ее проявления - соответственно на 25-35-е сутки после АТКМ. Через 8 суток после трансплантации костного мозга в печени появлялись небольшие лимфоидные инфильтраты, причем в области триад они были более выраженными и встречались несколько чаще (рис.5а). Патологические изменения со стороны гепатоцитов в этот срок отсутствовали. Через 15 суток после АТКМ размеры лимфоидных инфильтратов в паренхиме органа возрастали с одновременным увеличением их количества (рис.5б). Появлялись микроучастки с апоптозными гепатоцитами. Обнаруживалась десквамация эпителия междольковых желчных протоков с дегенерацией отдельных эпителиоцитов. Встречались явления десквамации эндотелия в центральных венах и междольковых сосудах. Такие гистологические проявления характерны для I – II степени острой РТПХ. Через 25 суток после АТКМ появлялись дистрофически-некротические изменения паренхимы, которые были более выражены в центральных отделах долек и распространялись на зоны в области триад. Большая часть гепатоцитов находилась в состоянии дегенерации и гибели. Отмечалась массивная десквамация эпителия желчных протоков. Нарастали сосудистые расстройства с десквамацией эндотелия кровеносных сосудов и застойными явлениями в органе. Эти изменения соответствуют III степени РТПХ. На 35-е сутки после пересадки костного мозга дистрофически-некротические изменения нарастали при том же, что и в предыдущем сроке, уровне инфильтрации орга-

на мононуклеарными клетками (рис.5в). В органе обнаруживались поля сплошной или почти сплошной гибели паренхимы. Размеры таких полей варьировали, но были достаточно велики и часто захватывали почти всю дольку (IV степень острой РТПХ). Динамика изменений уровня апоптоза гепатоцитов в этой группе характеризовалась достоверным повышением на 15-е сутки после трансплантации (до $29,3 \pm 1,13\%$), на 25 – 35-е сутки он незначительно снижался и находился в пределах $27,4 \pm 1,33\%$ - $27,8 \pm 1,35\%$ (см. рис.3). Динамика уровня апоптоза клеток эпидермиса у реципиентов была схожей с изменениями апоптоза гепатоцитов при АТКМ (см. рис.4). Достоверное повышение апоптозных кератиноцитов наблюдалось на 20-е сутки ($15,2 \pm 0,6\%$) и снижение их количества на 25-е сутки ($10,8 \pm 0,97\%$).

В серии, где проводили полную деплецию донорского костного мозга от Т-лимфоцитов с последующим их дозированным введением при АТКМ (ТОКМ+ДВЛ), отмечали снижение степени тяжести острой РТПХ, однако это не предупреждало развития выраженных гистологических изменений в печени. На 45-е сутки наблюдения патоморфологические изменения в печени были максимальными. Они характеризовались, прежде всего, выраженностью деструктивных процессов в паренхиме. В некоторых зонах печени отмечались очаги микронекрозов, причем такие зоны были окружены мало измененными гепатоцитами (рис.6а). Эти изменения характерны для III степени острой РТПХ. Количество гепатоцитов (см. рис.3), вступивших на путь апоптоза, в серии значительно выросло на 5-10-е сутки до $15,9 \pm 1,1$ - $17,2 \pm 1,16\%$ ($p < 0,05$), на 15-е – 25-м сутки их уровень не изменялся, а на 35 – 45-е сутки отмечалось статистически достоверное ($p < 0,05$) увеличение количества подвергшихся апоптозу гепатоцитов соответственно до $20,3 \pm 1,32\%$ - $22,2 \pm 1,41\%$, при этом они диссеминировали в пределах дольки. Уровень апоптоза кератиноцитов в этой серии был наиболее выражен к 35-45-м суткам ($13,0 \pm 0,65\%$, $13,9 \pm 0,7\%$) и достоверно превышал таковой у животных IV и V серий (см. рис.4).

В серии (ТНKM+такролим) в печени отмечались венозное полнокровие с выраженным расширением синусоидных капилляров и мононуклеарная инфильтрация. Количество подвергшихся апоптозу гепатоцитов с 5 по 20 сутки наблюдений увеличилось незначительно, и было достаточно меньше,

чем в предыдущей серии. К 45-м суткам апоптотическая гибель гепатоцитов увеличивалась, при этом сохранялись лимфоидная инфильтрация в паренхиме печени и выраженное венозное полнокровие, начинали преобладать деструктивные явления (рис.6б) [II-III степень острой РТПХ]. Динамика апоптоза гепатоцитов в группе характеризовалась достоверным увеличением показателей на 15 – 45-е сутки соответственно ($12,2 \pm 1,09\%$, $13,5 \pm 0,98\%$, $16,3 \pm 1,12\%$ и $17,9 \pm 1,22\%$, $19,3 \pm 1,27\%$, $p < 0,05$). В тоже время, в эпидермисе уровень апоптоза кератиноцитов нарастал от $8,67 \pm 0,52\%$ на 5-е сутки до $11,3 \pm 0,6\%$ на 45-е сутки.

В опытной серии (ТОКМ+ДВЛ+такролим) наблюдались незначительные морфофункциональные изменения в печени, которые выражались в незначительной инфильтрации паренхимы лимфоидными элементами с умеренным венозным полнокровием, расширением синусоидных капилляров (рис.6в) и соответствовали I степени острой РТПХ. Апоптотические измененные гепатоциты наблюдались редко как в начальные сроки после ТКМ, так и на 45-е сутки исследования. Как видно на рис.3, в опытной серии количество подвергшихся апоптозу гепатоцитов достоверно возросло на 5-е сутки и составля-

ло - $8,7 \pm 1,12\%$, далее показатели незначительно варьировали, составляя на 10-е сутки $6,21 \pm 1,21\%$, на 15-е сутки - $7,4 \pm 1,50\%$, на 20-е - $5,3 \pm 1,24\%$, на 25-е, 35-е и 45-е сутки его динамика не изменялась. Эпидермис кожи уха был практически не изменен, встречались лишь единичные апоптотически измененные кератиноциты во все сроки наблюдений. Динамика уровня апоптоза клеток кожи у мышей-реципиентов опытной группы характеризовалась недостоверными изменениями значений в пределах с $4,82 \pm 0,61\%$ на 5-е сутки, $4,2 \pm 0,56\%$ – 10-е сутки, $5,1 \pm 0,82\%$ - 15-е сутки, до $6,0 \pm 0,71\%$ на 45-е сутки (см. рис.4).

При сопоставлении результатов количественной оценки апоптоза клеток печени и кожи в сравниваемых группах отмечается, что достоверно низкие их показатели регистрировались при комбинированном способе профилактики острой РТПХ. Наблюдалось незначительное повышение показателей на 35-45-е сутки, что свидетельствует о проявлениях острой РТПХ 0-1 степеней тяжести и подтверждается морфологически. В контрольных сериях уровень апоптотической гибели гепатоцитов и кератиноцитов был не только статистически достоверно выше, но и имел тенденцию к повышению с течением

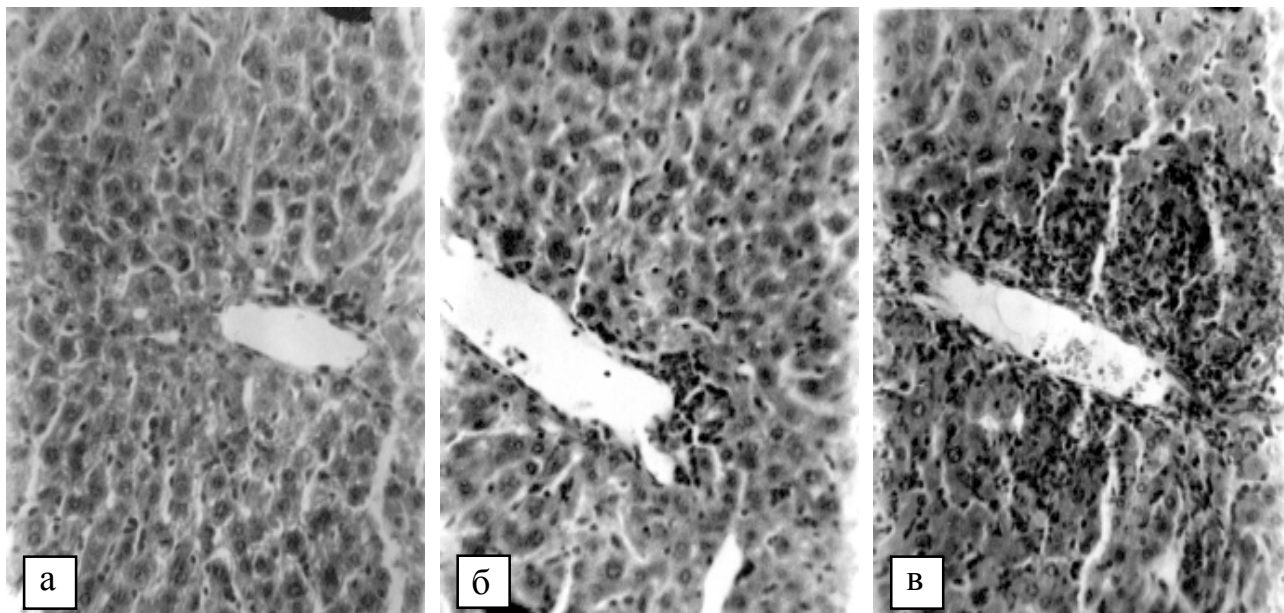


РИС 5. Гистологические изменения в печени в динамике развития острой РТПХ

- а** - небольшие лимфоидные инфильтраты в области центральных вен;
 - б** – увеличение размеров и количества лимфоидных инфильтратов в паренхиме органа, десквамация эндотелия в центральных венах;
 - в** – дистрофически-некротические изменения паренхимы в центральных отделах долек.
- Окраска гематоксилин-эозином. а, б, в - x100.

нием времени. Так на 35-45-е сутки после трансплантации наблюдались гистологические изменения, характерные для острой РТПХ II – III степени тяжести. Апоптозные клетки обнаруживались во всех биоптатах независимо от степени РТПХ, их количество повышалось перед заметной инфильтрацией органов Т-клетками. Эта закономерность подтверждается другими учеными, которые наблюдали увеличение апоптоза гепатоцитов и кератиноцитов вследствие повышенной реактивности трансплантируемых лимфоцитов при развитии острой РТПХ еще в ранний период после АТКМ [13, 22]. T.Kita ima et al. [21] показали, что активированные антигеном Т-клетки стимулируют сигнал к апоптозу, особенно сенсibilизированных клеток. P.D. Jolly et al. считают, что апоптоз могут инициировать как лимфоциты, так и цитокины, выделяемые активными лимфоцитами в различный период после АТКМ [17]. Назначение такролима приводило к снижению уровня апоптоза кератиноцитов и гепатоцитов в контрольной серии (ТНКМ+такролим) в ранние сроки наблюдений с 5-х по 20-е сутки в

сравнении с серией ТОКМ+ДВЛ, где не применяли иммуносупрессор. Очевидно, данный эффект связан с инактивацией реактивности лимфоцитов препаратом. К 25-м суткам и в последующем эти различия между сериями стали значительно меньше, что связано с отменой препарата. При комбинированном методе профилактики острой РТПХ достоверно меньший уровень апоптоза позволяет судить об умеренной выраженности реактивности лимфоцитов, трансплантируемых дозированно и вызывающих развитие острой РТПХ I степени тяжести как эффект РТПЛ.

Приведенные выше данные свидетельствуют о положительном эффекте разработанного сочетанного метода профилактики острой РТПХ при АТКМ, позволяющем предупредить у реципиента развитие острой РТПХ выше I степени тяжести, сохранив при этом иммунологическую компетентность трансплантата. Морфологические исследования подтвердили наличие морфофункциональных изменений в органах и тканях, соответствующих картине острой РТПХ I степени тяжести. Количественный анализ

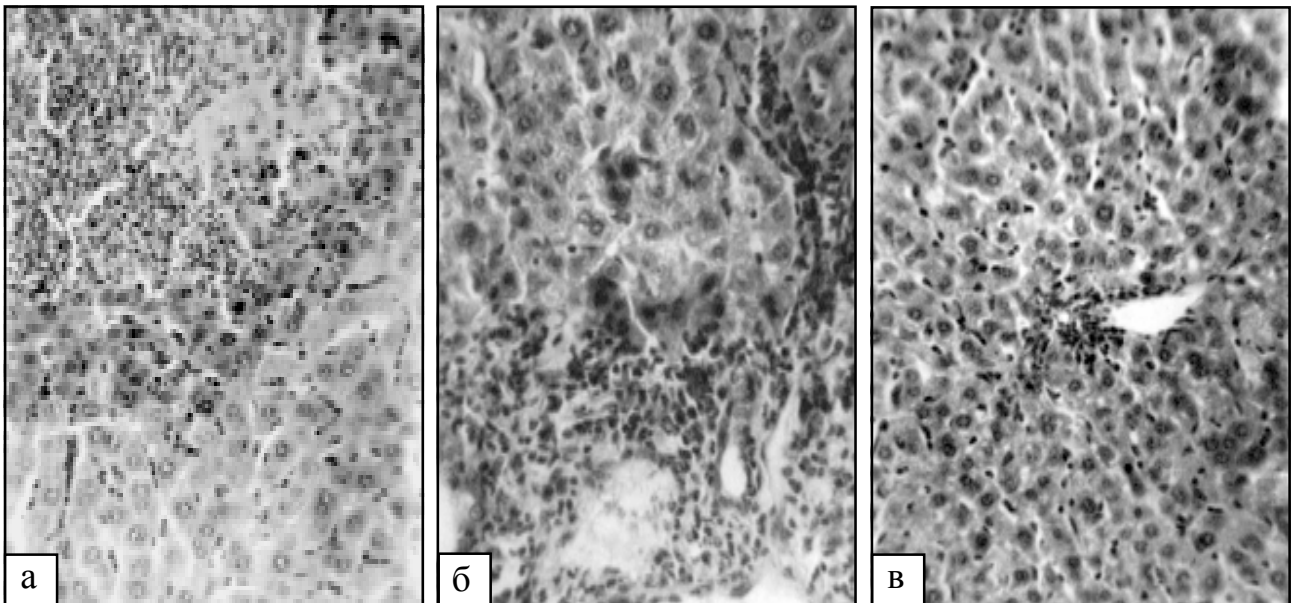


РИС. 6. Степень выраженности деструктивных изменений в печени через 45 суток после АТКМ при использовании различных способов профилактики острой РТПХ

а – при ТОКМ+ДВЛ: выраженная лимфоидная инфильтрация паренхимы, увеличение содержания апоптозных гепатоцитов, наличие очагов некроза;

б – при ТНКМ+такролим: сохранение венозного полнокровия, лимфоидной инфильтрации, увеличение количества апоптозных клеток, наличие очагов некроза;

в – при ТОКМ+ДВЛ+такролим: сохранение незначительных явлений венозного полнокровия и лимфоидной инфильтрации.

Окраска гематоксилин-эозином. а, б, в - x100.

апоптоза гепатоцитов и кератиноцитов показал их достоверно меньшие значения по сравнению с контрольными сериями, при этом комбинированное применение ТОКМ, ДВЛ и такролима выявило стабильность селезеночного индекса и высокий процент выживаемости.

Выводы.

1. На модели развития острой РТПХ, индуцированной у мышей линии СВА показано, что при

АТКМ важная роль в минимальном присутствии острой РТПХ принадлежит наличию в трансплантате дозированного количества Т-лимфоцитов донора.

2. Использование сочетания полной деплеции Т-лимфоцитов костного мозга, последующего их дозированного введения и иммуносупрессивной терапии такролимом в посттрансплантационный период позволяет предупредить у реципиента развитие острой РТПХ выше I степени тяжести, сохранив при этом иммунологическую компетентность трансплантата.

Литература

1. Бекиш О. Л., Хулуп Г. ., Генералов И.И., Виленский Г.М. Современные тенденции профилактики реакции «трансплантат против хозяина» // Медицинские новости. - 1996. - № 6. - с. 14-18.
2. Комаровская М.Е., Карканица Л.В., Дрык С.И., Миланович Н.Ф., Мицкевич П.Б., Усс А.Л. Клиническая значимость показателей качественного и количественного анализа трансплантата костного мозга.// Гематология и трансфузиология. - 1997. - Т. 42, № 2. - с. 7-10.
3. Окулов В.Б., Афанасьев Б.В. Иммунологические спектры трансплантаии костного мозга // Вопр. онкологии. - 1992. - Т.38, № 4. - с.387-396.
4. Томас Е.Д. Трансплантация костного мозга при опухолевых заболеваниях системы крови // Тер. арх. - 1988. - Т. LX, № 5. - с. 12-23.
5. Усс А.Л., Миланович Н.Ф., Скрыгин А.Е. и др. Токсические осложнения высокодозной полихимиотерапии при трансплантации костного мозга и стволовых клеток периферической крови // Тер. арх. - 1997. - Т.69, № 2. - с. 46-50.
6. Хулуп Г. ., Бекиш О. Л., Виленский Г.М., и др. Выделение субпопуляций лимфоцитов из крови и костного мозга с помощью иммуномагнитной сепарации для лабораторных исследований клинической и научно-исследовательской практике // Методические рекомендации. Витебск. - 1995. - 17с.
7. Aizawa S. и Sado T. Graft-versus-leukemia effect in MNC-compatible and -incompatible allogeneic bone marrow transplantation of radiation-induced, leukemia-bearing mice.// Transplantation. -1991.- 52.- p.885-889.
8. Apperley J. ., Hermans J., van Biezen A., Gratwohl A. Risk assessment for allogeneic transplantation in chronic myeloid leukaemia // Bone Marrow Transplant. - 1997. - Vol. 19, Suppl. 1 - p. 145.
9. Blazar B.R., Sharpe A.N., et al. Infusion of anti B-7.1 (CD80) and anti-B7.2 (CD86) monoclonal antibodies inhibits murine graft-versus-host-disease lethality in part via direct effects on CD4+ and CD8+ T cells // J. Immunol. - 1996, Oct 15. - № 157, Suppl. 8. - p. 3250-3259.
10. Boccaccio C., Belhocine R., Perrot J.Y. et al. Positive selection of bone marrow CD34+ cells with addition of a limited number of lymphocytes as prophylaxis of graft-versus-host-disease (GVHD) // Bone Marrow Transplantation. - 1997. - Vol. 19. № 1. - p. 188.
11. Bohmig G.A., Kovarik J., Holter W. et al. Specific down-regulation of proliferative T cell alloresponsiveness by interference with CD2/L A-3 and L A-1/ICAM-1 in vitro // J. Immunol. - 1994. - Vol. 152, № 8. - p. 3720-3728.
12. Cullis J.O., Szydlo R.M., Cross N.C. et al. Matched unrelated donor bone marrow transplantation for chronic myeloid leukaemia in chronic phase: comparison of ex vivo and in vivo T-cell depletion // Bone Marrow Transplantation. - 1993. - №11, Suppl.1. - p. 107-111.
13. Gilliam A.C., Whitaker-Menezes D., Korngold R., Murphy G. . Apoptosis is the predominant form of epithelial target cell in ury in acute experimental graft-versus-host disease // J. Invest. Dermatol. - 1996, Sep. - Vol. 3, № 107. - p. 377-383.
14. Herrera C., Torres A., Martin C. . et al. Selective CD4+ T-cell depletion plus controlled low number of CD8+ lymphocytes in the marrow graft for prophylaxis of GVHD // Bone Marrow Transplant. - 1997. - Vol. 19, Suppl. 1. - p. 183.
15. Imamura M., Miyazaki T., Kasai M. Acute GVHD: pathogenesis, symptomatology, stage/severity, and treatment // Nippon. Rinsho. - 1990. - Vol. 48, № 9. - p. 2055-2060.

16. Jansen J., Hanks S., Akard L. et al. Selective T cell depletion with CD8-conjugated magnetic beads in the prevention of graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation // *Bone Marrow Transplantation*. - 1995. - Vol. 15, № 2. - p. 271-278.
17. Jolly P.D., Smith P.R., Heath D.A. et al. Morphological evidence of apoptosis and the prevalence of apoptotic versus mitotic cells in the membrana granulosa of ovarian follicles during spontaneous and induced atresia in ewes // *Biol. Reprod.* - 1997, Apr. - Vol. 4, № 56. - p. 837-846.
18. Kanamaru A., Takemoto Y., Kakishita E. et al. K506 treatment of graft-versus-host disease developing or exacerbating during prophylaxis and therapy with cyclosporin and/or other immunosuppressants. Japanese K506 BMT Study Group // *Bone Marrow Transplant.* - 1995. - Vol. 15, № 6. - p. 885-889.
19. Kenneth W. Culver, Wayne L. Smith, Morton J. Cowan. Allogeneic bone marrow transplantation in newborn mice treated pre- and post-natally with anti-Thy 1,2 monoclonal antibody // *Transplantation Proceedings*. - 1989. - Vol. 21, № 1. - p. 2939.
20. Kihara T., Morita H., Kitano Y. Studies on transient graft-versus-host disease in BALB/c nude mice induced with allogeneic C₅₇BL/6 splenocytes // *Dermatol. Sci.* - 1996, Jan. - № 11. Suppl. 1. - p. 76-83.
21. Kita ima T., Ariizumi K., Bergstresser P.R., Takashima A. Ultraviolet B radiation sensitizes a murine epidermal dendritic cell line (XS52) to undergo apoptosis upon antigen presentation to T cells // *J. Immunol.* - 1996, Oct 15. - Vol. 8, № 157. - p. 3312-3316.
22. Klimczak A., Karabon L., Bogunia-Kubik K., Lange A. Assessment of apoptotic cells in skin biopsies of acute graft versus host disease patients // *Bone Marrow Transplantation*. - 1997. - Vol. 19, Suppl. 1 - p. 189.
23. Koehler M.T., Howrie D., Mirro J. et al. K506 (tacrolimus) in the treatment of steroid-resistant acute graft-versus-host disease in children undergoing bone marrow transplantation // *Bone Marrow Transplant.* - 1995. - Vol. 15, № 6. - p. 895-899.
24. Kouides-PA; Bennett-JM. Advances in the therapy of the myelodysplastic syndromes. // *Cancer-Treat-Res.* -1999.- p. 335-362.
25. Kook H., Goldman S., Padley D., Giller R., et al. Reconstruction of the immune system after unrelated or partially matched T-cell-depleted bone marrow transplantation in children: immunophenotypic analysis and factors affecting the speed of recovery // *Blood.* - 1996, Aug 1. - № 88, Suppl. 3. - p. 1089-1097.
26. Levy R.B., Cottrell A.H., Jones M., Malek T.R. Graft-versus-host reaction-induced immune modulation. I. Donor-recipient genetic disparity and the differential expression of L_{yt}2, L3T4, and Ly-6 during acute reactions in the host thymus // *J. Immunol.* - 1988. - №140. - p. 1717-1725.
27. Leyhausen G., Winoto-Morbach S., Blank M., Muller-Ruchholtz W. MHC fully allogeneic bone marrow transplantation after physical T-cell depletion with magnetic microspheres (MAMIS) // *Transpl. Proc.* - 1989. - Vol. 21, №1. - p. 2943 - 2946.
28. Runde V.; Beelen W.; Schaefer U.W. Twenty years of bone marrow transplantation in Essen - 1995 update // *Clin. Transpl.* - 1995. - p. 311-314.
29. Sullivan K.M. Congress review: progress and prospects in bone marrow transplantation // *Transplantation Proceedings*. - 1989. - Vol. 21, № 1. - p. 2919-2922.
30. Verdonck L. S., Dekker A.W., de Gast G.C. et al. Allogeneic bone marrow transplantation with a fixed low number of T cells in the marrow graft // *Blood.* - 1994. - Vol. 83, № 10. - p. 3090-3096.