

Значение лабораторной информационной системы в контроле процессинга гаплоидентичной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток с деплецией TCR $\alpha\beta$ /CD19

М.С.Фадеева, Е.В.Боякова, Ю.В.Старичкова, Д.Е.Першин,
К.А.Воронин, В.А.Зубаченко, М.А.Масчан, А.Г.Румянцев

Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева Минздрава России, Москва, Российская Федерация

В материале представлены исторические аспекты разработки и оптимизации гаплоидентичной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток, а также ее преимущества на современном этапе при проведении аллогенной трансплантации. Рассмотрена технология проведения лабораторного анализа методом проточной цитометрии деплеции TCR $\alpha\beta$ -клеток и CD19, включая описание методики до и после иммуномагнитного разделения на аппарате CliniMACSPlusSystem. Приведена методология применения протокола процессов сбора и анализа данных деплеции TCR $\alpha\beta$ /CD19 цитометрического исследования и его интеграции и организации с лабораторной информационной системой в лаборатории трансплантационной иммунологии и иммунотерапии гемобластозов ФГБУ «ФНКЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России. Показаны результаты анализа лабораторно-диагностических данных, включая оценку качества деплеции TCR $\alpha\beta$ /CD19.

Ключевые слова: гаплоидентичная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток, деплеции TCR $\alpha\beta$ /CD19, проточная цитометрия, научно-клинические исследования, лабораторная информационная система биологии трансплантации гемопоэтических стволовых клеток.

Для цитирования: Фадеева М.С., Боякова Е.В., Старичкова Ю.В., Першин Д.Е., Воронин К.А., Зубаченко В.А., Масчан М.А., Румянцев А.Г. Значение лабораторной информационной системы в контроле гаплоидентичной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток с деплецией TCR $\alpha\beta$ /CD19. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. 2016; 15(4): 89–96. DOI: 10.20953/1726-1708-2016-4-89-96

The value of the laboratory information system in the control of the haploidentical haematopoietic stem cells transplantation using TCR $\alpha\beta$ /CD19 depletion

M.S.Fadeeva, E.V.Boyakova, Yu.V.Starichkova, D.E.Pershin,
K.A.Voronin, V.A.Zubachenko, M.A.Maschan, A.G.Rumyantsev

Dmitry Rogachev Federal Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Moscow, Russian Federation

Historical aspects of the development and optimization of the haploidentical hematopoietic stem cells transplantation and its advantages in the modern era are presented in the article. The TCR $\alpha\beta$ /CD19 depletion laboratory analysis technology using flow cytometry including a discription of the method before and after immuno-magnetic separation on the unit CliniMACSPlusSystem is shown. Methodology of application of the flow cytometric data collection and analysis protocol of the TCR $\alpha\beta$ /CD19 depletion and its integration with the laboratory information system in Laboratory of the Transplant Immunology and Immunotherapy of Hemoblastosis, Federal Scientific Clinical Centre of Pediatric Hematology Oncology Immunology named after Dmitry Rogachev Ministry of Health of the Russian Federation are presented. The results of laboratory data analysis including TCR $\alpha\beta$ /CD19 depletion quality assessment are also shown.

Key words: haploidentical haematopoietic stem cells transplantation, TCR $\alpha\beta$ /CD19 depletion, flow cytometry, scientific clinical studies, laboratory information system biology of haematopoietic stem cells transplantation

For citation: Fadeeva M.S., Boyakova E.V., Starichkova Yu.V., Pershin D.E., Voronin K.A., Zubachenko V.A., Maschan M.A., Rumyantsev A.G. The value of the laboratory information system in the control of the haploidentical haematopoietic stem cells transplantation using TCR $\alpha\beta$ /CD19 depletion. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. 2016; 15(4): 89–96. DOI: 10.20953/1726-1708-2016-4-89-96

Для корреспонденции:

Фадеева Мария Сергеевна, врач клинической лабораторной диагностики лаборатории трансплантационной иммунологии и иммунотерапии гемобластозов Федерального научно-клинического центра детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева Минздрава России

Адрес: 117997, ГСП-7, Москва, ул. Саморы Машела, 1
Телефон: (495) 287-6570, доб. 5305
E-mail: Mariya.Fadeeva@fnkc.ru

Статья поступила 11.05.2016 г., принята к печати 22.12.2016 г.

For correspondence:

Maria S. Fadeeva, MD, clinical laboratory diagnosis specialist at the laboratory of transplantation immunology and immunotherapy of haemoblastoses, Dmitry Rogachev Federal Research Centre of Paediatric Haematology, Oncology and Immunology, Ministry of Health of the Russian Federation

Address: 1, ul. Samory Mashela, Moscow, GSP-7, 117997, Russian Federation
Phone: (495) 287-6570, доб. 5305
E-mail: Mariya.Fadeeva@fnkc.ru

The article was received 11.05.2016, accepted for publication 22.12.2016

Аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) является потенциально радикальным методом терапии широкого спектра злокачественных и незлокачественных нарушений гемопоэза [1, 3, 16]. Исторически наиболее благоприятный исход лечения наблюдался в случае использования в качестве источника гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) HLA-совместимого родственного донора, однако если учесть, что лишь 25% сиблингов являются HLA-совместимыми, а также традиционно небольшой состав семьи в целом ряде этнических групп применение аллогенной родственной ТГСК от полностью совместимого донора возможно лишь для 30% пациентов [1, 2, 4, 14]. Использование в качестве источника ГСК стволовых клеток периферической крови гаплоидентичного родственного донора значительно расширяет доступность трансплантации как стандарта лечения [1, 2, 11–14, 16]. Такой донор может быть подобран практически для каждого нуждающегося в пересадке ГСК пациента в максимально короткий срок, что немаловажно для больных с тяжелыми формами гемобластоза и высокой вероятностью прогрессии основного заболевания [1, 4, 13, 16]. Однако исторически применение гаплоидентичной ТГСК ассоциировано с высокой смертностью и низким уровнем общей и бессобытийной выживаемости, т.к. при использовании данного метода наблюдалось развитие наиболее тяжелых посттрансплантационных осложнений, таких как реакция трансплантат против хозяина (РТПХ), непрививление, отторжение трансплантата и инфекционные осложнения [1, 2, 5–8, 16], определяемые взаимодействием Т-лимфоцитов донора и реципиента посредством формирования воспалительного каскада в результате межклеточного взаимодействия, с активацией антигенпрезентирующих клеток, активацией донорских Т-лимфоцитов, пролиферацией, дифференцировкой и миграцией с последующей альтерацией ткани [2, 3, 8]. Поэтому развитие и усовершенствование методов исключения Т-лимфоцитов являются одной из ключевых стратегий в сфере применения трансплантаций от HLA-несовместимых доноров. R.Handgretinger et al. разработали технологию деплеции TCR $\alpha\beta$ -клеток и CD19. Удаление TCR $\alpha\beta$ -клеток имеет ряд преимуществ по сравнению с деплецией всех CD3-позитивных лимфоцитов [10]. К тому же методика элиминации TCR $\alpha\beta$ -лимфоцитов из трансплантата позволяет увеличить эффективность редукции Т-клеток с показателя 4,5 log до 5 log, что сопоставимо с результатами позитивной CD34-селекции [3, 4]. Такой подход позволяет сохранить в трансплантате, помимо стволовых клеток, NK-клетки, моноциты, дендритные клетки, TCR $\gamma\delta$ -клетки, что способствует быстрому приживлению, формированию противовирусного и противоопухолевого иммунитета, снизить риск развития РТПХ и значительно улучшает исход терапии [4, 9–12, 15]. Согласно исследованию L.S.Lamb et al. TCR $\gamma\delta$ -клетки обладают цитолитической активностью в отношении некоторых опухолевых линий, а увеличение их процентного содержания в трансплантате снижает риск возникновения рецидива [8]. Клинические исследования F.Locatelli et al. подтверждают эффективность элиминации TCR $\alpha\beta$ -лимфоцитов и В-лимфоцитов до 4,1 log и 3,1 log соответственно, в то же время данные M.Schumm et al. демонстрируют эффективность редукции TCR $\alpha\beta$ -лимфоцитов и В-лимфоцитов

4,7 (3,8-5,5) log и 4,1 (3,0-4,8) log соответственно [9, 10]. Также рядом авторов отмечается ускоренное восстановление иммунной системы после проведения иммуномагнитной негативной деплеции TCR $\alpha\beta$ /CD19 [10–13]. Существенным преимуществом использования гаплоидентичной ТГСК, помимо основной пересадки, как основной терапевтической платформы, является возможность осуществить множество лечебных процедур, связанных с повторным забором клеток донора: посттрансплантационная клеточная терапия по предотвращению отторжения трансплантата, клеточная терапия вирусных осложнений и контроля рецидивов [1, 4].

Материалы и методы

Проведение деплеции TCR $\alpha\beta$ /CD19 предполагает серию последовательных манипуляций с продуктом афереза периферических ГСК, в результате которых происходит элиминация из трансплантата TCR $\alpha\beta$ -лимфоцитов и В-лимфоцитов. В процессе иммуномагнитного разделения в лаборатории проводится контроль содержания WBC, CD34+клеток, CD3, TCR $\alpha\beta$ ⁺, CD20⁺, CD56⁺-клеток с последующей оценкой качественного и количественного состава трансплантата. За основу методики пробоподготовки и анализа принят протокол компании MiltenyiBiotec Special protocol CliniMACS, предложенный для оценки содержания TCR $\alpha\beta$ ⁺ и CD19⁺-клеток методом проточной цитометрии до и после процесса магнитной сепарации на аппарате CliniMACS Plus System.

Исследование проводилось двухплатформенным методом на автоматическом лазерном гематологическом анализаторе Sysmex XS 800i и проточном цитометре BDFACS Canto II (4-2-2). Настройка проточного цитометра производилась с использованием калибровочной системы Comp Beads (BD). Мониторинг стабильности работы прибора осуществлялся при помощи калибровочных систем Cytometer Setup and Tracking (CST). Использовались MkAT, меченные флюоресцеинизотиоцианатом (FITC), R-фикоэритрином (PE), аллофикоцианином (APC), перидининхлорофилл-протеином (PerCP), красителем VioBlue. Для иммунофенотипирования применялись следующие моноклональные антитела: CD3, CD20, CD34, CD45, CD56, TCR $\alpha\beta$, TCR $\gamma\delta$, 7-AAD.

Оценивался материал, получаемый в результате афереза ГСК донора и не подвергшийся никаким манипуляциям, условно называемый STARTING. После инкубации с магнитными антителами оценивалась фракция, содержащая клетки, меченные магнитными антителами, но не прошедшие разделение на магнитных колонках – ORIGINAL. После проведения деплеции производилась оценка качества проведенной сепарации и клеточный состав продукта, предназначенного для трансплантации, – фракция TARGET, а также материал с редуцированными в процессе сепарации TCR $\alpha\beta$ и В-лимфоцитами – NON-TARGET. Для более точного гейтирования использовалась фракция, условно названная SPIKE, – 10:1 трансплантат с материалом, содержащим деплетированные клетки.

Сбор и анализ материала производился с помощью программного обеспечения BD FACS Diva Software v6.1.3. Оценка количества CD34⁺ производилась двухплатформенным методом согласно ISHAGE протоколу (International Society for Hematotherapy and Graft Engineering) [17, 18].

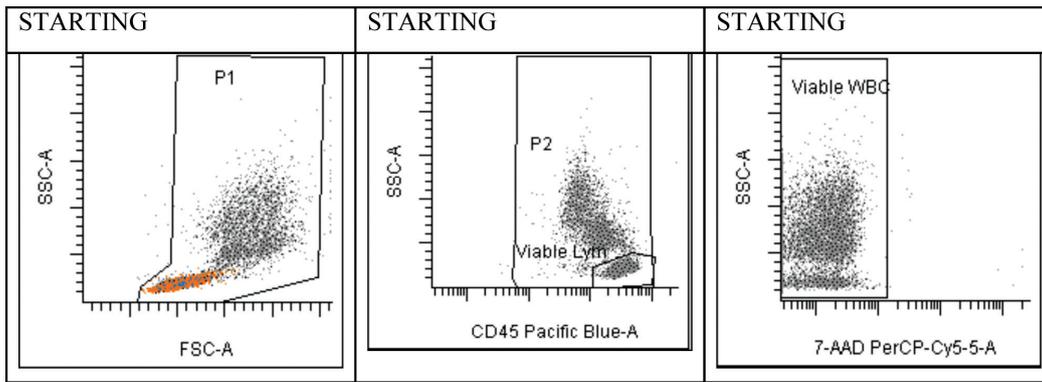


Рис. 1.

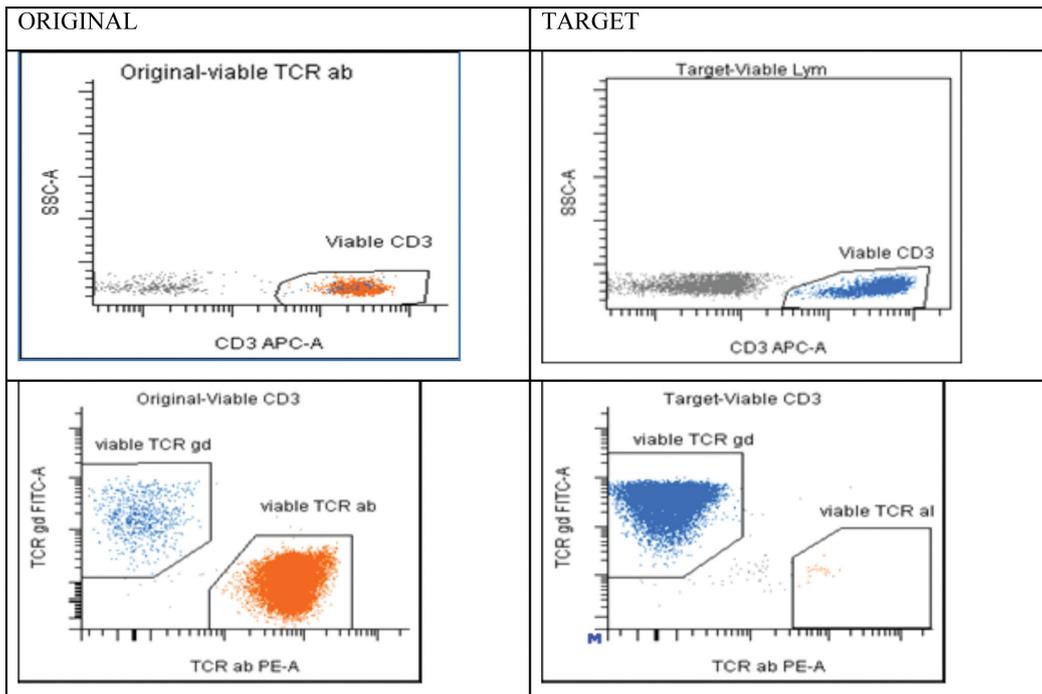


Рис. 2.

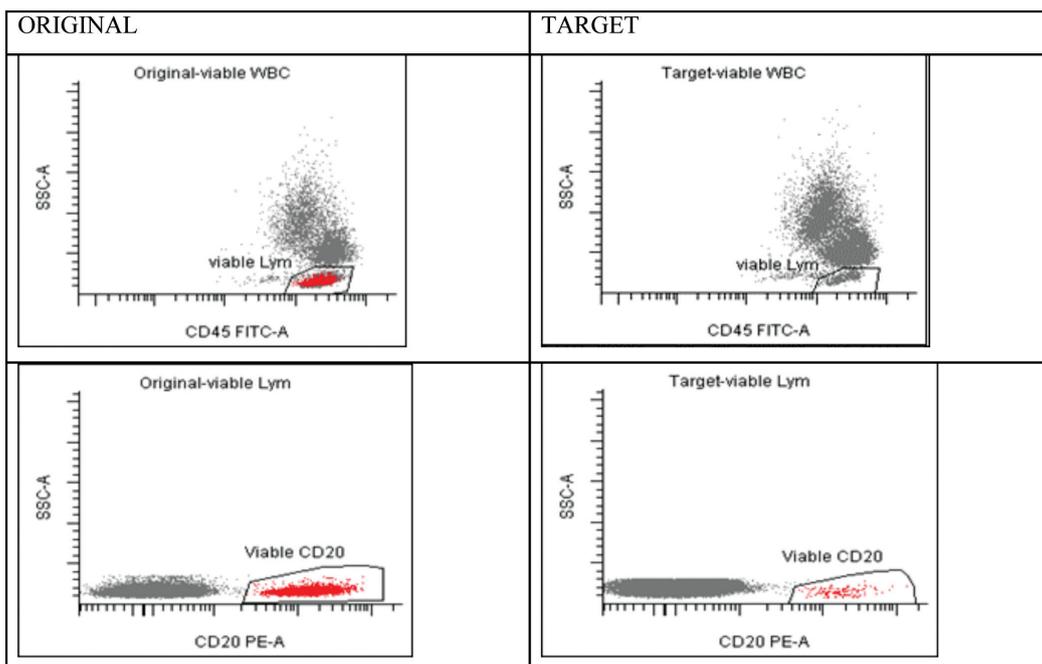


Рис. 3.

Данные пациента		Данные донора	
Пациент Фамилия: <input type="text"/> Имя: Андрей Отчество: Михайлович Дата рождения: 10.07.2015 Пол: Мужской Масса тела: <input type="text"/> ID МИС: 31662 ID CDM HSCT: 57d4293c7270644fa0010000	Данные пациента до ТГСК Диагноз 1: Незлокачественные > Иммунодефицит > > Other well defined PIDs > > Wiskott-Aldrich syndrome (WAS) Дата постановки: 10.07.2015 Трансплантация Дата ТГСК: 29.06.2016 Дней с момента трансплантации: 73 Номер ТГСК для пациента: 1 Причина повторной ТГСК: <input type="text"/> CMV-статус реципиента: Негативный	Донор Фамилия: <input type="text"/> Имя: <input type="text"/> Отчество: <input type="text"/> Дата рождения: 20.05.1964 Пол: Мужской ID донора в банке доноров: DE-DKM-4033603 ID донора в МИС: <input type="text"/> CMV-статус: Позитивный Тип донора: Неродственный	Биологический материал Биологический материал: <input type="checkbox"/> Костный мозг (BM) <input checked="" type="checkbox"/> Периферические ГСК (PBSC) <input type="checkbox"/> Неродственная пуповинная кровь (UCB) <input type="checkbox"/> Родственная пуповинная кровь (RCB) <input type="checkbox"/> Мезенхимальные стволовые клетки (MSC) <input type="checkbox"/> Другое Дата донации (дата сбора): ДД.ММ.ГГГГ Дата CliniMACS: ДД.ММ.ГГГГ Дата Flow cytometry: ДД.ММ.ГГГГ Тип процессинга: <input type="checkbox"/> Не проводился <input type="checkbox"/> CD3/19-деплегция <input checked="" type="checkbox"/> TcRa/b/19-деплегция <input type="checkbox"/> CD34-селекция <input type="checkbox"/> CD45RA-деплегция <input type="checkbox"/> Другое Группа крови донора: A (II) Группа крови реципиента: B (III) Групповая совместимость: ABO-major и ABO-minor

Рис. 4. Структура данных пациента и донора.

TCRa/b																																																																																																																																	
Дата исследования: 29.06.2016	Масса тела: <input type="text"/>																																																																																																																																
<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>aferez</th> <th>original</th> <th>target</th> <th>non-target</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>sample volume</td> <td>115 мл</td> <td>100 мл</td> <td>274 мл</td> <td>161 мл</td> </tr> <tr> <td>WBC count (Sysmex)</td> <td>194.71 $10^9/\mu\text{L}$</td> <td>191.79 $10^9/\mu\text{L}$</td> <td>46 $10^9/\mu\text{L}$</td> <td>36.82 $10^9/\mu\text{L}$</td> </tr> </tbody> </table>		aferez	original	target	non-target	sample volume	115 мл	100 мл	274 мл	161 мл	WBC count (Sysmex)	194.71 $10^9/\mu\text{L}$	191.79 $10^9/\mu\text{L}$	46 $10^9/\mu\text{L}$	36.82 $10^9/\mu\text{L}$	<table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="4">CD34 (1)</th> </tr> <tr> <th></th> <th>aferez</th> <th>original</th> <th>target</th> <th>non-target</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>No. of events</td> <td>100292</td> <td>100335</td> <td>100438</td> <td>97114</td> </tr> <tr> <td>WBC</td> <td>100000</td> <td>100000</td> <td>100096</td> <td>96723</td> </tr> <tr> <td>viable WBCs</td> <td>765</td> <td>851</td> <td>1457</td> <td>99</td> </tr> <tr> <td>viable CD34+</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Calculated values</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>viability of WBC</td> <td>0.997</td> <td>0.997</td> <td>0.997</td> <td>0.996</td> </tr> <tr> <td>WBC count (Sysmex) corrected</td> <td>194.14 $10^9/\mu\text{L}$</td> <td>191.15 $10^9/\mu\text{L}$</td> <td>45.84 $10^9/\mu\text{L}$</td> <td>36.67 $10^9/\mu\text{L}$</td> </tr> <tr> <td>Total viable WBC count (1)</td> <td>22.33 10^8</td> <td>19.11 10^8</td> <td>12.56 10^8</td> <td>5.9 10^8</td> </tr> <tr> <td>viable CD34+ (1)</td> <td>0.77 %</td> <td>0.85 %</td> <td>1.46 %</td> <td>0.1 %</td> </tr> </tbody> </table>	CD34 (1)					aferez	original	target	non-target	No. of events	100292	100335	100438	97114	WBC	100000	100000	100096	96723	viable WBCs	765	851	1457	99	viable CD34+					Calculated values					viability of WBC	0.997	0.997	0.997	0.996	WBC count (Sysmex) corrected	194.14 $10^9/\mu\text{L}$	191.15 $10^9/\mu\text{L}$	45.84 $10^9/\mu\text{L}$	36.67 $10^9/\mu\text{L}$	Total viable WBC count (1)	22.33 10^8	19.11 10^8	12.56 10^8	5.9 10^8	viable CD34+ (1)	0.77 %	0.85 %	1.46 %	0.1 %																																																											
	aferez	original	target	non-target																																																																																																																													
sample volume	115 мл	100 мл	274 мл	161 мл																																																																																																																													
WBC count (Sysmex)	194.71 $10^9/\mu\text{L}$	191.79 $10^9/\mu\text{L}$	46 $10^9/\mu\text{L}$	36.82 $10^9/\mu\text{L}$																																																																																																																													
CD34 (1)																																																																																																																																	
	aferez	original	target	non-target																																																																																																																													
No. of events	100292	100335	100438	97114																																																																																																																													
WBC	100000	100000	100096	96723																																																																																																																													
viable WBCs	765	851	1457	99																																																																																																																													
viable CD34+																																																																																																																																	
Calculated values																																																																																																																																	
viability of WBC	0.997	0.997	0.997	0.996																																																																																																																													
WBC count (Sysmex) corrected	194.14 $10^9/\mu\text{L}$	191.15 $10^9/\mu\text{L}$	45.84 $10^9/\mu\text{L}$	36.67 $10^9/\mu\text{L}$																																																																																																																													
Total viable WBC count (1)	22.33 10^8	19.11 10^8	12.56 10^8	5.9 10^8																																																																																																																													
viable CD34+ (1)	0.77 %	0.85 %	1.46 %	0.1 %																																																																																																																													
<table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="4">CD34 (2)</th> </tr> <tr> <th></th> <th>aferez</th> <th>original</th> <th>target</th> <th>non-target</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>No. of events</td> <td>100272</td> <td>98993</td> <td>100322</td> <td></td> </tr> <tr> <td>WBC</td> <td>100000</td> <td>98563</td> <td>100000</td> <td></td> </tr> <tr> <td>viable WBCs</td> <td>735</td> <td>773</td> <td>1448</td> <td></td> </tr> <tr> <td>viable CD34+</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Calculated values</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>viability of WBC</td> <td>0.997</td> <td>0.997</td> <td>0.997</td> <td></td> </tr> <tr> <td>WBC count (Sysmex) corrected</td> <td>194.18 $10^9/\mu\text{L}$</td> <td>191.15 $10^9/\mu\text{L}$</td> <td>45.85 $10^9/\mu\text{L}$</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total viable WBC count (2)</td> <td>22.33 10^8</td> <td>19.12 10^8</td> <td>12.56 10^8</td> <td></td> </tr> <tr> <td>viable CD34+ (2)</td> <td>0.74 %</td> <td>0.78 %</td> <td>1.45 %</td> <td></td> </tr> </tbody> </table>	CD34 (2)					aferez	original	target	non-target	No. of events	100272	98993	100322		WBC	100000	98563	100000		viable WBCs	735	773	1448		viable CD34+					Calculated values					viability of WBC	0.997	0.997	0.997		WBC count (Sysmex) corrected	194.18 $10^9/\mu\text{L}$	191.15 $10^9/\mu\text{L}$	45.85 $10^9/\mu\text{L}$		Total viable WBC count (2)	22.33 10^8	19.12 10^8	12.56 10^8		viable CD34+ (2)	0.74 %	0.78 %	1.45 %		<table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="4">TCRa/b+ and TCRg/d+</th> </tr> <tr> <th></th> <th>aferez</th> <th>original</th> <th>target</th> <th>non-target</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>No. of events</td> <td>50027</td> <td>49303</td> <td>99798</td> <td>50075</td> </tr> <tr> <td>CD45+ WBC</td> <td>49891</td> <td>48192</td> <td>995073</td> <td>49760</td> </tr> <tr> <td>viable CD45+ WBC</td> <td>12415</td> <td>13390</td> <td>1835</td> <td>40281</td> </tr> <tr> <td>CD3+ cells</td> <td>12350</td> <td>13317</td> <td>34</td> <td>40235</td> </tr> <tr> <td>TCRa/b+ cells</td> <td>63</td> <td>60</td> <td>1799</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>TCRg/d+ cells</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Calculated values</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>viability of WBC</td> <td>0.997</td> <td>0.998</td> <td>0.997</td> <td>0.994</td> </tr> <tr> <td>WBC count (Sysmex) corrected</td> <td>194.18 $10^9/\mu\text{L}$</td> <td>191.36 $10^9/\mu\text{L}$</td> <td>45.87 $10^9/\mu\text{L}$</td> <td>36.59 $10^9/\mu\text{L}$</td> </tr> <tr> <td>Total viable CD45+ WBC count</td> <td>22.33 10^8</td> <td>19.14 10^8</td> <td>12.57 10^8</td> <td>5.89 10^8</td> </tr> <tr> <td>% of viable WBC: CD3+ cells</td> <td>24.88 %</td> <td>27.22 %</td> <td>0.18 %</td> <td>80.95 %</td> </tr> <tr> <td>% of viable WBC: TCRa/b+ cells</td> <td>24.75 %</td> <td>27.07 %</td> <td>0.00342 %</td> <td>80.86 %</td> </tr> <tr> <td>% of viable WBC: TCRg/d+ cells</td> <td>0.13 %</td> <td>0.12 %</td> <td>0.18 %</td> <td>0 %</td> </tr> </tbody> </table>	TCRa/b+ and TCRg/d+					aferez	original	target	non-target	No. of events	50027	49303	99798	50075	CD45+ WBC	49891	48192	995073	49760	viable CD45+ WBC	12415	13390	1835	40281	CD3+ cells	12350	13317	34	40235	TCRa/b+ cells	63	60	1799	2	TCRg/d+ cells					Calculated values					viability of WBC	0.997	0.998	0.997	0.994	WBC count (Sysmex) corrected	194.18 $10^9/\mu\text{L}$	191.36 $10^9/\mu\text{L}$	45.87 $10^9/\mu\text{L}$	36.59 $10^9/\mu\text{L}$	Total viable CD45+ WBC count	22.33 10^8	19.14 10^8	12.57 10^8	5.89 10^8	% of viable WBC: CD3+ cells	24.88 %	27.22 %	0.18 %	80.95 %	% of viable WBC: TCRa/b+ cells	24.75 %	27.07 %	0.00342 %	80.86 %	% of viable WBC: TCRg/d+ cells	0.13 %	0.12 %	0.18 %	0 %
CD34 (2)																																																																																																																																	
	aferez	original	target	non-target																																																																																																																													
No. of events	100272	98993	100322																																																																																																																														
WBC	100000	98563	100000																																																																																																																														
viable WBCs	735	773	1448																																																																																																																														
viable CD34+																																																																																																																																	
Calculated values																																																																																																																																	
viability of WBC	0.997	0.997	0.997																																																																																																																														
WBC count (Sysmex) corrected	194.18 $10^9/\mu\text{L}$	191.15 $10^9/\mu\text{L}$	45.85 $10^9/\mu\text{L}$																																																																																																																														
Total viable WBC count (2)	22.33 10^8	19.12 10^8	12.56 10^8																																																																																																																														
viable CD34+ (2)	0.74 %	0.78 %	1.45 %																																																																																																																														
TCRa/b+ and TCRg/d+																																																																																																																																	
	aferez	original	target	non-target																																																																																																																													
No. of events	50027	49303	99798	50075																																																																																																																													
CD45+ WBC	49891	48192	995073	49760																																																																																																																													
viable CD45+ WBC	12415	13390	1835	40281																																																																																																																													
CD3+ cells	12350	13317	34	40235																																																																																																																													
TCRa/b+ cells	63	60	1799	2																																																																																																																													
TCRg/d+ cells																																																																																																																																	
Calculated values																																																																																																																																	
viability of WBC	0.997	0.998	0.997	0.994																																																																																																																													
WBC count (Sysmex) corrected	194.18 $10^9/\mu\text{L}$	191.36 $10^9/\mu\text{L}$	45.87 $10^9/\mu\text{L}$	36.59 $10^9/\mu\text{L}$																																																																																																																													
Total viable CD45+ WBC count	22.33 10^8	19.14 10^8	12.57 10^8	5.89 10^8																																																																																																																													
% of viable WBC: CD3+ cells	24.88 %	27.22 %	0.18 %	80.95 %																																																																																																																													
% of viable WBC: TCRa/b+ cells	24.75 %	27.07 %	0.00342 %	80.86 %																																																																																																																													
% of viable WBC: TCRg/d+ cells	0.13 %	0.12 %	0.18 %	0 %																																																																																																																													
<table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="4">CD20</th> </tr> <tr> <th></th> <th>aferez</th> <th>original</th> <th>target</th> <th>non-target</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>No. of events</td> <td>49920</td> <td>50348</td> <td>100626</td> <td>49795</td> </tr> <tr> <td>CD45+ WBC</td> <td>49768</td> <td>50208</td> <td>1003804</td> <td>49598</td> </tr> <tr> <td>viable CD45+ WBC</td> <td>3816</td> <td>1876</td> <td>223</td> <td>7317</td> </tr> <tr> <td>CD20+ cells</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Calculated values</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>viability of WBC</td> <td>0.997</td> <td>0.997</td> <td>0.997</td> <td>0.996</td> </tr> <tr> <td>WBC count (Sysmex) corrected</td> <td>194.12 $10^9/\mu\text{L}$</td> <td>191.26 $10^9/\mu\text{L}$</td> <td>45.87 $10^9/\mu\text{L}$</td> <td>36.67 $10^9/\mu\text{L}$</td> </tr> <tr> <td>Total viable CD45+ WBC count</td> <td>22.32 10^8</td> <td>19.13 10^8</td> <td>12.57 10^8</td> <td>5.9 10^8</td> </tr> <tr> <td>% of viable WBC: CD20+ cells</td> <td>7.67 %</td> <td>3.74 %</td> <td>0.0222 %</td> <td>14.75 %</td> </tr> </tbody> </table>	CD20					aferez	original	target	non-target	No. of events	49920	50348	100626	49795	CD45+ WBC	49768	50208	1003804	49598	viable CD45+ WBC	3816	1876	223	7317	CD20+ cells					Calculated values					viability of WBC	0.997	0.997	0.997	0.996	WBC count (Sysmex) corrected	194.12 $10^9/\mu\text{L}$	191.26 $10^9/\mu\text{L}$	45.87 $10^9/\mu\text{L}$	36.67 $10^9/\mu\text{L}$	Total viable CD45+ WBC count	22.32 10^8	19.13 10^8	12.57 10^8	5.9 10^8	% of viable WBC: CD20+ cells	7.67 %	3.74 %	0.0222 %	14.75 %	<table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="2">Immunophenotype</th> </tr> <tr> <th></th> <th>target</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>No. of events</td> <td>500281</td> </tr> <tr> <td>CD45+ WBC</td> <td>499491</td> </tr> <tr> <td>viable CD45+ WBC</td> <td>564</td> </tr> <tr> <td>CD3+ cells</td> <td>19392</td> </tr> <tr> <td>CD56+CD3+ cells</td> <td>339</td> </tr> <tr> <td>CD56+ cells</td> <td>19731</td> </tr> <tr> <td>Calculated values</td> <td></td> </tr> <tr> <td>viability of WBC</td> <td>0.998</td> </tr> <tr> <td>WBC count (Sysmex) corrected</td> <td>45.93 $10^9/\mu\text{L}$</td> </tr> <tr> <td>Total viable CD45+ WBC count</td> <td>12.58 10^8</td> </tr> <tr> <td>% of viable WBC: CD3+ cells</td> <td>0.11 %</td> </tr> <tr> <td>% of viable WBC: CD56+CD3+ cells</td> <td>3.88 %</td> </tr> <tr> <td>% of viable WBC: CD56+ cells</td> <td>0.07 %</td> </tr> <tr> <td>Total viable CD3+ cells</td> <td>142.09 10^8</td> </tr> <tr> <td>Total viable CD56+CD3+ cells</td> <td>488.56 10^8</td> </tr> <tr> <td>Total viable CD56+ cells</td> <td>497.1 10^8</td> </tr> </tbody> </table>	Immunophenotype			target	No. of events	500281	CD45+ WBC	499491	viable CD45+ WBC	564	CD3+ cells	19392	CD56+CD3+ cells	339	CD56+ cells	19731	Calculated values		viability of WBC	0.998	WBC count (Sysmex) corrected	45.93 $10^9/\mu\text{L}$	Total viable CD45+ WBC count	12.58 10^8	% of viable WBC: CD3+ cells	0.11 %	% of viable WBC: CD56+CD3+ cells	3.88 %	% of viable WBC: CD56+ cells	0.07 %	Total viable CD3+ cells	142.09 10^8	Total viable CD56+CD3+ cells	488.56 10^8	Total viable CD56+ cells	497.1 10^8																																						
CD20																																																																																																																																	
	aferez	original	target	non-target																																																																																																																													
No. of events	49920	50348	100626	49795																																																																																																																													
CD45+ WBC	49768	50208	1003804	49598																																																																																																																													
viable CD45+ WBC	3816	1876	223	7317																																																																																																																													
CD20+ cells																																																																																																																																	
Calculated values																																																																																																																																	
viability of WBC	0.997	0.997	0.997	0.996																																																																																																																													
WBC count (Sysmex) corrected	194.12 $10^9/\mu\text{L}$	191.26 $10^9/\mu\text{L}$	45.87 $10^9/\mu\text{L}$	36.67 $10^9/\mu\text{L}$																																																																																																																													
Total viable CD45+ WBC count	22.32 10^8	19.13 10^8	12.57 10^8	5.9 10^8																																																																																																																													
% of viable WBC: CD20+ cells	7.67 %	3.74 %	0.0222 %	14.75 %																																																																																																																													
Immunophenotype																																																																																																																																	
	target																																																																																																																																
No. of events	500281																																																																																																																																
CD45+ WBC	499491																																																																																																																																
viable CD45+ WBC	564																																																																																																																																
CD3+ cells	19392																																																																																																																																
CD56+CD3+ cells	339																																																																																																																																
CD56+ cells	19731																																																																																																																																
Calculated values																																																																																																																																	
viability of WBC	0.998																																																																																																																																
WBC count (Sysmex) corrected	45.93 $10^9/\mu\text{L}$																																																																																																																																
Total viable CD45+ WBC count	12.58 10^8																																																																																																																																
% of viable WBC: CD3+ cells	0.11 %																																																																																																																																
% of viable WBC: CD56+CD3+ cells	3.88 %																																																																																																																																
% of viable WBC: CD56+ cells	0.07 %																																																																																																																																
Total viable CD3+ cells	142.09 10^8																																																																																																																																
Total viable CD56+CD3+ cells	488.56 10^8																																																																																																																																
Total viable CD56+ cells	497.1 10^8																																																																																																																																
<p>[1] Total viable CD34+ cells $[10^8] = \frac{\text{viable CD34, [\%]} \times \text{Total WBC count, [10}^9 \times 1000}{100\%}$</p> <p>[2] Total viable CD3+ cells, $[10^8] = \frac{\% \text{ of viable WBC: CD3+ cells, [\%]} \times \text{Total viable CD45+ WBC count, [10}^8 \times 10000}{100\%}$</p> <p>[3] Total viable TCRa/b+ cells, $[10^8] = \frac{\% \text{ of viable WBC: TCRa/b+ cells, [\%]} \times \text{Total viable CD45+ WBC count, [10}^8 \times 10000}{100\%}$</p> <p>[4] Total viable CD20+ cells, $[10^8] = \frac{\% \text{ of viable WBC: CD20+ cells, [\%]} \times \text{Total viable CD45+ WBC count, [10}^8 \times 10000}{100\%}$</p> <p>[5] Total viable CD56+ cells, $[10^8] = \frac{\% \text{ of viable WBC: CD56+ cells, [\%]} \times \text{Total viable CD45+ WBC count, [10}^8 \times 1000}{100\%}$</p>																																																																																																																																	

Рис. 5. Интерфейс с пользователем ЛИС ТГСК представления исходных данных и результатов.

Анализ всех популяций начинается с оценки характеристик прямого и бокового светорассеяния (FSC/SSC):

- в регион P1 включены события, по размеру и «гранулярности» соответствующие нормальным лейкоцитам;
- в регион P2 включены все события, позитивные по панлейкоцитарному антигену CD45;
- жизнеспособность оценивается в каждой пробе методом исключения событий, позитивных по 7-AAD (рис. 1).

Таким образом, все регионы, необходимые для последовательного гейтирования искомым популяций ($CD34^+$, $CD3^+$, $TCR\alpha\beta^+$, $CD20^+$, $CD56^+3^-$ и $CD56^+3^+$), строятся от гейта лейкоцитов, который отвечает условиям P1 AND P2 AND viable WBC.

Анализ $TCR\alpha\beta^+$ -лимфоцитов проводится среди всех $CD3^+$ -позитивных событий. В результате магнитной сепарации в трансплантате содержится минимальное количество $TCR\alpha\beta^+$ -клеток (рис. 2).

Анализ В-лимфоцитов проводится среди всех лимфоцитов. Фракция TARGET, предназначенная для переливания пациенту в результате деплеции, содержит остаточное количество $CD20^+$ -клеток (рис. 3).

Результаты исследования и их обсуждение

Рассмотрим процессы сбора и анализа данных деплеции $TCR\alpha\beta/CD19$ на примере лаборатории трансплантационной иммунологии и иммунотерапии гемобластозов ФГБУ «ФНКЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России.

Первым этапом лабораторного исследования является регистрационный учет пациента, донора и источника стволовых

клеток (биологического материала донора) (рис. 4). Данные пациента необходимы на уровне некоторого среза, который включает в себя персональные и идентификационные данные, клинический статус до ТГСК, ее вид и порядковый номер. Информация о доноре и его биоматериале состоит из персональных и/или идентификационных данных, информации о типе донора, параметрах биологического материала, включая вид, даты его получения, обработки и типе проводимого процессинга.

Проведение деплеции $TCR\alpha\beta/CD19$ предполагает сбор и анализ лабораторных данных, полученных в результате серии последовательных манипуляций с продуктом афереза периферических ГСК и/или костного мозга, что позволяет определить клеточный состав трансплантата и провести его качественную и количественную оценку. С целью обеспечения полноты сбора и корректности анализа лабораторных данных, а также исключения «человеческого фактора» в процессы работы лаборатории трансплантационной иммунологии и иммунотерапии гемобластозов ФГБУ «ФНКЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России внедрена лабораторная информационная система биологии ТГСК (ЛИС ТГСК) [19]. Цель разработки и внедрения ЛИС ТГСК – сбор, хранение и аналитическая обработка лабораторно-диагностических данных пациентов и доноров с возможностью их последующей агрегации с клиническими данными ТГСК [20].

На рис. 5 приведен пример интерфейса с пользователем представления исходных лабораторно-диагностических данных и полей, содержащих результаты вычислений, производимых в процессе проведения деплеции $TCR\alpha\beta/CD19$.

ФГБУ "ФНКЦ ДГОИ им. Д.Рогачева" Минздрава России
 Лаборатория трансплантационной и иммунологии
 и иммунотерапии гемобластозов
 117198 Москва ул.Саморы Машела д.1
 тел. 8(495) 287-65-70 доб.(53-05; 53-10)

Определение клеточного состава трансплантата. Деплеция $TCR\alpha\beta/CD19$.

Пациент				Донор			
Фамилия:				Фамилия:			
Имя:				Имя:			
Отчество:				Отчество:			
Дата рождения:				Дата рождения:			
МИС ID:				МИС ID:			
				ID донора в банке доноров:			

Дата исследования:

WBC count (Sysmex)	Sample volume	Viability of WBC	WBC count (Sysmex) corrected	Total WBC count	Viable CD34	Viable CD34	Total viable CD34+ cells	% of viable WBC: TCR $\alpha\beta^+$ cells	Total Viable TCR $\alpha\beta^+$ cells	% of viable WBC: CD3+ cells	Total Viable CD3+ cells	% of viable WBC: CD20+ cells	Total Viable CD20+ cells	% of viable WBC: CD56+ cells	Total Viable CD56+ cells	% of viable WBC: CD56+CD3+ cells	Total Viable CD56+CD3+ cells
$10^9/мл$	мл		$10^9/мл$	10^6	%	%	10^6	%	$(10^6)-tar$ $(10^6)-af,or,non$	%	$(10^6)-tar$ $(10^6)-af,or,non$	%	$(10^6)-tar$ $(10^6)-af,or,non$	%	10^6	%	10^6
aferez																	
original																	
target																	
non-target																	

NC $10^6/кг$ CD34 $10^6/кг$ TCR $\alpha\beta^+$ cells $10^3/кг$ CD3 $10^6/кг$ CD20 $10^3/кг$ CD56 $10^6/кг$	logD=	logD=	Масса тела: кг Исследование провёл:
--	-------	-------	--

Рис. 6. Пример генерации отчета результатов деплеции $TCR\alpha\beta/CD19$ в ЛИС ТГСК.

На рис. 6 приведена структура печатной формы отчета из ЛИС ТГСК, содержащей данные клеточного состава трансплантата до и после проведения деплеции TCRαβ/CD19. Форма отчета о результатах проведения исследования содержит данные контроля качества выполнения деплеции TCRαβ/CD19, выраженные в

$$\log_{10}D = \frac{\text{Total viable TCR}\alpha\beta, [10^9] \text{ original}}{\text{Total viable TCR}\alpha\beta, [10^5] \text{ target}} \times 10\,000 \text{ и}$$

$$\log_{10} = \frac{\text{Total viable CD20, [10}^9\text{] original}}{\text{Total viable CD20, [10}^5\text{] target}} \times 10\,000,$$

и необходимую и достаточную информацию о клеточном составе трансплантата, которая выражена в количестве клеток: NC (nuclear cells), CD34, TCRαβ+ -cells, CD3, CD20, CD56 на килограмм массы тела пациента.

На графике (рис. 7) отражены основные данные контроля качества выполненных деплеций TCRαβ/CD19 за период 2012–2016 гг. в ФГБУ «ФНКЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России.

В исследование было включено 218 пациентов, получивших в качестве терапии гаплоидентичную ТГСК с деплецией TCRαβ/CD19. Медиана содержания в продукте афереза ядросодержащих клеток составила $5,2 \times 10^{10}$, из которых количество CD34+ -клеток было 314×10^6 , TCRαβ+ -клеток – 31,76% и В-лимфоцитов – 6,38%. В результате обработки трансплантата эффективность деплеции Т-клеточного рецептора и В-лимфоцитов составила 4,38 logD

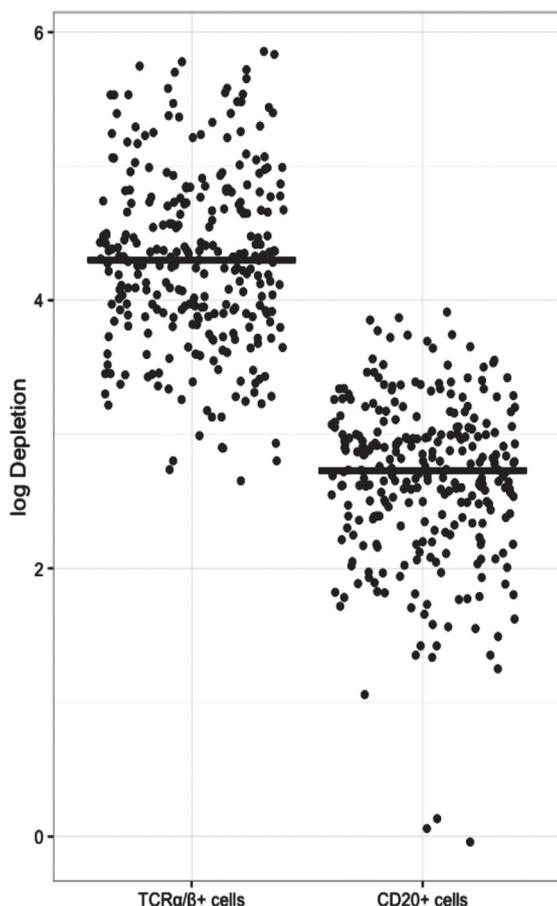


Рис. 7. Результат оценки качества деплеции TCRαβ/CD19.

и 2,8 logD соответственно, одновременно с высоким показателем сохранности гемопоэтических стволовых клеток – 90%.

Негативная деплеция TCRαβ/CD19 зарекомендовала себя как высокоэффективный метод в отношении сохранности стволовых клеток, коммитированных миелоидных предшественников, NK-клеток и гамма/дельта Т-лимфоцитов в трансплантате и, как следствие, эффективности приживления трансплантата и контроля РТПХ. Вероятность первичного приживления в клинике превышает 95%.

Протокол цитометрического исследования интегрированный с лабораторной информационной системой биологии ТГСК, позволяющей автоматизировать часть процессов работы лаборатории трансплантационной иммунологии и иммунотерапии гемобластозов ФГБУ «ФНКЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, показали себя как эффективный и надежный метод оценки количественного и качественного состава трансплантата.

Литература

1. Apperley J, Niederwieser D, Huang XJ, Nagler A, Fuchs E, Szer J, Kodera Y. Haploidentical Hematopoietic Stem Cell Transplantation: A Global Overview Comparing Asia, the European Union, and the United States. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2016 Jan;22(1):23-6. doi: 10.1016/j.bbmt.2015.11.001. Epub 2015 Nov 10.
2. Federmann B, Bornhauser M, Meisner C, Kordelas L, Beelen DW, Stuhler G, et al. Haploidentical allogeneic hematopoietic cell transplantation in adults using CD3/CD19 depletion and reduced intensity conditioning: a phase II study. *Haematologica.* 2012 Oct;97(10):1523-31. doi: 10.3324/haematol.2011.059378. Epub 2012 Apr 4.
3. Bethge WA, Faul C, Bornhäuser M, Stuhler G, Beelen DW, Lang P, et al. Haploidentical allogeneic hematopoietic cell transplantation in adults using CD3/CD19 depletion and reduced intensity conditioning: an update. *Blood Cells Mol Dis.* 2008 Jan-Feb;40(1):13-9. Epub 2007 Sep 14.
4. Oevermann L, Handgretinger R. New strategies for haploidentical transplantation. *Pediatr Res.* 2012 Apr;71(4 Pt 2):418-26. doi: 10.1038/pr.2011.60. Epub 2012 Jan 25.
5. Im HJ, Koh KN, Seo JJ. Recent advances in haploidentical hematopoietic stem cell transplantation using ex vivo T cell-depleted graft in children and adolescents. *Blood Res.* 2016 Mar;51(1):8-16. doi: 10.5045/br.2016.51.1.8. Epub 2016 Mar 25.
6. Al Malki MM, Horowitz M, Handgretinger R, Leung W, Roy DC, Huang XJ, et al. Proceedings from the Second Haploidentical Stem Cell Transplantation Symposium-Haplo2014, San Francisco, California, December 4, 2014. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2016 Apr;22(4):594-604. doi: 10.1016/j.bbmt.2016.01.001. Epub 2016 Jan 13.
7. Federmann B, Hägele M, Pfeiffer M, Wirths S, Schumm M, Faul C, et al. Immune reconstitution after haploidentical hematopoietic cell transplantation: impact of reduced intensity conditioning and CD3/CD19 depleted grafts. *Leukemia.* 2011 Jan;25(1):121-9. doi: 10.1038/leu.2010.235. Epub 2010 Oct 14.
8. Lamb LS Jr, Musk P, Ye Z, van Rhee F, Geier SS, Tong JJ, et al. Human gamma-delta(+) T lymphocytes have in vitro graft vs leukemia activity in the absence of an allogeneic response. *Bone Marrow Transplant.* 2001 Mar;27(6): 601-6.
9. Locatelli F, Bauquet A, Palumbo G, Moretta F, Bertina A. Negative depletion of αβ+ T cells and of CD19+ B lymphocytes: a novel frontier to optimize the effect of innate immunity in HLA-mismatched hematopoietic stem cell transplantation. *Immunol Lett.* 2013 Sep-Oct;155(1-2):21-3. doi: 10.1016/j.iml.2013.09.027. Epub 2013 Sep 30.

10. Schumm M, Lang P, Bethge W, Faul C, Feuchtinger T, Pfeiffer M, et al. Depletion of T-cell receptor alpha/beta and CD19 positive cells from apheresis products with the CliniMACS device. *Cytotherapy*. 2013 Oct;15(10):1253-8. doi: 10.1016/j.jcyt.2013.05.014.
11. Daniele N, Scerpa MC, Caniglia M, Ciammetti C, Rossi C, Bernardo ME, et al. Overview of T-cell depletion in haploidentical stem cell transplantation. *Blood Transfus*. 2012 Jul;10(3):264-72. doi: 10.2450/2012.0106-11. Epub 2012 Jan 24.
12. Maschan M, Shelikhova L, Ilushina M, Kurnikova E, Boyakova E, Balashov D, et al. TCR-alpha/beta and CD19 depletion and treosulfan-based conditioning regimen in unrelated and haploidentical transplantation in children with acute myeloid leukemia. *Bone Marrow Transplant*. 2016 May;51(5):668-74. doi: 10.1038/bmt.2015.343. Epub 2016 Jan 25.
13. Lang P, Feuchtinger T, Teltschik HM, Schwinger W, Schlegel P, Pfeiffer M, et al. Improved immune recovery after transplantation of TCRαβ/CD19-depleted allografts from haploidentical donors in pediatric patients. *Bone Marrow Transplant*. 2015 Jun;50 Suppl 2:S6-10. doi: 10.1038/bmt.2015.87.
14. Fabricius WA, Ramanathan M. Review on Haploidentical Hematopoietic Cell Transplantation in Patients with Hematologic Malignancies. *Adv Hematol*. 2016;2016:5726132. doi: 10.1155/2016/5726132. Epub 2016 Feb 29.
15. Airoidi I, Bertaina A, Prigione I, Zorzoli A, Pagliara D, Cocco C, et al. γδ T-cell reconstitution after HLA-haploidentical hematopoietic transplantation depleted of TCR-αβ+/CD19+ lymphocytes. *Blood*. 2015 Apr 9;125(15):2349-58. doi: 10.1182/blood-2014-09-599423. Epub 2015 Jan 22.
16. Масчан МА. Деплеция альфа/бета-T-лимфоцитов – надежная платформа для развития трансплантации гемопоэтических стволовых клеток от гаплоидентичных доноров. *Российский журнал детской гематологии и онкологии*. 2015;2(3):34-8.
17. Serke S, Johnsen HE. A European reference protocol for quality assessment and clinical validation of autologous haematopoietic blood progenitor and stem cell grafts. *Bone Marrow Transplantation*. 2001;27:463-70.
18. Barnett D, Janossy G, Lubenko A, Matutes E, Newland A, Reilly JT. Guideline for the flow cytometric enumeration of CD34+ haematopoietic stem cells. Prepared by the CD34+ haematopoietic stem cell working party. General Haematology Task Force of the British Committee for Standards in Haematology. *Clin Lab Haematol*. 1999 Oct;21(5):301-8.
19. Боякова ЕВ, Старичкова ЮВ, Воронин КА, Глушкова СЮ, Масчан МА, Румянцев АГ. Свидетельства о государственной регистрации программ для ЭВМ. Лабораторная информационная система биологии трансплантации гемопоэтических стволовых клеток. №2016615303; опубл. 19.05.2016.
20. Абросимов АВ, Илюшина МА, Шеховцова ЖБ, Никонов РО, Старичкова ЮВ, Масчан МА и др. Программный комплекс управления клиническими данными трансплантаций гемопоэтических стволовых клеток. *Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Технические науки*. 2016;1:64-77.
21. Schumm M, Lang P, Bethge W, Faul C, Feuchtinger T, Pfeiffer M, et al. Depletion of T-cell receptor alpha/beta and CD19 positive cells from apheresis products with the CliniMACS device. *Cytotherapy*. 2013 Oct;15(10):1253-8. doi: 10.1016/j.jcyt.2013.05.014.
22. Oevermann L, Handgretinger R. New strategies for haploidentical transplantation. *Pediatr Res*. 2012 Apr;71(4 Pt 2):418-26. doi: 10.1038/pr.2011.60. Epub 2012 Jan 25.
23. Im HJ, Koh KN, Seo JJ. Recent advances in haploidentical hematopoietic stem cell transplantation using ex vivo T cell-depleted graft in children and adolescents. *Blood Res*. 2016 Mar;51(1):8-16. doi: 10.5045/br.2016.51.1.8. Epub 2016 Mar 25.
24. Al Malki MM, Horowitz M, Handgretinger R, Leung W, Roy DC, Huang XJ, et al. Proceedings from the Second Haploidentical Stem Cell Transplantation Symposium-Haplo2014, San Francisco, California, December 4, 2014. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2016 Apr;22(4):594-604. doi: 10.1016/j.bbmt.2016.01.001. Epub 2016 Jan 13.
25. Federmann B, Hägele M, Pfeiffer M, Wirths S, Schumm M, Faul C, et al. Immune reconstitution after haploidentical hematopoietic cell transplantation: impact of reduced intensity conditioning and CD3/CD19 depleted grafts. *Leukemia*. 2011 Jan;25(1):121-9. doi: 10.1038/leu.2010.235. Epub 2010 Oct 14.
26. Lamb LS Jr, Musk P, Ye Z, van Rhee F, Geier SS, Tong JJ, et al. Human gamma-delta(+) T lymphocytes have in vitro graft vs leukemia activity in the absence of an allogeneic response. *Bone Marrow Transplant*. 2001 Mar;27(6):601-6.
27. Locatelli F, Bauquet A, Palumbo G, Moretta F, Bertaina A. Negative depletion of α/β+ T cells and of CD19+ B lymphocytes: a novel frontier to optimize the effect of innate immunity in HLA-mismatched hematopoietic stem cell transplantation. *Immunol Lett*. 2013 Sep-Oct;155(1-2):21-3. doi: 10.1016/j.imlet.2013.09.027. Epub 2013 Sep 30.
28. Schumm M, Lang P, Bethge W, Faul C, Feuchtinger T, Pfeiffer M, et al. Depletion of T-cell receptor alpha/beta and CD19 positive cells from apheresis products with the CliniMACS device. *Cytotherapy*. 2013 Oct;15(10):1253-8. doi: 10.1016/j.jcyt.2013.05.014.
29. Daniele N, Scerpa MC, Caniglia M, Ciammetti C, Rossi C, Bernardo ME, et al. Overview of T-cell depletion in haploidentical stem cell transplantation. *Blood Transfus*. 2012 Jul;10(3):264-72. doi: 10.2450/2012.0106-11. Epub 2012 Jan 24.
30. Maschan M, Shelikhova L, Ilushina M, Kurnikova E, Boyakova E, Balashov D, et al. TCR-alpha/beta and CD19 depletion and treosulfan-based conditioning regimen in unrelated and haploidentical transplantation in children with acute myeloid leukemia. *Bone Marrow Transplant*. 2016 May;51(5):668-74. doi: 10.1038/bmt.2015.343. Epub 2016 Jan 25.
31. Lang P, Feuchtinger T, Teltschik HM, Schwinger W, Schlegel P, Pfeiffer M, et al. Improved immune recovery after transplantation of TCRαβ/CD19-depleted allografts from haploidentical donors in pediatric patients. *Bone Marrow Transplant*. 2015 Jun;50 Suppl 2:S6-10. doi: 10.1038/bmt.2015.87.
32. Fabricius WA, Ramanathan M. Review on Haploidentical Hematopoietic Cell Transplantation in Patients with Hematologic Malignancies. *Adv Hematol*. 2016;2016:5726132. doi: 10.1155/2016/5726132. Epub 2016 Feb 29.
33. Airoidi I, Bertaina A, Prigione I, Zorzoli A, Pagliara D, Cocco C, et al. γδ T-cell reconstitution after HLA-haploidentical hematopoietic transplantation depleted of TCR-αβ+/CD19+ lymphocytes. *Blood*. 2015 Apr 9;125(15):2349-58. doi: 10.1182/blood-2014-09-599423. Epub 2015 Jan 22.
34. Maschan MA. Depletion of alpha/beta-T-cells is a robust platform for haploidentical hematopoietic stem cell transplantation results improvement. *Russian Journal of Children Hematology and Oncology*. 2015;2(3):34-8. (In Russian).
35. Serke S, Johnsen HE. A European reference protocol for quality assessment and clinical validation of autologous haematopoietic blood progenitor and stem cell grafts. *Bone Marrow Transplantation*. 2001;27:463-70.
36. Barnett D, Janossy G, Lubenko A, Matutes E, Newland A, Reilly JT. Guideline for the flow cytometric enumeration of CD34+ haematopoietic stem cells. Prepared by the CD34+ haematopoietic stem cell working party. General Haematology Task Force of the British Committee for Standards in Haematology. *Clin Lab Haematol*. 1999 Oct;21(5):301-8.

References

1. Apperley J, Niederwieser D, Huang XJ, Nagler A, Fuchs E, Szer J, Kodera Y. Haploidentical Hematopoietic Stem Cell Transplantation: A Global Overview Comparing Asia, the European Union, and the United States. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2016 Jan;22(1):23-6. doi: 10.1016/j.bbmt.2015.11.001. Epub 2015 Nov 10.
2. Federmann B, Bornhauser M, Meisner C, Kordelas L, Beelen DW, Stuhler G, et al. Haploidentical allogeneic hematopoietic cell transplantation in adults using CD3/CD19 depletion and reduced intensity conditioning: a phase II study. *Haematologica*. 2012 Oct;97(10):1523-31. doi: 10.3324/haematol.2011.059378. Epub 2012 Apr 4.
3. Bethge WA, Faul C, Bornhäuser M, Stuhler G, Beelen DW, Lang P, et al. Haploidentical allogeneic hematopoietic cell transplantation in adults using CD3/

19. Boyakova EV, Starichkova YuV, Voronin KA, Glushkova SYu, Maschan MA, Rumyantsev AG. Svidetel'stva o gosudarstvennoi registratsii programm dlya EVM. Laboratornaya informatsionnaya sistema biologii transplantatsii gemopoeticheskikh stvolovykh kletok. №2016615303; opubl. 19.05.2016. (In Russian).
20. Abrosimov AV, Ilyushina MA, Shekhovtsova ZhB, Nikonov RO, Starichkova YuV, Maschan MA, et al. Software for managing clinical data on transplantaton of hematopoietic stem cells. University proceedings. Volga region. Technical sciences. 2016;1:64-77. (In Russian).

Информация о соавторах:

Боякова Елена Викторовна, кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории трансплантационной иммунологии и иммунотерапии гемобластозов Федерального научно-клинического центра детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева Минздрава России

Адрес: 117997, ГСП-7, Москва, ул. Саморы Машела, 1
Телефон: (495) 287-6570, доб. 5310
E-mail: elenaboyakova@mail.ru

Старичкова Юлия Викторовна, кандидат технических наук, заведующая отделом математических методов и информационных технологий Федерального научно-клинического центра детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева Минздрава России

Адрес: 117997, ГСП-7, Москва, ул. Саморы Машела, 1
Телефон: (495) 287-6570, доб. 5542
E-mail: julia.starichkova@fnkc.ru

Першин Дмитрий Евгеньевич, младший научный сотрудник лаборатории трансплантационной иммунологии и иммунотерапии гемобластозов Федерального научно-клинического центра детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева Минздрава России

Адрес: 117997, ГСП-7, Москва, ул. Саморы Машела, 1
Телефон: (495) 287-6570, доб. 5550
E-mail: dmitry.pershin@fnkc.ru

Воронин Кирилл Александрович, ведущий инженер отдела математических методов и информационных технологий Федерального научно-клинического центра детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева Минздрава России

Адрес: 117997, ГСП-7, Москва, ул. Саморы Машела, 1
Телефон: (495) 287-6570, доб. 5542
E-mail: kirill.voronin@fnkc.ru

Зубаченко Виктория Андреевна, младший научный сотрудник лаборатории трансплантационной иммунологии и иммунотерапии гемобластозов Федерального научно-клинического центра детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева Минздрава России

Адрес: 117997, ГСП-7, Москва, ул. Саморы Машела, 1
Телефон: (495) 287-6570, доб. 5505
E-mail: viktorija.zubachenko@fnkc.ru

Масчан Михаил Александрович, доктор медицинских наук, профессор, заместитель генерального директора – директор «Высшей школы молекулярной и экспериментальной медицины» Федерального научно-клинического центра детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева Минздрава России

Адрес: 117997, ГСП-7, Москва, ул. Саморы Машела, 1
Телефон: (495) 287-6570, доб. 5576
E-mail: mmaschan@yandex.ru

Румянцев Александр Григорьевич, академик РАН, доктор медицинских наук, профессор, директор Федерального научно-клинического центра детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева Минздрава России

Адрес: 117997, ГСП-7, Москва, улица Саморы Машела, 1
Телефон: (495) 937-5024
E-mail: Alexander.Rumyantsev@fccho-moscow.ru

Information about co-authors:

Elena V. Boyakova, PhD in medicine, leading research fellow at the laboratory of transplantation immunology and immunotherapy of haemoblastoses, Dmitry Rogachev Federal Research Centre of Paediatric Hematology, Oncology and Immunology, Ministry of Health of the Russian Federation
Address: 1, Samory Mashela street, Moscow, GSP-7, 117997, Russian Federation
Phone: (495) 287-6570, ext. 5310
E-mail: elenaboyakova@mail.ru

Yuliya V. Starichkova, PhD in technology, head of the department of mathematical methods and information technologies, Dmitry Rogachev Federal Research Centre of Paediatric Hematology, Oncology and Immunology, Ministry of Health of the Russian Federation

Address: 1, Samory Mashela street, Moscow, GSP-7, 117997, Russian Federation
Phone: (495) 287-6570, ext. 5542
E-mail: julia.starichkova@fnkc.ru

Dmitrii E. Pershin, junior research fellow at the laboratory of transplantation immunology and immunotherapy of haemoblastoses, Dmitry Rogachev Federal Research Centre of Paediatric Hematology, Oncology and Immunology, Ministry of Health of the Russian Federation

Address: 1, Samory Mashela street, Moscow, GSP-7, 117997, Russian Federation
Phone: (495) 287-6570, ext. 5550
E-mail: dmitry.pershin@fnkc.ru

Kirill A. Voronin, leading engineer at the department of mathematical methods and information technologies, Dmitry Rogachev Federal Research Centre of Paediatric Hematology, Oncology and Immunology, Ministry of Health of the Russian Federation

Address: 1, Samory Mashela street, Moscow, GSP-7, 117997, Russian Federation
Phone: (495) 287-6570, ext. 5542
E-mail: kirill.voronin@fnkc.ru

Viktoriya A. Zubachenko, junior research fellow at the laboratory of transplantation immunology and immunotherapy of haemoblastoses, Dmitry Rogachev Federal Research Centre of Paediatric Hematology, Oncology and Immunology, Ministry of Health of the Russian Federation

Address: 1, Samory Mashela street, Moscow, GSP-7, 117997, Russian Federation
Phone: (495) 287-6570, ext. 5505
E-mail: viktorija.zubachenko@fnkc.ru

Mikhail A. Maschan, DSc in medicine, professor, deputy director general – director of the Higher School of Molecular and Experimental Medicine, Dmitry Rogachev Federal Research Centre of Paediatric Hematology, Oncology and Immunology, Ministry of Health of the Russian Federation

Address: 1, Samory Mashela street, Moscow, GSP-7, 117997, Russian Federation
Phone: (495) 287-6570, ext. 5576
E-mail: mmaschan@yandex.ru

Alexandr G. Rumyantsev, academician of the Russian Academy of Sciences, DSc in medicine, professor, director of Dmitry Rogachev Federal Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Ministry of Health of the Russian Federation

Address: 1, Samory Mashela street, Moscow, GSP-7, 117997, Russian Federation
Phone: (495) 937-5024
E-mail: Alexander.Rumyantsev@fccho-moscow.ru