

# Impact of post-transplant high-dose cyclophosphamide after hematopoietic stem cell transplantation on bone marrow resident CD8<sup>+</sup> T cells

Natalia N. Popova, Mikhail Y. Drovkov, Julia O. Davydova, Larisa A. Kuzmina, Nikolay M. Kapranov, Anna A. Kuchmiy, Alexander S. Vdovin, Ekaterina D. Mikhaltsova, Darya S. Dubnyak, Vera A. Vasilyeva, Olga M. Koroleva, Zoya V. Konova, Irina V. Galtseva, Grigory A. Efimov, Elena N. Parovichnikova, Valery G. Savchenko

National Research Center for Hematology, Moscow, Russian Federation

Contact: Dr. Mikhail Drovkov  
E-mail: mdrovkov@gmail.com

## Introduction

Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT) is one of the most effective therapy for patients with hematologic malignancies. Its success depends on many factors such as patient age, comorbidities, conditioning regimen etc. In most cases, however, the efficiency of immune reconstitution appears to be the crucial factor determining allo-HSCT success. Bone marrow resident CD8<sup>+</sup> T cells comprise the main pool of adaptive immunity against pathogens and tumors. Here we describe an impact of a high-dose post-transplant cyclophosphamide (PTCy) upon reconstitution of bone marrow (BM) resident CD8<sup>+</sup> T cells after allo-HSCT. The aim of this study was to evaluate real impact of high-dose PTCy on bone marrow pool of CD8<sup>+</sup> T memory cells in allo-HSCT patients.

## Patients and methods

Bone marrow (BM) samples were collected on day +30, +60 and +90 after allo-HSCT in EDTA-tubes. The group consisted of 19 patients (9 males and 10 females) with a median age of 36 years (20-60 years old) who underwent allo-HSCT between September 2016 and February 2017. All the patients had hematological malignancy (ALL, 3; AML, 13; LPD, 3). Sixteen patients were in complete remission, and 3 patients were transplanted in progressive disease. Myeloablative conditioning regimen (MAC) was used for 7 patients and reduced-intensity conditioning (RIC), in 12 patients. The GVHD prophylaxis included on classical immunosuppressive therapy (n=12), or a post-transplant treatment based on high-dose cyclophosphamide (PTCy) on day +3, +4 (n=7), as follows: CsA+MMF+MTX+ATG (n=11), PTCy+ATG (n=2), CsA+MMF+PTCy+ATG (n=5), CsA+MTX (n=1).

Flow cytometry analysis was performed by means of BD FACS Canto II machine (Becton Dickinson, USA). 7-AAD was used to exclude dead cells from analysis. The anti-CD8-APC-Cy7, anti-CCR7-PE-Cy7, anti-CD28-PE, anti-CD45R0-FITC antibodies (Becton Dickinson, USA) were used to define T memory subsets: T naive and T stem cell memory (Tnv+Tscm) were identified as CD8<sup>+</sup>CD45R0<sup>-</sup>CCR7<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>; T central memory cells (Tcm), as CD8<sup>+</sup>CD45R0<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>; T transitional memory cells (Ttm), as CD8<sup>+</sup>CD45R0<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup>CD28<sup>+</sup>; T effector memory cells (Tem), as CD8<sup>+</sup>CD45R0<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup>CD28<sup>-</sup>; T terminal effector cells (Tte), as CD8<sup>+</sup>CD45R0<sup>-</sup>CCR7<sup>-</sup>CD28<sup>-</sup>. Mann-Whitney U test was used for non-parametric data analysis. A p value less than 0.05 was considered to be statistically significant. The entire data analysis was conducted with SPSS ver. 23. (IBM, Chicago, Ill., USA).

## Results

In these subgroups of the patients, we show the lower numbers of Tnv+Tscm CD8<sup>+</sup> cells in BM within 100 days of follow up period after allo-HSCT in patients who were treated with PTCy compare to the group of patients with classical immunosuppressive regimen (p<0,05). Detailed data are presented in Table 1.

## Conclusion

The use of PTCy for immunosuppressive regimen mostly affects bone marrow CD8<sup>+</sup> Tnv+Tscm cells. These populations demonstrate antigen-independent proliferation in BM and represent the main source of CD8<sup>+</sup> T cells ensuring adoptive immunity. Hypothetically reduced Tnv+Tscm CD8<sup>+</sup> cells in BM after PTCy can play a key role not only in preventing

GVHD due to the lack of allore-active T-cell pool, but they can also lead to immune insufficiency and post-transplant complications such as malignancy relapses and infections. These issues need to be clarified in further research.

## Disclosures

No relevant conflicts of interest to declare.

## Keywords

Bone marrow resident T cells, T memory cells, immune reconstitution, stem cell transplantation, post-transplant high dose cyclophosphamide.

**Table 1. Short-term bone marrow resident T cells reconstitution after allo-HSCT**

Day after HSCT	T memory subsets	Classical Immunosuppression, without PTCy % from CD8+ cells Median (interquartile range)	PTCy % from CD8+ cells Median (interquartile range)	P-value
+30	Tnv+Tscm	8.34 (5.88-12.05)	2.36 (1.34-2.79)	0.001
	Tcm	5.86 (3.00-10.62)	3.15 (2.44-13.73)	0.967
	Ttm	30.20 (18.92-34.06)	22.32 (15.86-53.55)	0.902
	Tem	28.97 (23.16-31.74)	44.12 (22.82-64.02)	0.261
	Tte	28.69 (17.55-37.87)	10.57 (9.21-22.34)	0.083
+60	Tnv+Tscm	6.87 (3.95-15.18)	0.27 (0.22-1.18)	0.003
	Tcm	7.24 (2.27-9.06)	2.21 (1.56-3.93)	0.171
	Ttm	19.85 (7.32-46.76)	25.29 (6.23-32.43)	0.622
	Tem	31.83 (18.23-44.70)	53.63 (48.65-86.73)	0.093
	Tte	21.01 (13.71-35.95)	13.51 (5.26-17.68)	0.284
+90	Tnv+Tscm	7.83 (5.13-9.33)	1.85 (0.62-2.71)	0.015
	Tcm	6.22 (3.30-12.00)	3.59 (0.68-11.49)	0.485
	Ttm	29.08 (17.33-49.45)	25.45 (6.89-39.85)	0.485
	Tem	34.37 (25.82-46.44)	56.81 (31.54-64.17)	0.180
	Tte	12.32 (10.62-20.00)	9.74 (4.34-14.31)	0.394

# Влияние высокодозного циклофосфида на реконституцию Т цитотоксических клеток памяти в костном мозге у больных после трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток

Наталья Н. Попова, Михаил Ю. Дроков, Юлия О. Давыдова, Лариса А. Кузьмина, Николай М. Капранов, Анна А. Кучмий, Александр С. Вдовин, Екатерина Д. Михальцова, Дарья С. Дубняк, Вера А. Васильева, Ольга М. Королева, Зоя В. Конова, Ирина В. Гальцева, Григорий А. Ефимов, Елена Н. Паровичникова, Валерий Г. Савченко

ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр гематологии МЗ России, Москва, Российская Федерация

## Введение

Трансплантация аллогенных гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК) является одним из наиболее эффективных методов лечения больных гемобластозами. Успех алло-ТГСК зависит от многих факторов, таких как возраст больного, коморбидность, режим кондиционирования и др. Однако, определяющим фактором успешной алло-ТГСК является реконституция иммунной системы. Т цитотоксические CD8+ клетки памяти в костном мозге представляют собой популяцию клеток, обеспечивающих противоопухолевый и противоионфекционный иммунный ответ. В данном исследовании показано влияние посттрансплантационного циклофосфида (ЦФ) на реконституцию Т цитотоксических клеток памяти в костном мозге у больных после алло-ТГСК. Целью работы было изучение реконституции Т цитотоксических CD8+ клеток памяти в костном мозге у больных после алло-ТГСК.

## Пациенты и методы

Для определения CD8+ клеток памяти были использованы образцы костного мозга (КМ) 19 больных с гемобластозами (муж. 9, жен. 10) на сроках +30, +60, +90 дней после алло-ТГСК. Медиана возраста больных 36 лет (20-60 лет). Алло-ТГСК была выполнена больным с ОЛЛ (n=3), ОМЛ (n=13), ЛПЗ (n=3). На момент алло-ТГСК 16 пациентов находились в ремиссии заболевания и 3 больным алло-ТГСК выполнена в прогрессии заболевания. Миелоаблативный режим кондиционирования применялся у 7 больных, режим пониженной интенсивности – у 12. В качестве иммуносупрессивной терапии использовались классические схемы (n=12) или применялся высокодозный циклофосфамид (ЦФ) на +3, +4 день в сочетании с другими иммуносупрессивными агентами (n=7): ЦсА+ММФ+МТХ+АТГ (n=11), ЦФ+АТГ (n=2), ЦсА+ММФ+ЦФ+АТГ (n=5), ЦсА+МТХ (n=1).

Исследование образцов КМ для определения Т клеток памяти проведено с использованием метода проточной цитометрии (BD FACS Canto II, Becton Dickinson, USA). Для идентификации субпопуляций Т клеток памяти применялся стандартный протокол с использованием анти-CD8-APC-Cy7, анти-CCR7-PE-Cy7, анти-CD28-PE, анти-CD45R0-FITC антител (Becton Dickinson, USA): Т наивные и Т стволовые клетки памяти (Tnv+Tscm) – CD8+CD45R0-CCR7+CD28+; Т клетки центральной

памяти (Tcm) – CD8+CD45R0+CCR7+CD28+; Т клетки транзиторной памяти (Ttm) – CD8+CD45R0+CCR7-CD28+; Т клетки эффекторной памяти (Tem) – CD8+CD45R0+CCR7-CD28-; Т терминальные эффекторы (Tte) – CD8+CD45R0-CCR7-CD28-. Для исключения из анализа мертвых клеток применялся 7-AAD. Для оценки различий между двумя независимыми выборками использовался U-критерий Манна-Уитни. Значение  $p < 0,05$  считалось статистически значимым. Весь анализ данных проводился с использованием SPSS ver 23. (IBM, Chicago, Ill., USA).

## Результаты

По данным проведенного исследования, в этих подгруппах больных получено значимо меньшее количество наивных и стволовых CD8+ клеток памяти (Tnv+Tscm) в костном мозге у пациентов в течение первых 100 дней после алло-ТГСК, получивших с целью индукции толерантности высокодозный ЦФ на +3,+4 день, в сравнении с классическими схемами иммуносупрессивной терапии ( $p < 0,05$ ). Полученные данные представлены в таблице 1.

## Заключение

Наивные и стволовые CD8+ клетки памяти (Tnv+Tscm) представляют собой самостоятельную субпопуляцию клеток в костном мозге, которые способны к антигеннезависимой пролиферации, что является ключевым моментом в реализации вторичного (адоптивного) иммунного ответа. В данном исследовании показано влияние посттрансплантационного ЦФ, используемого в режимах профилактики РТПХ, на Т цитотоксические клетки памяти. Вероятно, малое число наивных и стволовых CD8+ клеток памяти (Tnv+Tscm) в костном мозге после использования ЦФ является ключевым фактором в механизме профилактики РТПХ. Однако этот факт может иметь значение и в развитии как инфекционных осложнений, так и рецидивов заболевания после алло-ТГСК.

## Ключевые слова

Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток, клетки памяти костного мозга, Т цитотоксические клетки, реконституция иммунной системы, высокодозный циклофосфамид.