



**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ
“ПРОФ. Д-Р ПАРАСКЕВ СТОЯНОВ” – ВАРНА**

**ФАКУЛТЕТ ПО МЕДИЦИНА
КАТЕДРА “ВТОРА КАТЕДРА ПО ВЪТРЕШНИ БОЛЕСТИ”**

Д-р Явор Анжелов Петров

**Роля на лимфоцитните популации след алогенна
трансплантация на хемопоетични стволови клетки**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд
за присъждане на образователна и научна степен

“доктор”

Специалност: **“Хематология и преливане на кръв”**

Научен ръководител:
Проф. д-р Илина Димитрова Мичева, д.м.

Варна, 2025

Дисертационният труд е обсъден на открито заседание на катедрен съвет на Втора катедра по вътрешни болести при МУ “проф. д-р Параскев Стоянов” – Варна (протокол №/08.07.2025г.)
Приет е и насочен за защита пред Научно жури в състав:

Външни членове за Медицински Университет – Варна:

Проф. д-р Веселина Стефанова Горанова – Маринова, д.м.

Доц. д-р Мая Николова Йорданова, д.м.

Доц. д-р Антонио Иванов Антонов, д.м.

Резервен външен член:

Подп. Доц. д-р Иван Киндеков, д.м.

Вътрешни членове:

Доц. д-р Трифон Георгиев Червенков, д.м.

Доц. д-р Милена Иванова Белчева, д.м.

Резервен вътрешен член:

Доц. д-р Елеонора Георгиева Димитрова – Господинова, д.м.

Заклучителното заседание на научното жури за защита на дисертационния труд на докторанта д-р Явор Анжелов Петров да бъде проведено на 24.09.2025г.

Материалите по защитата на дисертационния труд са на разположение в Научен отдел на МУ – Варна и са публикувани на интернет страницата на МУ “Проф. д-р Параскев Стоянов” – Варна.

Съдържание

I.	Въведение	4
1.	Актуалност на проблема	4
II.	Цел на проучването	4
III.	Задачи	4
IV.	Материали и методи	5
1.	Пациентска група	5
2.	Донори и вид на присадката	6
3.	Кондициониращи режими и имunosупресия.....	7
4.	Флоуцитометричен анализ на лимфоцитните субпопулации	7
V.	Резултати.....	10
1.	Общо възстановяване на имунната система след ало – СКТ	10
2.	Трансплантационни фактори и възстановяване на имунната система	11
2.1.	Вид диагноза	11
2.2.	Вид донор.....	12
2.3	Пол на донора	13
2.4.	Кондициониращи режими и серотерапия	14
3.	Трансплантационни усложнения и възстановяване на имунната система	16
4.	Връзка между имунното възстановяване и общата преживяемост	24
VI.	Дискусия на резултатите.....	28
VII.	Изводи от резултатите	33
VIII.	Приноси на дисертационния труд	34
	С оригинален характер	34
	С научно-практически характер	34
	С потвърдителен характер	35
IX.	Заключение.....	35
X.	Научни публикации	36
XI.	Благодарности.....	36
XII.	Библиография	38

I. Въведение

Алогенната трансплантация на хемопоеични стволови клетки (ало-СКТ) представлява утвърден терапевтичен подход при редица малигнени и бенигнени хематологични заболявания. Въпреки значителния напредък в областта на трансплантационната медицина, този метод е свързан с редица усложнения – болест на присадката срещу приемателя (graft versus host disease; GVHD), инфекциозни усложнения (вирусни, бактериални, микотични), неинфекциозни усложнения (дисфункция на различни органи и системи) и забавено и непълно възстановяване на имунната система.

1. Актуалност на проблема

След ало-СКТ, възстановяването на имунната система е сложен и продължителен процес, който има критично значение за прогнозата на пациентите. Лимфоцитните субпопулации играят ключова роля в имунорегулацията на реципиентите, като дисбалансът в тяхната численост и функция води до тежки последствия – GVHD, рецидив на основното заболяване, инфекциозни и неинфекциозни усложнения. Разбирането на динамиката на тези субпопулации в посттрансплантационния период е от съществено значение за подобряване на терапевтичните стратегии и прогнозата на пациентите.

II. Цел на проучването

Целта на проучването е да се анализират абсолютния лимфоцитен брой и лимфоцитните субпопулации (CD3+CD4+; CD3+CD8+ CD38+; NK, CD19+) при пациенти с малигнени хематологични заболявания след алогенна трансплантация на хемопоеични стволови клетки и тяхната корелация с различни трансплантационни фактори и усложнения.

III. Задачи

1. Да се анализира абсолютния лимфоцитен брой (ALC) на ден 30, 100 и 180 от посттрансплантационния период и неговата връзка със следните трансплантационни фактори – вид донор, пол на донор, кондициониращ режим, трансплантационни усложнения – GVHD, инфекции, неинфекциозни усложнения.

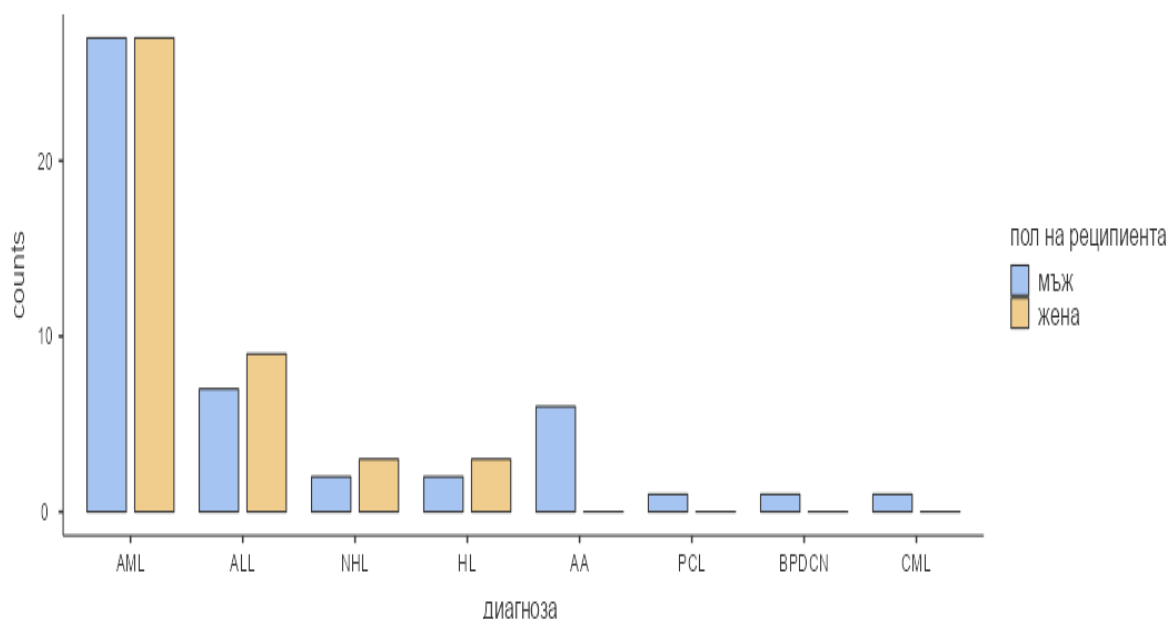
2. Да се анализира броят на Т – хелперни субпопулации CD3+CD4+ на ден 100, 180 и 270 от посттрансплантационния период и тяхната връзка със следните трансплантационни фактори – вид донор, пол на донор, кондициониращ режим, трансплантационни усложнения – GVHD, инфекции, неинфекциозни усложнения.
3. Да се анализира броят на активираните Т – цитотоксични популации (CD3+CD8+CD38+) на ден 100, 180 и 270 от посттрансплантационния период и тяхната връзка със следните трансплантационни фактори – вид донор, пол на донор, кондициониращ режим, трансплантационни усложнения – GVHD, инфекции, неинфекциозни усложнения.
4. Да се анализира броят на NK клетъчни популации на ден 100, 180 и 270 от посттрансплантационния период и тяхната връзка със следните трансплантационни фактори – вид донор, пол на донор, кондициониращ режим, трансплантационни усложнения – GVHD, инфекции, неинфекциозни усложнения.
5. Да се анализира броят на В – лимфоцитните популации (CD19+) на ден 100, 180 и 270 от посттрансплантационния период и тяхната връзка със следните трансплантационни фактори – вид донор, пол на донор, кондициониращ режим, трансплантационни усложнения – GVHD, инфекции, неинфекциозни усложнения.

IV. Материали и методи

1. Пациентска група

В анализа са включени 89 пациенти над 18 годишна възраст със съответното полово разпределение 47 мъже (52.8%) и 42 жени (47.2%), които са получили алогенна трансплантация на хемопоеични стволови клетки, поради малигнено хематологично заболяване, за периода 2017 – 2023 година в Отделение за трансплантация на хемопоеични стволови клетки към клиника по хематология в УМБАЛ “Св. Марина” гр. Варна. Средната възраст за мъжете реципиенти е 48 години $\pm$ 13.6 години, а за жените, съответно 44.5 години $\pm$ 13.5 години. Най – много са пациентите, диагностицирани с

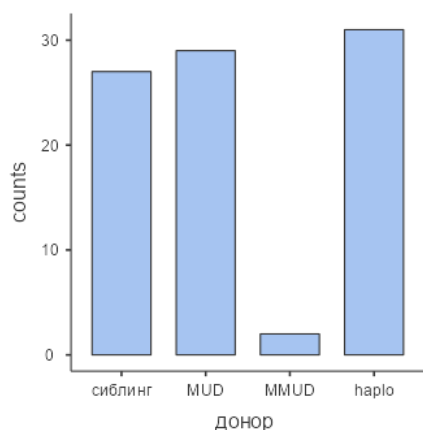
остра миелоидна левкемия – 54 (60.6%), следвани от пациенти с остра лимфобластна левкемия – 16 (18%), Неходжкинови лимфоми – 5 (5.6%), Лимфом на Ходжкин 5 (5.4%), Апластична анемия – 6 (6.7%), Плазмоклетъчна левкемия 1 (1.1%), BPDCN 2 (2.1%), CML – 1 (1.1%). (фигура 1)



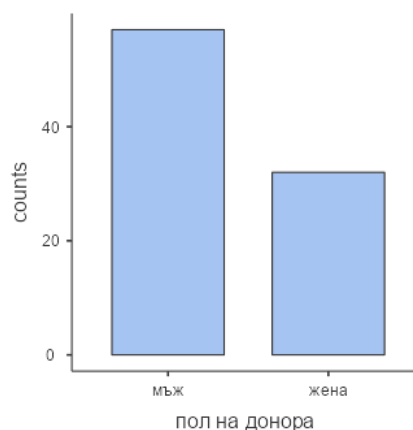
Фиг 1. Разпределение на пациентите по диагнози и пол

2. Донори и вид на присадката

Пациентите, трансплантирани от 10/10 HLA – съвместим родствен донор са 27 (30.3%), следвани от 10/10 HLA – напълно съвместим неродствен донор – 29 (32.6%), 9/10 HLA - ненапълно съвместим неродствен донор -2 (2.2%) и хаплоидентични донори – 31 (34.8%). Най – много донори са използвани от мъжки пол – 57 (64%), спрямо жени – 32 (36%). Като източник на хемопоетични стволови клетки преобладава периферната кръв (n=87) над костен мозък (n=2). (фигура 2 и 3)



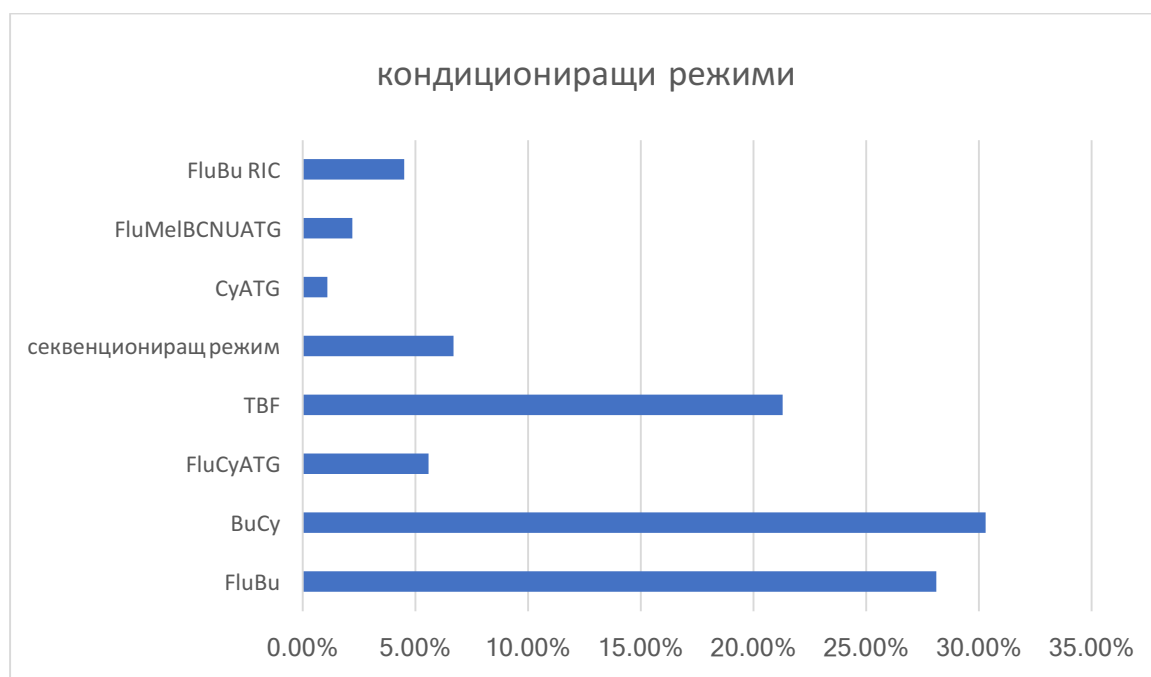
фиг. 2. Разпределение по вид донор



фиг. 3. Полово разпределение

3. Кондициониращи режими и имunosупресия

Кондициониращите режими, които са използвани съответно са миелоаблативни варианти на FluBu n=25 (28.1%), BuCy n=27 (30.3%), FluCyATG n=5 (5.6%), TBF n= 19 (21.3%), FLAMSA-Bu n=6 (6.7%), CyATG n=1 (1.1%), FluMelBCNUATG n=2 (2.2%), RIC FluBu n=4 (4.5%). Имуносупресивната профилактика включва употребата на калциневринови инхибитори Циклоспорин А 3 мг/кг/ден (таргетна концентрация между 200 – 250 нг/мл) (n=80) или Такролимус 0.01 мг/кг/ден (таргетна концентрация между 5-12 нг/мл) (n=9), в комбинация с Микофенолат мофетил до ден +35 (n= 85), $\pm$ Метотрексат 20мг/м² (ден +1, +3, +6, +11 за пациентите с неродствен донор, и кратък курс ден +1, +3 и +6 за пациентите с родствен донор). (фигура 4)



фиг. 4. Видове кондициониращи режими

4. Флоуцитометричен анализ на лимфоцитните субпопулации

Мониторинг на лимфоцитните субпопулации в посттрансплантационния период се извърши посредством мултипараметърна флоуцитометрия на периферна кръв на ден 100, 180 и ден 270. Изследванията са извършени в Лаборатория по клинична имунология към УМБАЛ “Света Марина” ЕАД гр. Варна. Кръвните проби са взети чрез венепункция със затворена система с антикоагулант EDTA BD Vacutainer™ K2E 3 ml, каталожен номер 368856 (Becton Dickinson, САЩ). Имунофенотипизирането на лимфоцитите и определянето на относителната им честота от венозна кръв е извършено чрез директна имунофлуоресценция с комбинации от моноклонални антитела, маркирани с

флуоресцеин изотоцианат (FITC), AlexaFluor 488 (AF488), фикоеритрин (PE), перидинин-хлорофил-протеин (PerCP) и алофикоцианин (APC) и бяха проведени съгласно протокола лизиране с промиване на производителя (Becton Dickinson, USA). Използваните моноклонални антители са от производител Becton Dickinson, USA, както следва: CD3 FITC/CD8 PE/CD45 PerCP/CD4 APC, кат. №342417; CD3 FITC/CD16+56 PE/CD45 PerCP, кат. №342411; CD3 FITC/CD19 PE/CD45 PerCP, кат. №342412; CD3 FITC/HLA-DR PE, кат. №337603; CD4 FITC/CD25 PE/CD3 PerCP, кат. №333170; CD4 FITC/CD62L PE, кат. №349513; CD57 FITC/CD8 PE, кат. №333191; CD8 FITC/CD28 PE, кат. №340031; CD8 FITC/CD38 PE, кат. №349527; CD8 PerCP, кат. №345774; CD11b AF488, кат. №557701; CD8 PE, кат. №345773. Венозната кръв е инкубирана за 15 минути на стайна температура с коктейл от моноклонални антители, след което еритроцитите са лизирани с BD FACS™ Lysing Solution 1×, кат. №349202 (Becton Dickinson, USA), за 10 минути на стайна температура, след което клетките са утаяват чрез центрофугиране при $300 \times g$ и са промити и ресуспендирани с изотоничен разтвор BD CellWASH, кат. №349524 (Becton Dickinson, USA). След това пробите са аквизирани на флоуцитометър FACSCalibur (Becton Dickinson, USA) и анализирани чрез софтуер CellQuest Pro версия 6.1 (Becton Dickinson, USA) (20 000 събития/епруветка). Абсолютния брой на отделните лимфоцитни субпопулации е определен чрез използване на две платформи: концентрацията на лимфоцитите е определена чрез хемтологичен анализатор Sysmex XN-1000 (Sysmex Corporation, Япония). Характеризираните лимфоцитни субпопулации и техния фенотип е описан в Таблица 1.

Лимфоцитна субпопулация	Фенотип
Общи Т лимфоцити	CD3+
Активирани Т лимфоцити	CD3+HLA-DR+
Хелперно-индусерни Т лимфоцити	CD3+ CD4+
Супресорно-индусерни Т лимфоцити	CD4+CD62L+
Хелперни Т лимфоцити	CD4+CD62L–
Супресорно-цитотоксични Т лимфоцити	CD3+ CD8+
Супресорни Т лимфоцити	CD8+ CD11b+
Цитотоксични Т лимфоцити	CD8+ CD11b–
CD4/CD8 индекс	CD3+ CD4+ / CD3+ CD8+
В лимфоцити	CD19+
НК клетки	CD3– CD16/56+
НКТ клетки	CD3+ CD16/56+
Терминално диференцирани CD8+ Т-лимфоцити	CD57+/CD8+
Терминално диференцирани CD8– Т-лимфоцити	CD57+/CD8–
Активирани цитотоксични Т-лимфоцити	CD8+HLA-DR+

Цитотоксични клетки	CD8+ CD28+
Активирани цитотоксични Т-лимфоцити	CD8+CD38+
Регулаторни Т-лимфоцити	CD4+CD25+

Таблица 1. Фенотип на лимфоцитните субпопулации

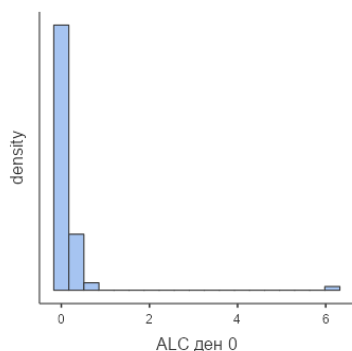
1. Статистически анализ

Статистическата обработка на данните е извършена с помощта на програмния пакет IBM SPSS Statistics, версия 22. Всички количествени данни са представени като средна стойност $\pm$ стандартно отклонение (SD) при нормално разпределение, и като медиана с междупертилитен интервал при ненормално разпределение. Категориалните променливи са изразени в абсолютни числа и проценти. Извършен е описателен статистически анализ за всички изследвани променливи с цел да се охарактеризира разпределението на данните. Описани са основните показатели като средни стойности, медиани, минимални и максимални стойности, стандартно отклонение и стандартна грешка на средната стойност. За оценка на различията между две независими групи е използван U-критерий на Mann-Whitney, който е подходящ при ненормално разпределение на данните и при малки извадки. При сравнение на повече от две независими групи е приложен еднофакторен дисперсионен анализ (One-Way ANOVA), с последващ Post hoc анализ на Tukey, чрез който се идентифицират статистически значимите разлики между конкретни групи. За оценка на силата и посоката на връзките между две количествени променливи е използван корелационен анализ, с изчисляване на коефициента на Спирман (Spearman's rho). Зависимостите между категориални променливи са изследвани чрез хи-квадрат (χ^2) тест. При анализа на влиянието на независими променливи (например имунологични показатели) върху зависими клинични изходи (например GVHD, инфекция), е приложен регресионен анализ – линеен или логистичен, в зависимост от естеството на зависимата променлива. За оценка на диагностичната точност на изследваните маркери и за определяне на оптимални гранични стойности (cut-off values) е използван ROC (Receiver Operating Characteristic) анализ. Изчислени са площта под кривата (AUC), чувствителност и специфичност, както и съответните 95% доверителни интервали. Всички резултати се считат за статистически значими при ниво на вероятност $p < 0.05$, освен ако не е посочено друго.

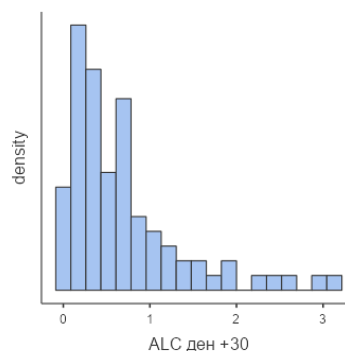
V. Резултати

1. Общо възстановяване на имунната система след ало – СКТ

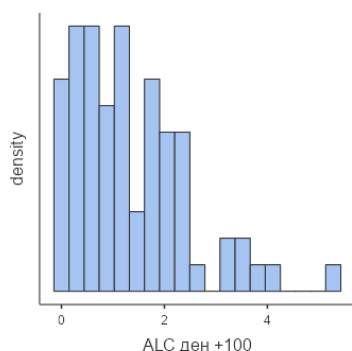
Проследяването на абсолютния лимфоцитен брой в посттрансплантационния период показва положителна тенденция, като средните стойности на лимфоцитите на ден 0 са $0.001 \times 10^9/\text{Л} \pm 0.659$; на ден +30 - $0.49 \times 10^9/\text{Л} \pm 0.67$, на ден +100 - $1.07 \times 10^9/\text{Л} \pm 1.10$, на ден +180 - $1.83 \times 10^9/\text{Л} \pm 1.75$. (фигури 5- 8)



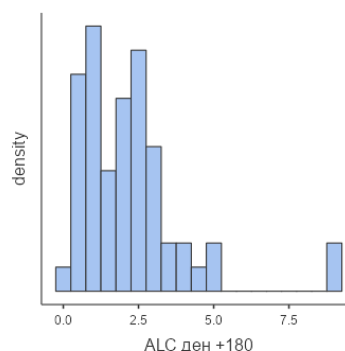
фиг. 5 ALC на ден 0



фиг. 6 ALC на ден 30

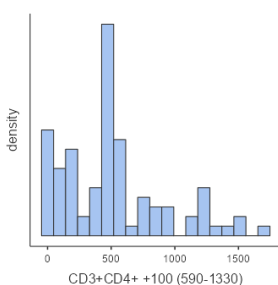


фиг. 7 ALC на ден 100

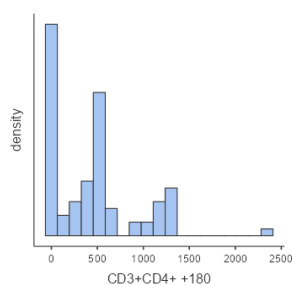


фиг. 8 ALC на ден 180

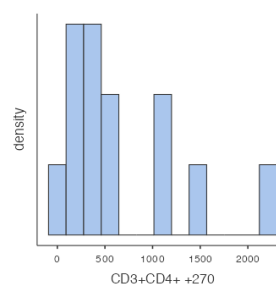
Средните стойности за Т – хелперните популации на ден + 100 са - 480 клетки/ $\mu\text{л} \pm 407$, за ден +180 429 клетки/ $\mu\text{л} \pm 474$, а за ден +270 647 клетки/ $\mu\text{л} \pm 603$. (фигури 9, 10 и 11)



фиг. 9 CD3+CD4+ ден 100

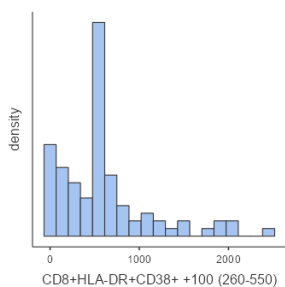


фиг. 10 CD3+CD4+ ден 180

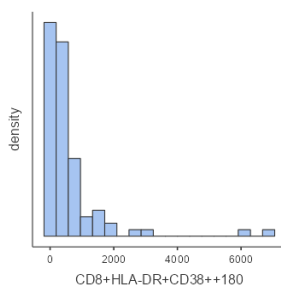


фиг. 11 CD3+CD4+ ден 270

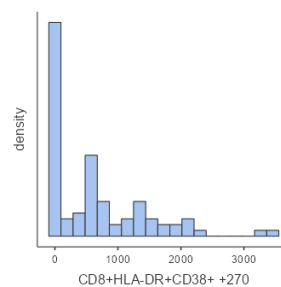
По отношение на активираните цитотоксични популации средните стойности на ден +100 от трансплантацията са съответно 540 клетки/ $\mu\text{л} \pm 523$, на ден +180 479 клетки/ $\mu\text{л} \pm 1070$, а за ден +270 485 клетки/ $\mu\text{л} \pm 776$, съответно. (фигури 12, 13, 14)



фиг.12 CD3+CD8+CD38+ ден 100

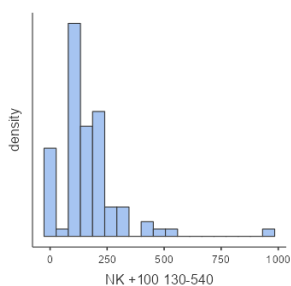


фиг.13 CD3+CD8+CD38+ ден 180

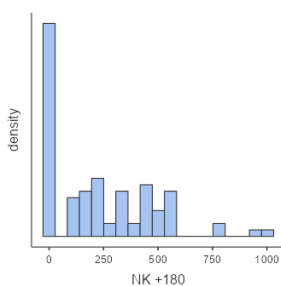


фиг.14 CD3+CD8+CD38+ ден 270

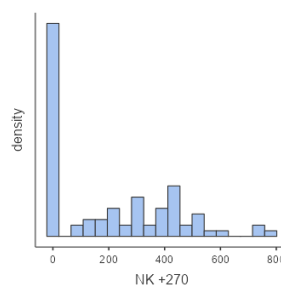
За NK клетъчните популации средните стойности за ден +100 са 135 клетки/ μl ± 135 , за ден +180 – 175 клетки/ μl ± 237 , за ден +270 – 160 клетки/ μl ± 220 , съответно. (фигури 15, 16, 17)



фиг. 15 NK клетки ден 100

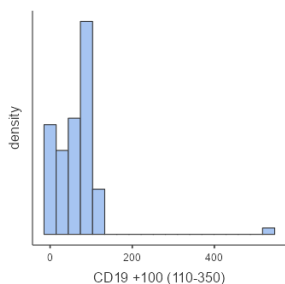


фиг. 16 NK клетки ден 180

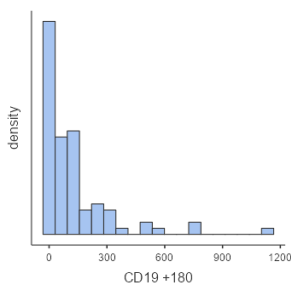


фиг. 17 NK клетки ден 270

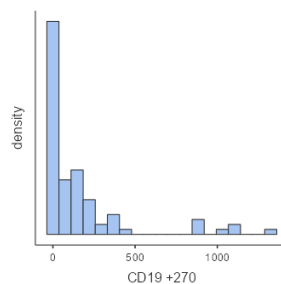
Средните стойности за CD19+ клетките за ден +100 са 67 клетки/ μl ± 62.5 , за ден +180 са 80 клетки/ μl ± 194 , а за ден +270 са 71.5 клетки/ μl ± 282 . (фигури 18, 19, 20)



фиг. 18 CD19+ клетки ден 100



фиг. 19 CD19+ клетки ден 180



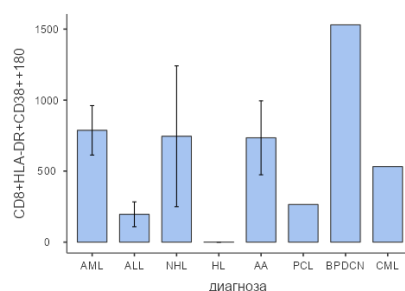
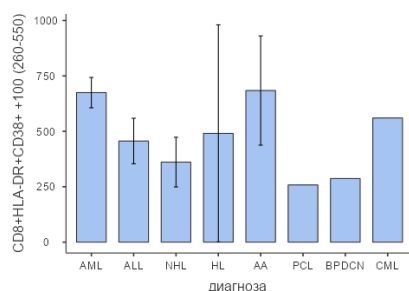
фиг.20 CD19+ клетки ден 270

2. Трансплантационни фактори и възстановяване на имунната система

2.1. Вид диагноза

Чрез корелационен анализ се доказва връзка между диагнозата и възстановяването на определени лимфоцитни субпопулации. Броят на активираните CD3+CD8+CD38+ лимфоцити на ден 100 е по – голям при пациентите с ОМЛ (медиана 549 клетки/ μl ± 503), последвани от пациентите с NHL (медиана 534 клетки/ μl ± 250), спрямо пациентите с остра лимфобластна левкемия – 382 клетки/ μl ± 411 (Spearman's ρ -0.233, $p = 0,028$).

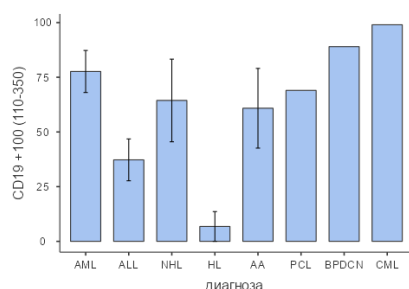
Броят на активираните CD3+CD8+CD38+ лимфоцити на ден 180 е по – голям при пациентите с остра миелоидна левкемия (медиана 543 клетки/ μl ± 1267) и при пациентите с NHL (медиана 432 клетки/ μl ± 1108), спрямо пациентите с остра лимфобластна левкемия (медиана 0 ± 350) Spearman's rho -0.225, p = 0,035. (фигури 21 и 22)



фиг. 21 и фиг. 22 възстановяване на CD3+CD8+CD38+ клетки според диагнозата на ден 100 и ден 180

Корелационна връзка се откри и между стойностите на CD19+ клетките на ден 100 от трансплантацията и някои видове диагнози.

Броят на CD19+ клетките е най – висок при пациентите с ОМЛ (медиана 78 клетки/ μl ± 70) и при пациентите с NHL (медиана 64 клетки/ μl ± 42), спрямо пациентите с остра лимфобластна левкемия (медиана 31 клетки/ μl ± 38) Spearman's rho -0.245, p = 0,021. (фигура 23)

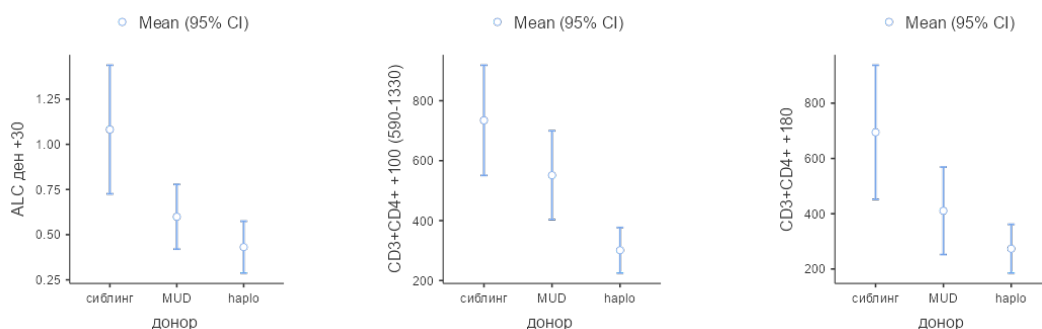


фиг.23 Възстановяване на CD19+ клетки ден 100

2.2. Вид донор

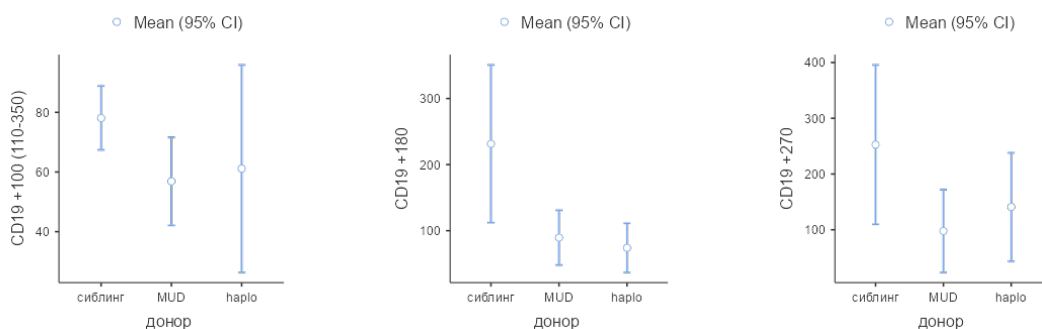
Абсолютният брой на лимфоцитите (ALC) на ден 30 е най – голям при пациентите, трансплантирани с родствен донор 1.08 ± 0.9 , по – малък при пациентите с неродствен донор 0.5990 ± 0.479 и най – малък за пациентите, трансплантирани от хаплоидентичен донор 0.4311 ± 0.370 ($F=6.2371$, $df=2$, $p=0.004$). Броят на CD3+CD4+ на ден 100 е най – голям при пациентите, трансплантирани с родствен донор 735 клетки/ μl ± 465 , по – малък при пациентите с неродствен донор 551 клетки/ μl ± 404 и най – малък за пациентите, трансплантирани от хаплоидентичен донор 301 клетки/ μl ± 207 ($F=12.54$, $df=2$, $p=0.001$).

Броят на CD3+CD4+ на ден 180 е най – голям при пациентите, трансплантирани с родствен донор mean 695 клетки/ μ l $\pm$ 613, по – малък при пациентите с неродствен донор mean 411 клетки/ μ l $\pm$ 431 и най – малък за пациентите, трансплантирани от хаплоидентичен донор 274 клетки/ μ l $\pm$ 240 (F=6.03, df=2, p=0.00). (фигури 23, 24, 25)



фиг. 24 Възстановяване на ALC фиг.25 Възстановяване на CD3+CD4+ фиг. 26 Възстановяване на CD3+CD8+CD38+

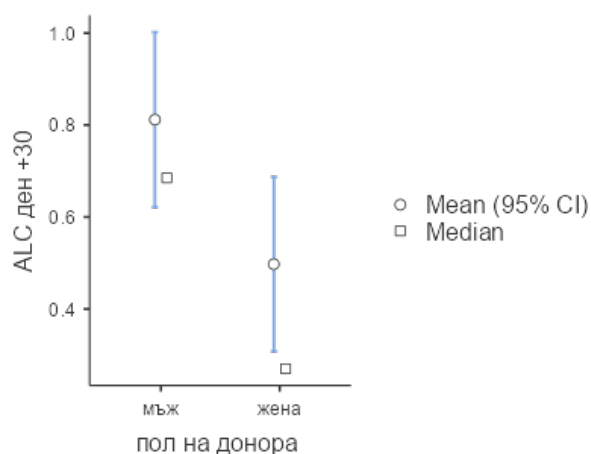
Най – голям брой на CD19+ клетки на ден +180 се установява при пациентите, трансплантирани от родствен донор 231.5 клетки/ μ l $\pm$ 295.2, по – малък при пациентите с неродствен донор 89.5 клетки/ μ l $\pm$ 112.8 и най – малък при пациентите с хаплоидентичен донор 74.1 клетки/ μ l $\pm$ 100.9 (F=6.139, df=2, p=0.003). (фигури 26, 27, 28)



фиг. 27 Възстановяване на CD19+ ден 100 фиг. 28 Възстановяване на CD19+ ден 180 фиг. 29 Възстановяване на CD19+ ден 270

2.3 Пол на донора

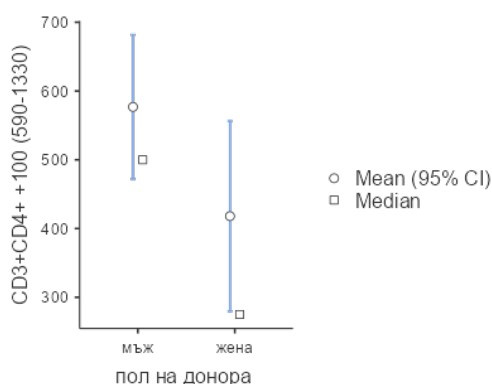
Установи се, че пациентите трансплантирани от донори от мъжки пол имат по – добро възстановяване на (ALC) на ден +30 (Spearman's rho -0.315, p=0.003). (фигура 30)



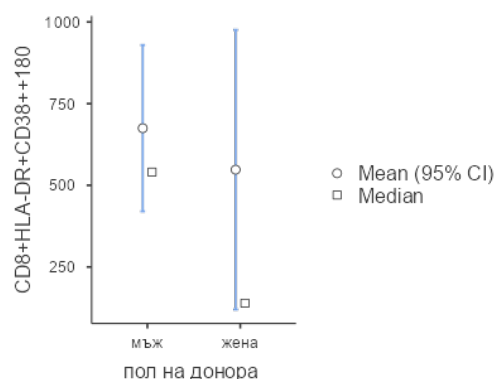
фиг. 30 Възстановяване на ALC според пола на донора

Възстановяването на CD3+CD4+ лимфоцитни субпопулации на ден 100 е по – добро, за пациентите с донор от мъжки пол (Spearman's rho -0.221, p=0.037). (фигура 31)

Възстановяването на CD3+CD8+CD38+ лимфоцитни субпопулации на ден 180 е по – добро, за пациентите с донор от мъжки пол (Spearman's rho -0.215, p=0.044). (фигура 32)



фиг. 31 Възстановяване на CD3+CD4+ на ден 100



фиг.32 Възстановяване на CD3+CD8+CD38+ на ден 180

2.4. Кондициониращи режими и серотерапия

Резултатите от One-Way ANOVA за CD3+CD4+ лимфоцити на ден 100 показват статистически значими различия между някои от кондициониращите режими, което подкрепя твърдението, че кондициониращите режими имат отношение към имунното възстановяване ($F=7.42$, $p = 0.001$). Пост-хок тестът на Tukey разкрива, че пациентите, кондиционирани с FluBuATG имат значително по – ниски средни стойности на CD3+CD4+ популации в сравнение с пациентите, кондиционирани с BuCyATG, с разлика от -349 ($p=0.004$). Освен това, BuCyATG показва значима разлика спрямо TBF-ATG с разлика от 361.1, ($p=0.006$).

One – Way ANOVA				
	F	df1	df2	p
CD3+CD4+ ден 100	7.42	2	68	0.001
CD3+CD4+ ден 180	2.88	2	68	0.063

Таб. 2 Различия в кондициониращите режими

Tukey Post – Hoc Test CD3+CD4+ ден 100				
Режим		FluBu	BuCy	TBF
FluBu	Mean difference	-	-349	12.3
	p – value	-	0.004	0.994
BuCy	Mean difference		-	361.1
	p – value			0.006
TBF	Mean difference			-
	p – value			-

Таб. 3 Post – Hoc анализ – Влияние на кондициониращите режими върху възстановяването на CD3+CD4+

Откриха се статистически значими негативни корелации между пациентите, при които е приложен ATG и възстановяването на някои от лимфоцитните субтипове. На ден 100 от трансплантацията, при пациентите в групата с ATG се наблюдават значително по – ниски нива на CD3+CD4+ популации (Spearman's rho -0.301, p=0.004), като тенденцията се запазва и за ден 180 (Spearman's rho -0.266, p=0.012). По отношение на CD3+CD8+CD38+ клетки на ден 100 се наблюдава корелация, близка до значимата (p=0.055), което е предпоставка за по – задълбочени изследвания. Негативна корелация се откри между групите пациенти с ATG и стойностите на NK клетките на ден 180 (Spearman's rho -0.212, p=0.046) и ден 270 след трансплантацията (Spearman's rho -0.220, p=0.041).

		ATG	CD3+CD4+ +100	CD3+CD4+ +180
ATG	Spearman's rho	—		
	p-value	—		
CD3+CD4+ +100	Spearman's rho	-0.301 **	—	
	p-value	0.004	—	
CD3+CD4+ +180	Spearman's rho	-0.266 *	0.786 ***	—

	ATG	CD3+CD4+ +100	CD3+CD4+ +180
p-value	0.012	< .001	—

Note. * $p < .05$, ** $p < .01$, *** $p < .001$

Таб. 4 Негативна корелация между използването на ATG в кондициониращия режим и възстановяването на CD3+CD4+ клетки на ден 100 и 180

		ATG	NK +100	NK +180	NK +270
ATG	Spearman's rho	—			
	p-value	—			
NK +100	Spearman's rho	-0.145	—		
	p-value	0.179	—		
NK +180	Spearman's rho	-0.212 *	0.726 ***	—	
	p-value	0.046	< .001	—	
NK +270	Spearman's rho	-0.220 *	0.658 ***	0.821 ***	—
	p-value	0.041	< .001	< .001	—

Note. * $p < .05$, ** $p < .01$, *** $p < .001$

Таб. 5 Негативна корелация между използването на ATG в кондициониращия режим и възстановяването на NK клетки на ден 100, 180 и 270.

3. Трансплантационни усложнения и възстановяване на имунната система

По отношение на общия лимфоцитен брой (ALC) на ден 30, регресионните модели не откриха статистически значима корелация с усложненията след трансплантацията. За ден 100, обаче, негативните коефициенти за GVHD и инфекции показват, че тези състояние са свързани с намален брой на ALC. Средният брой на ALC при пациентите без усложнения е 1,61 (95% CI 1,3 – 1,93, $p < 0,001$), за пациентите с GVHD (-1,19, $p = 0,002$), а за пациентите с инфекции (-0,76, $p = 0,032$).

Predictor	Estimate	SE	95% Confidence Interval		t	p	Stand. Estimate
			Lower	Upper			
Intercept ^a	1.617	0.159	1.300	1.9346	10.170	< .001	
Трансплантационни усложнения							

Predictor	Estimate	SE	95% Confidence Interval		t	p	Stand. Estimate
			Lower	Upper			
GVHD	-1.194	0.363	-1.918	-0.4711	-3.293	0.002	-1.082
инфекция	-0.765	0.349	-1.461	-0.0684	-2.190	0.032	-0.693
рецидив	0.138	0.379	-0.617	0.8933	0.365	0.716	0.125
Н.усложнения	-0.681	0.616	-1.909	0.5478	-1.105	0.273	-0.617
GVHD + инфекция – живи	-1.107	1.043	-3.187	0.9726	-1.062	0.292	-1.004

^a Represents reference level- живи

Таб. 6 Регресионен модел – ALC ден 100 от трансплантацията

Резултатите от регресионния модел показват, че средният брой на CD3+CD4+ клетки на ден 100 от трансплантацията при пациентите без усложнения е 786 клетки/ μ l. Наличието на негативни коефициенти за различните трансплантационни усложнения – GVHD (-531, $p < 0.001$), инфекции (-536, $p < 0.001$), рецидив (-348, $p < 0.003$) и неинфекциозни усложнения (-612, $p < 0.001$) индикират, че тези състояния са свързани с по-ниски нива на CD3+CD4+ клетки и подчертават, че намаляването на броя им е свързано с клинично влошаване на пациентите.

Predictor	Estimate	SE	95% Confidence Interval		t	p	Stand. Estimate
			Lower	Upper			
Intercept	786	49.4	688	884	15.907	< .001	
Трансплантационни усложнения:							
GVHD	-531	101.7	-733	-329	-5.224	< .001	-1.305
инфекция	-536	98.8	-733	-340	-5.426	< .001	-1.318
рецидив	-348	112.7	-572	-123	-3.085	0.003	-0.854
Н.усложнения	-612	117.6	-846	-378	-5.200	< .001	-1.504
GVHD + инфекция	-316	324.1	-961	328	-0.976	0.332	-0.777

^a Represents reference level-пациенти без усложнения

Таб. 7 Регресионен модел – CD3+CD4+ ден 100 от трансплантацията

Средният брой на CD3+CD4+ клетки на ден 180 от трансплантацията при пациентите без усложнения е 768 клетки/ μ l, като по – ниските нива на тези клетъчни популации корелират с трансплантационните усложнения – GVHD (-741, $p < 0.001$), инфекции (-620, $p < 0.001$), рецидив (-450, $p < 0.001$) и неинфекциозни усложнения (-583, $p < 0.001$).

Predictor	Estimate	SE	95% Confidence Interval		t	p	Stand. Estimate
			Lower	Upper			
Intercept ^a	768	56.4	656	880	13.635	< .001	
Трансплантационни усложнения							
GVHD	-741	115.9	-972	-511	-6.395	< .001	-1.565
инфекция	-620	112.7	-844	-396	-5.504	< .001	-1.310
рецидив	-450	128.5	-706	-194	-3.501	< .001	-0.950
Н.усложнения	-583	134.1	-850	-316	-4.345	< .001	-1.231
GVHD + инфекция	-348	369.5	-1083	387	-0.943	0.349	-0.736

^a Represents reference level- пациенти без усложнения

Таб. 8 Регресионен модел – CD3+CD4+ ден 180 от трансплантацията

Особено важен е високият коефициент за GVHD, който индикира, че при това усложнение се наблюдават най – ниските стойности на CD3+CD4+ клетки и компрометира благополучния изход от трансплантацията.

По отношение на стойностите на CD3+CD8+ CD38+ популации на ден 100, ден 180 и ден 270 също се установиха статистически значими корелации с трансплантационните усложнения. От направения анализ става ясно, че най – високи средни стойности за CD3+CD8+CD38+ клетки на ден 100 (900 клетки/ μ l) се установяват при пациентите с GVHD ($\rho = -0.375$, $p = 0.001$) като това води до негативна промяна в клиничната картина на пациентите. Подобни резултати се наблюдават за CD3+CD8+CD38+ клетки на ден 180 и ден 270.

	Трансплантационни усложнения	N	Ср.аритм	Медиана	Стнд.откл.	Min	Max
CD8+ CD38+ 100 ($\rho = -0.375$, $p = 0.001$)	Пациенти без усложнения	42	677.7	548.5	419	71	2100
	GVHD	13	877.2	900	768	0	2450
	инфекция	14	492.8	346.5	552	0	1958
	рецидив	10	338.2	230.0	213	128	700
	неинфекциозни усложнения	9	168.2	0	313	0	860
	GVHD + инфекция;	1	1534.0	1534	NaN	1534	1534
CD8+ CD38+180 ($\rho = -0.494$, $p = 0.001$)	Пациенти без усложнения	42	942.6	549.0	1122	139	6867
	GVHD	13	123.8	0	402	0	1453
	инфекция	13	271.3	0	367	0	867
	рецидив	10	764.5	117.5	1863	0	6030

	Трансплантационни усложнения	N	Ср.аритм	Медиана	Стнд.откл.	Min	Max
CD8+ CD38+ 270 (rho=-0.643, p=0.001)	неинфекциозни усложнения	9	144.8	0	306	0	865
	GVHD + инфекция;	1	1645.0	1645	NaN	1645	1645
	Пациенти без усложнения	41	1107.7	870	684	210	3214
	GVHD	13	0.0	0	0	0	0
	инфекция	14	243.3	0.0	512	0	1567
	рецидив	10	502.4	85.0	1063	0	3457
	неинфекциозни усложнения	9	87.3	0	262	0	786
	GVHD + инфекция;	1	471.0	471	NaN	471	471

Таб. 9 Корелационен модел за CD3+CD8+ и трансплантационните усложнения на ден 100, 180 и 270 от трансплантацията

Резултатите от регресионния модел за CD3+CD8+CD38+ популации на ден 100 показват интересна динамика в зависимост от различните трансплантационни усложнения. Средната стойност на CD3+CD8+ CD38+ клетки за пациентите без усложнения в 678 клетки/ μ l (95% CI 529 – 826 клетки/ μ l). Негативните коефициенти за рецидив (-340) и неинфекциозни усложнения (-509) са статистически значими (p=0.049 и p=0.005, съответно), което се свързва с по – нисък брой на този подвид клетъчна популация.

Predictor	Estimate	SE	95% Confidence Interval		t	p	Stand. Estimate
			Lower	Upper			
Intercept ^a	678	74.6	529	826.13	9.08	< .001	
Трансплантационно усложнение							
GVHD	199	153.5	-106	504.71	1.30	0.197	0.381
инфекция	-185	149.2	-482	111.90	-1.24	0.219	-0.354
рецидив	-340	170.2	-678	-1.08	-2.00	0.049	-0.649
Н.усложнения	-509	177.6	-863	-156.19	-2.87	0.005	-0.974
GVHD + инфекция	856	489.3	-117	1829.51	1.75	0.084	1.638

^a Represents reference level-пациенти без усложнения

Таб. 10 Регресионен модел CD3+CD8+ клетки на ден 100 от трансплантацията

Регресионният анализ на CD3+CD8+CD38+ клетки на ден 180 от трансплантацията показва значителна обратна връзка между нивата на клетките и различните усложнения. Средната стойност на CD3+CD8+ CD38+ клетки за пациентите без усложнения е 943 клетки/ μ l (95% CI 626-1259). Негативните коефициенти за GVHD (-819), инфекция (-671) и неинфекциозни усложнения (-798), са статистически значими ($p=0.014$, $p=0.043$ и $p=0.038$, съответно), което подсказва, че тези усложнения са свързани с по-ниски нива на CD3+CD8+CD38+ клетки.

Predictor	Estimate	SE	95% Confidence Interval		t	p	Stand. Estimate
			Lower	Upper			
Intercept ^a	943	159	626	1259.1	5.925	< .001	
Трансплантационни усложнения							
GVHD	-819	327	-1470	-167.8	-2.502	0.014	-0.765
инфекция	-671	327	-1322	-20.3	-2.051	0.043	-0.627
рецидив	-178	363	-900	543.6	-0.491	0.625	-0.166
Н.усложнения	-798	379	-1551	-44.5	-2.107	0.038	-0.746
GVHD + инфекция	702	1043	-1373	2777.7	0.673	0.503	0.656

^a Represents reference level

Таб. 11 Регресионен модел CD3+CD8+ клетки на ден 180 от трансплантацията

Резултатите от регресионния модел за CD3+CD8+CD38+ популации на ден +270 показват значителна негативна връзка между нивата на клетките и различните трансплантационни усложнения. Средната стойност на CD3+CD8+CD38+ клетки за пациентите без усложнения е 1108 клетки/ μ l (95% CI 911 – 1304). Негативните коефициенти за GVHD (-1108), инфекции (-864), рецидив (-605) и неинфекциозни усложнения (-1020) са статистически значими - $p<0.001$, $p<0.001$, $p=0.008$ и $p<0.001$, съответно. Тези данни доказват, че трансплантационните усложнения допринасят за имунната дисфункция и влошаване на имунния отговор.

Predictor	Estimate	SE	95% Confidence Interval		t	p	Stand. Estimate
			Lower	Upper			
Intercept ^a	1108	98.9	911	1304	11.202	< .001	
Трансплантационни усложнения							
GVHD	-1108	201.5	-1509	-707	-5.496	< .001	-1.428

Predictor	Estimate	SE	95% Confidence Interval		t	p	Stand. Estimate
			Lower	Upper			
инфекция	-864	196.0	-1254	-475	-4.410	< .001	1.115
рецидив	-605	223.3	-1050	-161	-2.711	0.008	0.781
Н.усложнения	-1020	233.1	-1484	-557	-4.378	< .001	1.316
GVHD + инфекция	-637	640.9	-1912	638	-0.994	0.323	0.821

^a Represents reference level

Таб. 12 Регресионен модел CD3+CD8+ клетки на ден 270 от трансплантацията

Значима негативна корелационна зависимост се откри и за НК клетъчните популации на ден 100 от трансплантацията и трансплантационните усложнения. Средната стойност на НК клетките при пациентите без усложнения е 245 клетки/ μ l (95% CI 209 – 280,4). Негативните коефициенти за GVHD (-139, $p < 0.001$), инфекциозни усложнения (-130, $p < 0.001$), рецидив (-124, $p = 0.003$) и неинфекциозни усложнения (-204, $p < 0.001$) се свързват с по – ниските нива на тази клетъчна популация.

Predictor	Estimate	SE	95% Confidence Interval		t	p	Stand. Estimate
			Lower	Upper			
Intercept ^a	245	18.0	209	280.4	13.60	< .001	
Трансплантационни усложнения:							
GVHD	-139	36.7	-212	-66.0	-3.79	< .001	-1.027
инфекция	-130	36.7	-203	-57.0	-3.55	< .001	-0.961
рецидив	-124	40.6	-205	-43.2	-3.05	0.003	-0.917
Н.усложнения	-204	42.4	-289	-119.8	-4.81	< .001	-1.509
GVHD + инфекция	-126	116.6	-358	106.4	-1.08	0.285	-0.928

^a Represents reference leve

Таб. 13 Регресионен модел НК клетки на ден 100 от трансплантацията

Статистическа значимост се откри и при броя на НК клетките на ден 180 и 270 от трансплантацията, като средните стойности на тази популация за пациентите без усложнения е 379 клетки/мкл за ден 180 (95% CI 321 – 436,5) и 355 клетки/ μ l (95% CI 304 – 406,1).

Predictor	Estimate	SE	95% Confidence Interval		t	p	Stand. Estimate
			Lower	Upper			
Intercept ^a	379	29.0	321	436.5	13.082	< .001	
Трансплантационни Усложнения							
GVHD	-337	59.6	-455	-218.2	-5.653	< .001	-1.419
инфекция	-308	57.9	-423	-192.3	-5.309	< .001	-1.296
рецидив	-170	66.0	-301	-38.2	-2.568	0.012	-0.715
Н.усложнения	-327	68.9	-464	-189.9	-4.743	< .001	-1.378
GVHD + инфекция	-169	189.9	-547	208.8	-0.889	0.376	-0.712

^a Represents reference level- живи

таб. 14 Регресионен модел NK клетки на ден 180 от трансплантацията

Predictor	Estimate	SE	95% Confidence Interval		t	p	Stand. Estimate
			Lower	Upper			
Intercept ^a	355	25.7	304	406.1	13.814	< .001	
Трансплантационни усложнения:							
GVHD	-355	52.4	-459	-250.8	-6.778	< .001	-1.612
инфекция	-260	50.9	-361	-158.4	-5.100	< .001	-1.180
рецидив	-154	60.6	-275	-33.8	-2.547	0.013	-0.701
Н.усложнения	-344	60.6	-464	-223.3	-5.677	< .001	-1.562
GVHD + инфекция	-141	166.5	-472	190.4	-0.846	0.400	-0.640

^a Represents reference level- живи

таб. 15 Регресионен модел NK клетки на ден 270 от трансплантацията

Регресионните модели за CD19+ клетките на ден 100, 180 и 270 след трансплантацията, също показаха значима негативна връзка между нивата на тази лимфоцитна популация и усложненията. Средният брой CD19+ клетки при пациентите без усложнения на ден 100 (91 клетки/ μ l, 95% CI 8,86 – 73,9), на ден 180 (215 клетки/ μ l, 95% CI 161 – 270,1) и на ден 270 (321 клетки/ μ l, 95% CI 245 – 397). Данните насочват, че трансплантационните усложнения също повлияват неблагоприятно В-клетъчния компартмент в посттрансплантационния период.

Predictor	Estimate	SE	95% Confidence Interval		t	p	Stand. Estimate
			Lower	Upper			
Intercept ^a	91.5	8.86	73.9	109.1	10.330	< .001	
Трансплантационни усложнения							
GVHD	-56.7	18.22	-92.9	-20.4	-3.110	0.003	-0.906
инфекция	-53.8	17.72	-89.0	-18.6	-3.036	0.003	-0.861
рецидив	-28.6	20.20	-68.8	11.6	-1.416	0.161	-0.458
Н.усложнения	-69.1	21.09	-111.0	-27.1	-3.275	0.002	-1.105
GVHD + инфекция	20.5	58.08	-95.0	136.0	0.353	0.725	0.328

таб. 16 Регресионен модел CD19+ клетки на ден 100 от трансплантацията

Predictor	Estimate	SE	95% Confidence Interval		t	p	Stand. Estimate
			Lower	Upper			
Intercept ^a	215	27.5	161	270.129	7.835	< .001	
Трансплантационни усложнения							
GVHD	-185	56.6	-298	-72.695	3.275	0.002	-0.954
инфекция	-196	56.6	-308	-83.464	3.465	< .001	-1.009
рецидив	-126	62.7	-250	-0.902	2.004	0.048	-0.647
Н.усложнения	-170	65.5	-300	-39.448	2.592	0.011	-0.874
GVHD + инфекция	-128	180.3	-487	230.244	0.712	0.478	-0.662

^a Represents reference level-живи

таб. 17 Регресионен модел CD19+ клетки на ден 180 от трансплантацията

Predictor	Estimate	SE	95% Confidence Interval		t	p	Stand. Estimate
			Lower	Upper			
Intercept ^a	321	38.3	245	397	8.38	< .001	
Трансплантационни усложнения							
GVHD	-321	78.1	-476	-166	4.11	< .001	-1.137
инфекция	-293	75.9	-444	-141	3.85	< .001	-1.036
рецидив	-280	86.5	-452	-108	3.24	0.002	-0.992
Н.усложнения	-310	90.3	-489	-130	3.43	< .001	-1.097

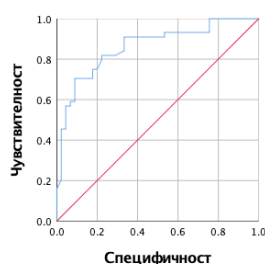
Predictor	Estimate	SE	95% Confidence Interval		t	p	Stand. Estimate
			Lower	Upper			
GVHD + инфекция	-306	248.3	-800	188	-1.23	0.221	-1.084

^a Represents reference level- живи

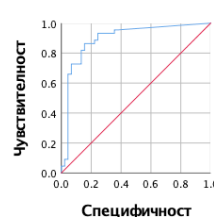
таб. 18 Регресионен модел CD19+ клетки на ден 270 от трансплантацията

4. Връзка между имунното възстановяване и общата преживяемост

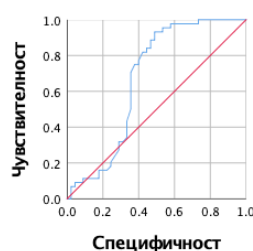
С помощта на ROC анализ се установиха cut-off стойности на лимфоцитните субпопулации на ден 100 и ден 180. Всяка стойност има 90% чувствителност и 70% специфичност.



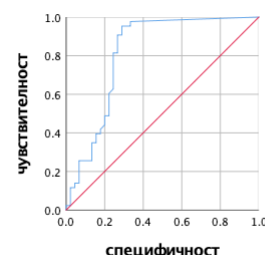
фиг. 33 CD3+CD4+ ден 100 AUC 0,86; p= 0,000, 95% CI 0,78 – 0,93



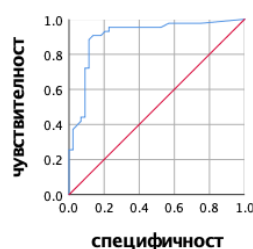
фиг.34 CD3+CD4+ ден 180 AUC 0,89; p=0,000, 95% CI 0,82 – 0,96



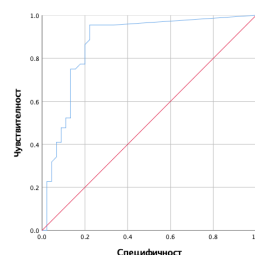
фиг.35 CD3+CD8+CD38+ ден 100 AUC 0,67; p= 0,005, 95%CI 0,55 – 0,79



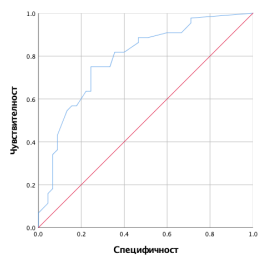
фиг.36 CD3+CD8+CD38+ ден 180 AUC 0,81; p=0,000, 95% CI 0,71 – 0,91



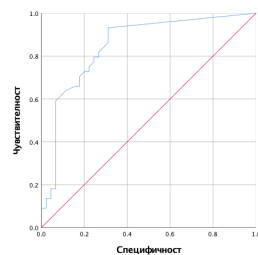
фиг.37 NK клетки на ден 100 AUC 0,90; p=0,000, 95% CI 0,83 – 0,97



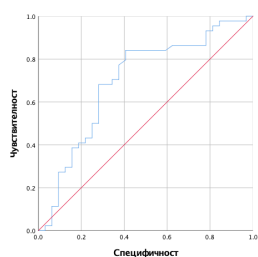
фиг.38 NK клетки на ден 180 AUC 0,87; p=0,000, 95% CI 0,79 – 0,95



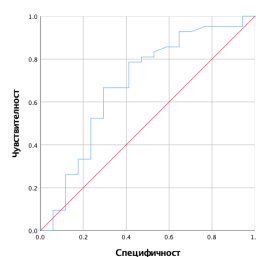
фиг. 39 CD19+ клетки на ден 100 AUC 0,78; $p=0,000$, 95% CI 0,69 – 0,88



фиг.40 CD19+ клетки на ден 180 AUC 0,84; $p=0,000$, 95% CI 0,76 – 0,93



фиг. 41 ALC на ден 100 AUC 0,69; $p=0,004$, 95% CI 0,57 – 0,82

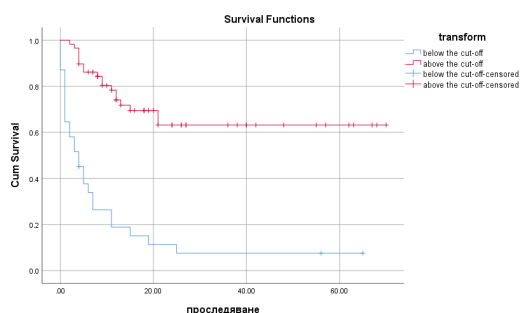


фиг. 42 ALC на ден 180 AUC 0,68; $p=0,031$, 95% CI 0,51 – 0,84

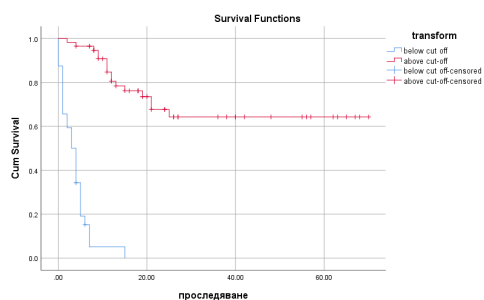
Лимфоцитна популация	Cut – off Ден 100	Cut – off Ден 180
CD3+CD4+	375 клетки/ μl	128 клетки/ μl
CD3+CD8+ CD38+	532 клетки/ μl	284 клетки/ μl
NK	128 клетки/ μl	112 клетки/ μl
CD19+	66 клетки/ μl	49 клетки/ μl
ALC	$1.04 \times 10^9/\text{L}$	$1.07 \times 10^9/\text{L}$

Таб. 19 Cut – off стойности на лимфоцитните субпопулации на ден 100 и ден 180 от ало - СКТ

По отношение на пациентите с CD3+CD4+ на ден 100 <375 клетки/ μl имат по – малка преживяемост - 12,9%, в сравнение с пациентите, които имат >375 клетки/ μl - 69% ($p=0.000$). Пациентите със стойности на CD3+CD4+ на ден 128 <284 клетки/ μl имат по – малка преживяемост 9.4%, спрямо пациентите със стойности > 284 клетки/ μl – 71.9% ($p=0.000$).

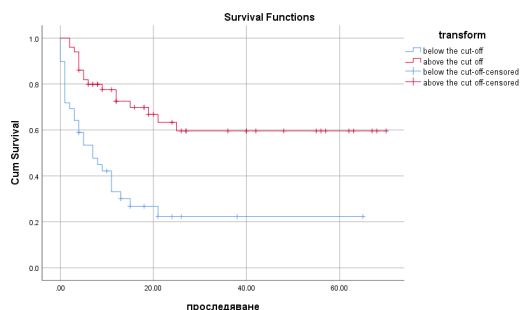


Фиг. 43 OS и CD3+CD4+ ден 100, cut-off 375 клетки/мкл

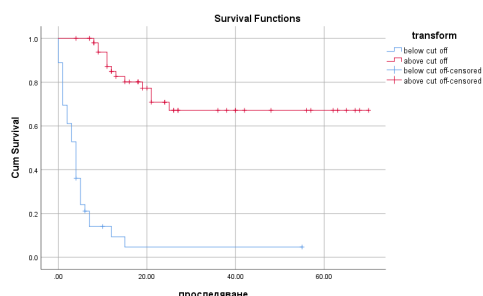


фиг. 44 OS и CD3+CD4+ ден 180, cut-off 284 клетки/мкл

Възстановяването на CD3+CD8+HLA-DR+CD38+ клетъчни популации ден 100 оказва влияние и върху преживяемостта. Пациентите със стойности < 532 клетки/мкл имат значително по – ниска преживяемост 28.2%, в сравнение с пациентите със стойности на CD3+CD8+HLA-DR+CD38+ > 532 клетки/ μ l 66% ($p=0.005$). Подобен резултат се наблюдава и за ден 180 от трансплантацията. Пациентите със стойности < 284 клетки/ μ l имат по – малка преживяемост 11.1%, спрямо пациентите със стойности > 284 клетки/ μ l – 75% ($p=0.000$).

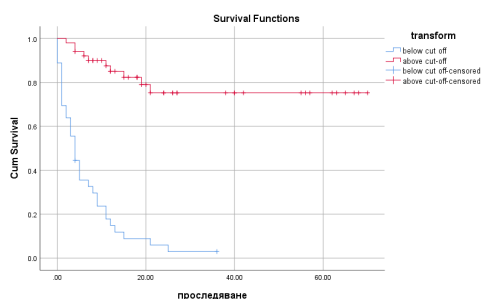


фиг. 45 OS и CD3+CD8+CD38+ ден 100, cut – off 532 клетки/мкл

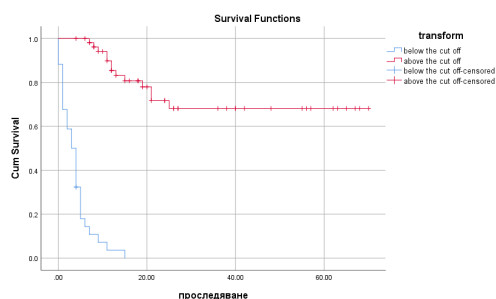


фиг. 46 OS и CD3+CD8+CD38+ ден 180, cut – off 284 клетки/мкл

По отношение на стойностите на NK клетките се установиха статистически значими разлики в преживяемостта на пациентите на ден 100 и 180 от трансплантацията. Пациентите със стойности на NK клетките на ден 100 < 128 клетки/ μ l имат по – малка обща преживяемост - 5.6% , спрямо пациентите със стойности > 128 клетки/ μ l – 80.4% ($p=0.000$). Подобен резултат се наблюдава и за ден 180 след трансплантацията. Пациентите със стойности на NK клетките < 112 клетки/ μ l имат значително по – малка преживяемост 5.9%, спрямо пациентите със стойности > 112 клетки/ μ l – 76.4% ($p=0.000$).

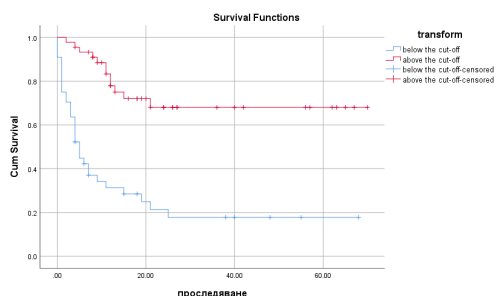


фиг. 47 OS и NK клетки ден 100, cut – off 128 клетки/мкл

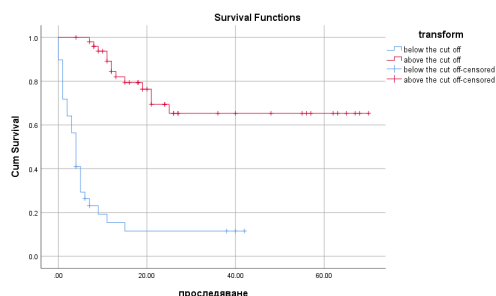


фиг. 48 OS и NK клетки ден 180, cut – off 112 клетки/мкл

От проведения анализ се установи, че пациентите със стойности на CD19+ клетки < 66 клетки/ μl на ден 100 след трансплантацията, имат по – малка обща преживяемост- 25%, спрямо пациентите със стойности > 66 клетки/ μl – 73.3% ($p=0.000$). Подобен статистически значим резултат се установи и за стойностите на CD19+ клетки за ден 180. Пациентите със стойности < 49 клетки/ μl имат по – малка обща преживяемост – 17.9%, спрямо пациентите със стойности > 49 клетки/ μl – 74% ($p=0.000$).

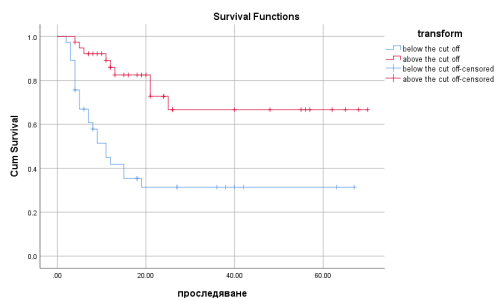


фиг. 49 OS и CD19+ клетки на ден 100, cut – off 66 клетки/мкл

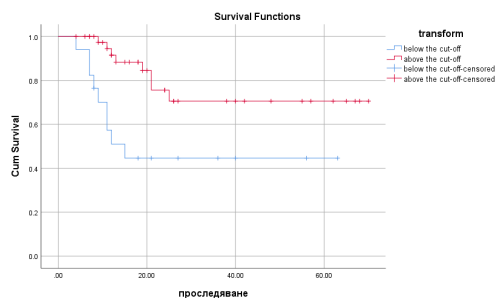


фиг. 50 OS и CD19+ клетки ден 180, cut – off 49 клетки/мкл

Анализът на ALC на ден 100 и 180 след трансплантацията показва, че пациентите със стойности на ALC на ден 100 $> 1.05 \times 10^9/\text{L}$ имат по – голяма обща преживяемост, в сравнение с пациентите, при които са установени по – ниски стойности, съответно 76.9% спрямо 37.8% ($p=0.04$).



фиг. 51 OS и ALC на ден 100, cut – off $1.05 \times 10^9/\text{L}$



фиг. 52 OS и ALC ден 180, cut – off $1.08 \times 10^9/\text{L}$

По – голяма обща преживяемост се наблюдава на ден 180 за пациентите с ALC $> 1.08 \times 10^9/\text{L}$, спрямо пациентите с по – ниски стойности, съответно 81% спрямо 47.1% ($p=0.031$).

VI. Дискусия на резултатите

Имунното възстановяване (ИВ) след ало – СКТ е динамичен и многокомпонентен процес, който зависи от множество фактори, свързани със самата трансплантация и от усложненията, които тази терапевтична опция може да причини на пациентите. Ефективното възстановяване на вродения и адаптивния имунитет е от съществено значение за благоприятния изход от трансплантацията. В настоящото проучване изследвахме динамиката на лимфоцитната репопулация в реципиентите след ало – СКТ и проследихме влиянието на някои трансплантационни фактори и усложнения върху нейното възстановяване. Нашите резултати допълват съществуващите в литературата данни и подчертават важността на всеки отделен фактор, свързан с ИВ като се демонстрират специфични корелации между лимфоцитните субкласове в различни времеви периоди. В своето проучване Zhao и сътрудници установяват, че динамиката на имунното възстановяване, в частност на бързото възстановяване на CD8⁺ лимфоцитите, е от съществено значение за реализиране на GVL ефекта при пациенти с остра миелоидна левкемия (1). Подобно на нашите резултати, други автори също са установили по – бързо възстановяване на CD8⁺ в популация от пациенти с ОМЛ като е доказана корелация с подобрена преживяемост и с по – ниска честота на инфекциозни усложнения (2,3). Изборът на донор за ало – СКТ играе важна роля в имунното възстановяване, тъй като всеки тип донор (родствен, неродствен, хаплоидентичен) притежава уникални характеристики, които имат отношение към функционалността на имунната система в посттрансплантационния период. Поради моделите на унаследяване на HLA хаплотипите при близките родственици съществува 50% вероятност за хаплотипно съвпадение. В резултат на това, при пациентите, които се нуждаят от трансплантация, има над 90% шанс да се открие подходящ донор (4). Въпреки това, значителното несъответствие в HLA алелите между донора и реципиента води до двупосочна алореактивност GVH и HVG (5), медирана основно от Т – лимфоцитите. Поради тази причина са разработени различни трансплантационни платформи, насочени към модулиране на Т – клетъчната функция с цел намаляване на страничните имунологични усложнения: 1. висока доза посттрансплантационен Циклофосфамид, 2. Ex vivo Т – клетъчна деплация в комбинация с мегадоза ХСК, 3. GIAC протоколът, който включва използване на интензифицирана имуносупресия чрез калцийневринов инхибитор, Микофенолат мофетил, кратък курс Метотрексат, използване на ATG в кондициониращия режим и комбинирано използване на ХСК от периферна кръв и

костен мозък с предварителна G-CSF стимулация на донора (6–8). В нашето проучване, се установи статистически значима разлика във възстановяването на някои лимфоцитни субпопулации в зависимост от типа донор. Пациентите, трансплантирани от напълно съвместим родствен донор имат по – добро възстановяване на ALC на ден 30, CD3+CD4+ клетки на ден 100 и 180 и CD19 клетки на ден 180, спрямо пациентите трансплантирани от неродствен донор и хаплоидентичен донор. Подобни резултати са установени и при други проучвания (9,10), при които се изтъква връзката между типа донор, развитието на GVHD и влиянието на тези фактори върху честотата на инфекциозните усложнения и имунното възстановяване.

Полът на донора също оказва влияние върху възстановяването на имунната система след ало – СКТ. Според повечето литературни източници, използването на донори от женски пол за реципиенти от мъжки пол се асоциира с повишена честота на cGVHD и понижена обща преживяемост (11–13). В нашето проучване установихме, че при реципиентите, трансплантирани от донори от мъжки пол, се наблюдава по – добро възстановяване на лимфоцитите, спрямо реципиентите, трансплантирани от донори от женски пол. Реципиентите от донори мъже имат по – добро възстановяване на ALC на ден 30 (Spearman's rho -0.315, $p=0.003$), по – добро възстановяване на CD4+ лимфоцитите на ден 100 (Spearman's rho -0.221, $p=0.037$) и по – добро възстановяване на CD8+ лимфоцитите на ден 180 (Spearman's rho -0.215, $p=0.044$). Servais et al. показват, че донорите мъже осигуряват по – стабилно имунно възстановяване, в сравнение с донорите от женски пол, което би могло да се дължи на хормонални различия и генетични фактори, свързани с X хромозомата (14). Установено е, че полът на донора оказва влияние и върху тимопоезата след трансплантацията, необходима за генерирането на нови Т – клетъчни клонове. Добре известен факт е, че тимусът проявява полово – зависими разлики във функцията си, които могат да повлияят на цялостния процес на имунно възстановяване (15).

Интензитетът на кондициониращите режими също е безспорен фактор, който влияе върху имунното възстановяване. Тези режими съчетават различни класове химиотерапевтици с или без целотелесно облъчване (TBI) като основната им цел е да осигурят достатъчна имunosупресия, за предотвратяване на отхвърлянето на присадката и едновременно с това да елиминират остатъчното заболяване. В нашето проучване преобладават миелоаблативните, флударабин – базирани режими. Флударабинът е пуринов аналог, притежаващ мощни имunosупресивни свойства, които без съмнение оказват влияние върху ИВ в посттрансплантационния период. Пациентите, кондиционирани с FluBu, имат значително по – ниски средни стойности на CD3+CD4+

лимфоцитите на ден 100 и ден 180 от трансплантацията, в сравнение с тези, кондиционирани с BuCy ($p=0.004$). В своето проучване, Mager et al., изследват фармакокинетичния профил на пуриновия аналог като доказват, че експозицията към Флударабин индуцира апоптоза както на CD4⁺ лимфоцитите, така и на CD8⁺ лимфоцитите. Този ефект води до редуциране на Т – клетъчния компармент и респективно забавя ИВ. Това проучване индикира, че независимо от имуносупресивните свойства на Флударабина, неговото негативно въздействие върху жизнеспособността на Т – клетките трябва внимателно да се вземе предвид в контекста на ИВ (16). Като цяло данните от литературата относно използването на Флударабин – базирани режими са противоречиви. Проучването на Ju et al. подкрепя факта, че използването на Флударабин, особено в комбинация с Бусулфан, води до намалена посттрансплантационна токсичност спрямо BuCy. Освен това, тази комбинация е показала значими резултати по отношение на прихващането, честотата на GVHD и имунното възстановяване, което индикира, че имуносупресивните свойства на пуриновия аналог могат да бъдат ефективно използвани за минимизиране на екстрамедуларната токсичност, постига се имуноаблация като и същевременно се подпомага процесът на прихващане (17). От друга страна, в своето фаза 3 проучване, Lee et al. демонстрират по – висока честота на рецидивите, за пациентите, кондиционирани с FluBu и по – добра 2 – годишна обща преживяемост, свободна от рецидив преживяемост и свободна от събития преживяемост, за пациентите кондиционирани с BuCy (18).

В клиничната практика като предпочитан източник на ХСК за трансплантация, особено при възрастни пациенти, се използва периферната кръв. Добивът на клетките е безопасен за донора, а самата присадка позволява по – бързо прихващане, намалява честотата на рецидиви и има по – силно изразен GVL ефект, поради десетократно по – големия брой Т – клетки в сравнение с костно – мозъчните присадки. Основен недостатък при използването на периферни ХСК е високата честота на остра и хронична форма GVHD. Поради това се е наложило използването на т.нар *in vivo* Т – клетъчна деплеция, която цели да намали честотата на този вид усложнение. В практиката най – често използваните методи за осъществяване на *in vivo* деплецията са използването на ATG и РТСу. Въпреки добре известното въздействие на ATG върху имунните клетки, данните за ефекта му върху имунното възстановяване след ало – СКТ са оскъдни (19,20). Данните от нашето проучване показват, че използването на ATG в кондициониращия режим оказва негативен ефект върху възстановяването на CD3⁺CD4⁺ популации на ден 100 (Spearman's ρ -0.301, $p=0.004$) като тенденцията се запазва и за ден 180 (Spearman's

ρ -0.266, $p=0.012$). Същият ефект се наблюдава за НК - клетки на ден 180 (Spearman's ρ -0.212, $p=0.046$) и ден 270 (Spearman's ρ -0.220, $p=0.041$). Други автори също са установили, че при пациентите, получили ATG в кондиционирането се наблюдава по - малък брой на CD4+ и CD8+ субпопулациите в първите месеци след трансплантацията, като тази тенденция се запазва до първата година (21). По отношение на използването на посттрансплантационен Циклофосфамид (PTCy), в нашето проучване, не се откриха значими корелационни зависимости с възстановяването на лимфоцитните популации. Най – вероятно, това се дължи на малкия брой пациенти, които са включени в анализа. В литературата съществуват оскъдни доказателства за влиянието на Циклофосфамид върху ИВ (22,23). В своето проучване Espinoza – Gutarra et al изследват влиянието на PTCy върху 89 реципиенти на ХСК от хаплоидентичен или MUD донор, като сравняват имунното им възстановяване с това на 48 пациенти, трансплантирани от напълно съвместими родствени донори, без PTCy (24). Резултатите показват, че използването на PTCy води до по – забавено възстановяване на Т-, В- и НК клетките в посттрансплантационния период като тази тенденция е наблюдавана до първата година след трансплантацията. Тези наблюдения насочват, че освен приложената имunosупресия, вида на донора също влиза в съображение. Други автори са сравнили двете имunosупресивни платформи ATG срещу PTCy като докладват по – бързо възстановяване на CD8+ клетките и НК клетките при пациенти, получили ATG, а по – бързо възстановяване е установено за CD4+ и CD19+ популациите, при пациентите, получили PTCy. Тези различия довели до по – голям процент инфекциозни усложнения при реципиентите в рамото с PTCy без това да е оказало разлика в преживяемостта между двете групи пациенти (25).

Въпреки провежданата профилактика, честотата на острата форма GVHD остава висока и варира между 35% и 80% (26), а на хроничната форма GVHD между 30% и 60% (27). От една страна агресивната профилактика и лечение на GVHD компрометира възстановяването на адаптивния имунитет (28), а от друга самата GVHD директно потиска *de novo* генерирането на Т – клетките (29). Установено е, че етиологията на ИВ в комбинация с GVHD е многофакторна и вероятно се дължи както на пряк ефект върху тимопоезата, така и на изменения в периферния Т – клетъчен компартмент. В нашето проучване установихме, че при пациентите с GVHD се наблюдават по – ниски нива на CD3+CD4+ клетките на ден 100 и 180 и CD3+CD8+ клетките на ден 180 и 270. Нещо повече, в регресионния модел предиктора GVHD е с много висок коефициент, който индикира, че при това усложнение се наблюдават най – ниските стойности на тези популации, в сравнение с другите усложнения. В литературата е известно, че GVHD

води до дисрегулация в диференциацията на TREGs популации, а променената цитокинова среда допринася за слабото възстановяване на лимфоцитния компартмент (30). В проучването на Lin M. et al също се откриват сигнификантно по – ниски нива на CD4+ и CD8+ клетките при реципиенти с GVHD, като те изтъкват факта, че този феномен би могъл да се обясни със спонтанна апоптоза на ало - активираните T – клетки, индуцирана от цитокиновата дисрегулация (31).

Инфекциозните усложнения заемат също значителен дял от заболяемостта и смъртността след ало – СКТ. Резултатите от нашето проучване подкрепят известните данни от литературата, че инфекциозните патогени потискат репопулацията на лимфоцитния компартмент (T-, B-, и NK клетки) и подпомагат за формиране на т. нар. “порочен кръг”, в който от една страна е налице дисрегулирана имунна среда, заради самата трансплантация, а от друга страна усложненията като GVHD допълнително потискат реорганизацията на посттрансплантационния имунитет (32). Нещо повече, в своето проучване, Wils et al демонстрират, че инфекциозните усложнения, особено в ранния посттрансплантационен период, също повлияват негативно тимусната регенерация и, следователно тимус – зависимото имунно възстановяване като по този начин се наблюдава сигнификантно увеличение на честотата на опортюнистичните инфекции при трансплантираните пациенти (33).

В своето проучване, Ciuca и сътрудници показват, че лимфоцитното възстановяване е важен фактор за изхода от трансплантацията и се влияе от вида на донора. Те установяват, че стойности на ALC над 1000 клетки/ μ L се асоциират с подобрена преживяемост при реципиентите (34). В нашето проучване подобна корелация също беше установена. С използване на ROC анализ се определиха cut – off стойности за ALC на ден 100 и 180 от трансплантацията, като се установи статистически значима разлика в общата преживяемост при пациентите със стойности $> 1.05 \times 10^9 / \text{L}$ за ден 100 (76,9% срещу 37,8%, $p = 0.04$) и стойности $> 1.08 \times 10^9 / \text{L}$ за ден 180 (81% срещу 47,1%, $p = 0.031$). В литературата е установено, че ранното възстановяване на ALC е мощен предиктор за преживяемостта, NRM, остра форма GVHD и честотата на рецидивите (35). В своето проучване върху ранното възстановяване на абсолютния лимфоцитен брой, Костадинова К. и колеги, установяват, че при медиана на проследяването 54,7 месеца, медианата на общата преживяемост, свободната от прогресия преживяемост, кумулативната честота на рецидивите и смъртността несвързана с рецидив за пациентите с ранно лимфоцитно възстановяване не са достигнати, като резултатите от проведената алогенна трансплантация на първата и третата година са значимо по – добри в групата пациенти с ранно възстановяване на общия лимфоцитен брой. Като ключови рискови

фактори за забавено ранно възстановяване на ALC те идентифицират индекс на риск на заболяването (disease risk index, DRI), отговорът към алогенната трансплантация и изборът на хаплоидентичен донор (36). Също така, Niederwieser et al. установяват, че в ранния посттрансплантационен период, по – голямата част от периферните лимфоцитни популации представляват NK клетки, които могат да медиат цитотоксични ефекти без предходна сенсibilизация и биха могли да упражнят ранен GVL ефект върху резидуалните неопластични клетки (37).

Проучванията върху кинетиката на имунното възстановяване след ало – СКТ разкриха ключови аспекти в основните принципи, на които лежи този терапевтичен метод. Те допринесоха за по – задълбочено разбиране на изкуствената имунна онтология след трансплантацията, патофизиологичните механизми на възникване на GVHD, вирусната реактивация, рецидивите на заболяването и GVL ефекта. През последните години изследванията в тази област се развиха от чисто описателни проучвания до високо динамична и иновативна сфера, която оформя бъдещето на ало – СКТ. Новите открития допринесоха за непрекъснатото усъвършенстване на различните трансплантационни платформи, съобразно вида донор, коморбидния статус на реципиентите и вида на заболяването. Предстоящите клинични изпитвания в сферата на ало – СКТ ще покажат дали адаптивния трансфер на паметови донорски лимфоцити, инфузии на централно – паметови Т – клетки или селективни алодеплеционни подходи на присадката ще доведат до по – добри резултати по отношение на ИВ и изхода от трансплантацията като цяло. Бъдещите проучвания ще бъдат насочени към разработване на по – прецизни модели за прогнозиране на посттрансплантационните усложнения, отчитайки сложните клетъчни взаимодействия и включвайки допълнителни фактори като тип присадка, вид донор, манипулация на присадката, степен на съвместимост между реципиент и донор. Контролът върху ИВ чрез целенасочени и добре координирани интервенции ще спомогне за намаляване на заболяемостта и смъртността, свързани с ало – СКТ и ще подобри преживяемостта без GVHD и рецидив.

VII. Изводи от резултатите

1. При пациентите с остра миелоидна левкемия се установява по – добро възстановяване на CD3+CD8+CD38+ клетки на ден 100 и 180 след трансплантацията и на CD19+ клетките на ден 100.
2. Пациентите трансплантирани от напълно съвместим родствен донор имат най – добро възстановяване на ALC на ден 30, по – добро възстановяване на CD3+CD4+ клетки на ден 100 и 180 и CD19+ клетки на ден 180. Най – лошо възстановяване се наблюдава при

пациентите, трансплантирани от хаплоидентичен донор.

3. Реципиентите, получили присадка от донор мъж имат по – добро възстановяване на ALC на ден 30, CD3+CD4+ на ден 100, CD3+CD8+CD38+ на ден 180, спрямо реципиентите на присадка от донор от женски пол.

4. Пациентите, кондиционирани с FluBu имат значително по – нисък брой на CD3+CD4+ клетките на ден 100.

5. Използването на ATG в кондиционирането оказва негативен ефект върху възстановяването на CD3+CD4+ клетки на ден 100 и на NK клетките на ден 180 и 270.

6. По – добра обща преживяемост се установява при всички пациенти със стойности на лимфоцитните популации над определения cut-off.

VIII. Приноси на дисертационния труд

С оригинален характер

- За първи път в България се прави оценка на ролята на трансплантационните фактори във възстановяването на лимфоцитните субпопулации след алогенна трансплантация на хемопоеични стволови клетки.
- За първи път в България се оценява връзката между усложненията, свързани с алогенната трансплантация и възстановяването на имунните субпопулации в посттрансплантационния период.
- За първи път в България се анализира връзката между лимфоцитното възстановяване и преживяемостта на пациентите след алогенна трансплантация на хемопоеични стволови клетки.

С научно-практически характер

- Проследяването на лимфоцитните субпопулации е клиничен подход за оценка на възможните усложнения, свързани с трансплантацията.

- Определянето на лимфоцитните субпопулации в посттрансплантационния период е метод за оценка на функционалността на имунната система.
- Идентифицирането на лимфоцитните субпопулации след проведената трансплантация дава възможност за терапевтични интервенции, които да подобрят преживяемостта на пациентите

С потвърдителен характер

- Диагнозата, вида на донора и вида на кондициониращия режим оказват влияние върху възстановяването на имунната система след трансплантацията.
- Усложненията, свързани с алогенната трансплантация (GVHD, инфекции, неинфекциозни усложнения) оказват негативно въздействие върху възстановяването на лимфоцитните субпопулации в посттрансплантационния период.
- Незадоволителното възстановяване на лимфоцитните субпопулации оказва негативен ефект върху дългосрочната преживяемост на пациентите.

IX. Заключение

Настоящият ретроспективен анализ подчертава ключовото значение на лимфоцитните субпопулации в процеса на имунно възстановяване след алогенна трансплантация на хемопоетични стволови клетки и тяхната прогностична стойност за клиничния изход при пациентите.

Установено бе, че пациентите с остра миелоидна левкемия имат по-бързо възстановяване на CD8 Т-клетките и В-клетките в ранния посттрансплантационен период, което предполага потенциална връзка между основното заболяване и темпа на имунна реконституция. Типът донор оказва съществено влияние върху хода на имунното възстановяване – най-добри резултати се наблюдават при напълно съвместими родствени донори, докато хаплоидентичната трансплантация е асоциирана с най-изразено забавяне на възстановяването на CD4 Т-клетките и В-клетките.

Допълнителни фактори като полът на донора, видът на кондициониращия режим (в частност използването на FluBu и ATG), както и наличието на GvHD или инфекции,

показаха отчетливо негативно влияние върху динамиката и пълнотата на имунното възстановяване по отношение на CD4 T-клетките, активираните CD8 T-клетки, NK- и В-клетките.

Съществен принос на настоящото изследване е идентифицирането на конкретни cut-off стойности за основни лимфоцитни субпопулации на ден 100 и 180 след трансплантацията, които се асоциират със значимо по-добра обща преживяемост. Това включва общ лимфоцитен брой, CD3+CD4+, CD3+CD8+CD38+, NK- и CD19+ клетки, което утвърждава ролята им като независими прогностични биомаркери.

Резултатите от дисертационния труд не само потвърждават значението на имунния мониторинг в клиничната практика, но и открояват възможности за персонализиран подход при посттрансплантационното проследяване и имуносупресивното модулиране. Проспективни проучвания върху динамиката на лимфоцитните субпопулации и тяхното функционално състояние биха допринесли допълнително за оптимизирането на трансплантационната стратегия и подобряването на преживяемостта при тези високорискови пациенти.

X. Научни публикации

Impact of Transplant-Related Complications on Lymphocyte Subset Reconstitution Following Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. (2025). *Scripta Scientifica Medica*, 57(2). <https://doi.org/10.14748/zy6fb656>

Role of transplantation-related factors in the recovery of the lymphocyte compartment following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. (2025). *Scripta Scientifica Medica*, 57(2). <https://doi.org/10.14748/e7gmet41>

IMMUNE RECONSTITUTION AND ITS IMPACT ON OUTCOMES AFTER ALLOGENEIC STEM CELL TRANSPLANTATION: A SINGLE-CENTER EXPERIENCE (CIC 1085) Yavor Petrov, p237, **Bone marrow transplantation, EBMT 2025**

XI. Благодарности

Настоящият дисертационен труд е резултат от дългогодишни целенасочени усилия, научно търсене, труд и непреклонна отдаденост към избраната тема. Въпреки личния ми

принос, дълбоко осъзнавам, че нейното реализиране не би било възможно без подкрепата, вдъхновението, професионалните насоки и безрезервната помощ на редица личности и институции, които по един или друг начин са били до мен в продължение на този дълъг и предизвикателен път.

С най – дълбока признателност изразявам своята благодарност към моя научен ръководител **проф. д-р Илина Мичева**, чиято задълбочена експертиза, търпение и неизчерпаема готовност да споделя своя опит бяха за мен неоценим източник на вдъхновение и професионално израстване. Благодаря сърдечно и на **доцент Трифон Червенков** от Лабораторията по клинична имунология към УМБАЛ “Св. Марина” - Варна за оказаното съдействие, ценните съвети и колегиалната подкрепа, които значително обогатиха научната стойност на настоящото изследване.

Издавам специална благодарност на **доцент Силвия Николова** от Факултета по обществено здравеопазване при Медицински Университет – Варна, за нейната компетентна помощ и съдействие при извършването и интерпретирането на статистическите анализи, които бяха от ключово значение за научната достоверност и аргументация на резултатите.

Издавам искрена благодарност към своите колеги от **Клиниката по хематология и Отделението за трансплантации**, с които споделих множество професионални предизвикателства и радостта от постигнатите успехи. Сърдечно благодаря и на **ръководството на УМБАЛ “Св. Марина” – Варна и Медицински Университет – Варна**, които осигуриха необходимите условия и подкрепа за провеждане на проучването.

С благодарност се обръщам и към колегите от Клиниките по хематология към **УМБАЛ “Св. Георги” – Пловдив** и към **УМБАЛ “Св. Иван Рилски” – София**, както и към екипа на **Клиниката по имунология и Банка за стволови клетки към УМБАЛ “Александровска” – София** за тяхното сътрудничество, споделен опит и взаимопомощ.

Особено признателен съм на **пациентите и техните близки**, които с доверие и кураж приеха да бъдат част от това изследване – тяхната смелост и отдаденост са истинско вдъхновение за всяко мое усилие в медицинската наука.

И не на последно място, изказвам своята дълбока благодарност към **моето семейство и приятели**, които неизменно ме подкрепяха в моменти на умора, съмнение и трудности, и които с любов, търпение и разбиране ми даваха силата да продължа напред.

Този труд е не само резултат от индивидуален изследователски път, но и отражение на колективните усилия, подкрепа и съпричастност на всички, които повярваха в мен и в смисъла на това начинание. На всеки от Вас дължа своето най – искрено “Благодаря!”.

ХІІ. Библиография

1. Zhao X, Wang W, Nie S, Geng L, Song K, Zhang X, et al. Dynamic comparison of early immune reactions and immune cell reconstitution after umbilical cord blood transplantation and peripheral blood stem cell transplantation. *Front Immunol.* 2023 Apr 11;14.
2. Kim HT, Armand P, Frederick D, Andler E, Cutler C, Koreth J, et al. Absolute Lymphocyte Count Recovery after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation Predicts Clinical Outcome. *Biology of Blood and Marrow Transplantation.* 2015 May;21(5):873–80.
3. Thoma MD, Huneke TJ, DeCook LJ, Johnson ND, Wiegand RA, Litzow MR, et al. Peripheral Blood Lymphocyte and Monocyte Recovery and Survival in Acute Leukemia Postmyeloablative Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplant. *Biology of Blood and Marrow Transplantation.* 2012 Apr;18(4):600–7.
4. Bolaños-Meade J, Fuchs EJ, Luznik L, Lanzkron SM, Gamper CJ, Jones RJ, et al. HLA-haploidentical bone marrow transplantation with posttransplant cyclophosphamide expands the donor pool for patients with sickle cell disease. *Blood.* 2012 Nov 22;120(22):4285–91.
5. Lukanov T, Ivanova-Shivarova M, Naumova E. Monitoring of Chimerism Following Hematopoietic Stem Cell Transplantation. In: *Stem Cells in Clinical Practice and Tissue Engineering.* InTech; 2018.
6. Luznik L, O'Donnell P V., Symons HJ, Chen AR, Leffell MS, Zahurak M, et al. HLA-Haploidentical Bone Marrow Transplantation for Hematologic Malignancies Using Nonmyeloablative Conditioning and High-Dose, Posttransplantation Cyclophosphamide. *Biology of Blood and Marrow Transplantation.* 2008 Jun;14(6):641–50.
7. Aversa F, Terenzi A, Tabilio A, Falzetti F, Carotti A, Ballanti S, et al. Full Haplotype-Mismatched Hematopoietic Stem-Cell Transplantation: A Phase II Study in Patients With Acute Leukemia at High Risk of Relapse. *Journal of Clinical Oncology.* 2005 May 20;23(15):3447–54.
8. Huang XJ, Liu DH, Liu KY, Xu LP, Chen H, Han W, et al. Haploidentical hematopoietic stem cell transplantation without in vitro T-cell depletion for the treatment of hematological malignancies. *Bone Marrow Transplant.* 2006 Aug 1;38(4):291–7.
9. Lin C, Su Y, Hsu C, Wang P, Teng CJ. Haploidentical allogeneic hematopoietic stem cell transplantation increases the risk of cytomegalovirus infection in adult patients with acute leukemia. *Transplant Infectious Disease.* 2019 Aug 11;21(4).

10. Kim HO, Oh HJ, Lee JW, Jang PS, Chung NG, Cho B, et al. Immune reconstitution after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in children: a single institution study of 59 patients. *Korean J Pediatr.* 2013;56(1):26.
11. Loren AW, Bunin GR, Boudreau C, Champlin RE, Cnaan A, Horowitz MM, et al. Impact of Donor and Recipient Sex and Parity on Outcomes of HLA-Identical Sibling Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Biology of Blood and Marrow Transplantation.* 2006 Jul;12(7):758–69.
12. Simpson E, Scott D, Chandler P. THE MALE-SPECIFIC HISTOCOMPATIBILITY ANTIGEN, H-Y:A History of Transplantation, Immune Response Genes, Sex Determination and Expression Cloning. *Annu Rev Immunol.* 1997 Apr;15(1):39–61.
13. Popli R, Sahaf B, Nakasone H, Lee JYY, Miklos DB. Clinical impact of H-Y alloimmunity. *Immunol Res.* 2014 May 30;58(2–3):249–58.
14. Servais S, Lengline E, Porcher R, Carmagnat M, Peffault de Latour R, Robin M, et al. Long-Term Immune Reconstitution and Infection Burden after Mismatched Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Biology of Blood and Marrow Transplantation.* 2014 Apr;20(4):507–17.
15. Wils EJ, van der Holt B, Broers AEC, Posthumus-van Sluijs SJ, Gratama JW, Braakman E, et al. Insufficient recovery of thymopoiesis predicts for opportunistic infections in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *Haematologica.* 2011 Dec 1;96(12):1846–54.
16. McCune JS, Mager DE, Bemer MJ, Sandmaier BM, Storer BE, Heimfeld S. Association of fludarabine pharmacokinetic/dynamic biomarkers with donor chimerism in nonmyeloablative HCT recipients. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2015 Jul 17;76(1):85–96.
17. Ju HY, Kang HJ, Hong CR, Lee JW, Kim H, Song SH, et al. Targeted busulfan and fludarabine-based conditioning for bone marrow transplantation in chronic granulomatous disease. *Korean J Pediatr.* 2016;59(Suppl 1):S57.
18. Lee JH, Joo YD, Kim H, Ryoo HM, Kim MK, Lee GW, et al. Randomized Trial of Myeloablative Conditioning Regimens: Busulfan Plus Cyclophosphamide Versus Busulfan Plus Fludarabine. *Journal of Clinical Oncology.* 2013 Feb 20;31(6):701–9.
19. Nakai K, Mineishi S, Kami M, Saito T, Hori A, Kojima R, et al. Antithymocyte globulin affects the occurrence of acute and chronic graft-versus-host disease after a reduced-intensity conditioning regimen by modulating mixed chimerism induction and immune reconstitution. *Transplantation.* 2003 Jun;75(12):2135–44.
20. Small TN, Avigan D, Dupont B, Smith K, Black P, Heller G, et al. Immune reconstitution following T-cell depleted bone marrow transplantation: effect of age and posttransplant graft rejection prophylaxis. *Biol Blood Marrow Transplant.* 1997 Jun;3(2):65–75.
21. Bosch M, Dhadda M, Hoegh-Petersen M, Liu Y, Hagel LM, Podgorny P, et al. Immune reconstitution after anti-thymocyte globulin-conditioned hematopoietic cell transplantation. *Cytotherapy.* 2012 Sep;14(10):1258–75.
22. Bolaños-Meade J, Hamadani M, Wu J, Al Malki MM, Martens MJ, Runaas L, et al. Post-Transplantation Cyclophosphamide-Based Graft-versus-Host Disease Prophylaxis. *New England Journal of Medicine.* 2023 Jun 22;388(25):2338–48.
23. Kanakry CG, Coffey DG, Towler AMH, Vulic A, Storer BE, Chou J, et al. Origin and evolution of the T cell repertoire after posttransplantation cyclophosphamide. *JCI Insight.* 2016 Apr 21;1(5).
24. Espinoza-Gutarra M, Saad A, Jamy O. Immune reconstitution profile after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation with post-transplant cyclophosphamide. *Stem Cell Investig.* 2023 Apr;10:8–8.
25. Massoud R, Gagelmann N, Fritzsche-Friedland U, Zeck G, Heidenreich S, Wolschke C, et al. Comparison of immune reconstitution between anti-T-lymphocyte globulin

- and posttransplant cyclophosphamide as acute graft-versus-host disease prophylaxis in allogeneic myeloablative peripheral blood stem cell transplantation. *Haematologica*. 2021 Apr 8;107(4):857–67.
26. Naymagon S, Naymagon L, Wong SY, Ko HM, Renteria A, Levine J, et al. Acute graft-versus-host disease of the gut: considerations for the gastroenterologist. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2017 Dec 27;14(12):711–26.
 27. Walz B, Maier C, Beck V, Forchhammer S. Treatment of graft versus host disease with methotrexate after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*. 2021 Jan 18;19(1):109–11.
 28. Kröger N, Shahnaz Syed Abd Kadir S, Zabelina T, Badbaran A, Christopeit M, Ayuk F, et al. Peritransplantation Ruxolitinib Prevents Acute Graft-versus-Host Disease in Patients with Myelofibrosis Undergoing Allogeneic Stem Cell Transplantation. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2018 Oct;24(10):2152–6.
 29. Antin JH. Immune reconstitution: The major barrier to successful stem cell transplantation. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2005 Feb;11(2):43–5.
 30. van der Waart AB, van der Velden WJFM, van Halteren AGS, Leenders MJLG, Feuth T, Blijlevens NMA, et al. Decreased Levels of Circulating IL17-Producing CD161+CCR6+ T Cells Are Associated with Graft-versus-Host Disease after Allogeneic Stem Cell Transplantation. *PLoS One*. 2012 Dec 4;7(12):e50896.
 31. Lin MT, Tseng LH, Frangoul H, Gooley T, Pei J, Barsoukov A, et al. Increased apoptosis of peripheral blood T cells following allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood*. 2000 Jun 15;95(12):3832–9.
 32. Naik S, Vasileiou S, Aguayo-Hiraldo P, Mukhi S, Sasa G, Martinez C, et al. Toward Functional Immune Monitoring in Allogeneic Stem Cell Transplant Recipients. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2020 May;26(5):911–9.
 33. Wils EJ, van der Holt B, Broers AEC, Posthumus-van Sluijs SJ, Gratama JW, Braakman E, et al. Insufficient recovery of thymopoiesis predicts for opportunistic infections in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *Haematologica*. 2011 Dec 1;96(12):1846–54.
 34. Ciurea SO, Mulanovich V, Jiang Y, Bassett R, Rondon G, McMannis J, et al. Lymphocyte Recovery Predicts Outcomes in Cord Blood and T Cell–Depleted Haploidentical Stem Cell Transplantation. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2011 Aug;17(8):1169–75.
 35. Savani BN, Mielke S, Rezvani K, Montero A, Yong AS, Wish L, et al. Absolute Lymphocyte Count on Day 30 Is a Surrogate for Robust Hematopoietic Recovery and Strongly Predicts Outcome after T Cell-Depleted Allogeneic Stem Cell Transplantation. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2007 Oct;13(10):1216–23.
 36. Kostadinova K, Venkov K, Tonev I, Lazarova Y, Naseva E, Mihaylov G. Early Lymphocytic Recovery After Allogeneic Transplantation of Hemopoietic Stem Cells in Patients with Hematologic Malignancies – Single Center Experience. 2024.
 37. Niederwieser D, Gastl G, Rumpold H, Marth Ch, Kraft D, Huber Ch. Rapid reappearance of large granular lymphocytes (LGL) with concomitant reconstitution of natural killer (NK) activity after human bone marrow transplantation (BMT). *Br J Haematol*. 1987 Mar;65(3):301–5.

