

Федеральное государственное бюджетное учреждение  
«Гематологический научный центр»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации

*На правах рукописи*

**Богданов Рашит Фаргатович**

**«ТРАНСФУЗИИ ЛИМФОЦИТОВ ДОНОРА ПРИ РЕЦИДИВЕ  
ЛЕЙКОЗА ПОСЛЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ АЛЛОГЕННОГО  
КОСТНОГО МОЗГА»**

14.01.21 – Гематология и переливание крови

диссертация на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

**Научный руководитель:**

доктор медицинских наук,

профессор Л.П. Менделеева

Москва

2014

<b>Оглавление</b>	<b>Стр.</b>
Введение.....	5
Глава 1. Обзор литературы. Трансфузии лимфоцитов донора (ТЛД) у реципиентов аллогенных гемопоэтических стволовых клеток.....	13
1.1. Рецидив гемобластоза после алломиелотрансплантации, значение иммунологических феноменов: реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ) и реакции «трансплантат против лейкоза» (РТПЛ).....	13
1.2. Лечение рецидивов после трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК).....	19
1.3. Изменение содержания субпопуляций Т-лимфоцитов периферической крови у пациентов после алло-ТГСК и ТЛД.....	32
Глава 2. Характеристика больных и методы исследования.....	37
2.1. Клиническая характеристика больных.....	37
2.2. Протокол трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток.....	39
2.3. Исследование гемопоэтического химеризма после алло-ТГСК.....	41
2.4. Адоптивная иммунотерапии после алло-ТГСК.....	43
2.5. Протокол адоптивной иммунотерапии.....	44
2.6. Сбор и криоконсервирование лейкоконцентрата периферической крови донора костного мозга.....	47
2.7. Диагностика и лечение реакции РТПХ после адоптивной иммунотерапии.....	49
2.8. Исследование субпопуляций Т-лимфоцитов периферической крови на фоне трансфузий лимфоцитов донора.....	50
2.9. Статистический анализ.....	53
Глава 3. Адоптивная иммунотерапия после алло-ТГСК.....	54
3.1. Адоптивная иммунотерапия гематологического рецидива гемобластоза после алло-ТГСК.....	55

3.1.1. ТЛД как монотерапия гематологического рецидива гемобластоза после алло-ТГСК.....	56
3.1.2. Химиотерапия с последующими ТЛД при гематологическом рецидиве гемобластоза после алло-ТГСК.....	60
3.1.3. Эффективность адоптивной иммунотерапии, в зависимости от нозологической формы, фазы заболевания на момент алло-ТГСК, продолжительности ремиссии после алло-ТГСК.....	72
3.1.4. Показатели общей выживаемости в зависимости от эффективности адоптивной иммунотерапии.....	78
3.2. Повторная адоптивная иммунотерапия второго гематологического рецидива гемобластоза после алло-ТГСК .....	80
3.2.1. ТЛД на фоне ремиссии, индуцированной курсом химиотерапии с последующим введением ИЛ-2.....	81
3.2.2. ТЛД с последующим введением ИЛ-2 в период миелотоксического агранулоцитоза после курса химиотерапии.....	82
3.3. Применение ТЛД при убывающем донорском химеризме после алло-ТГСК.....	85
Глава 4. РТПХ после адоптивной иммунотерапии .....	92
4.1. Острая форма РТПХ после адоптивной иммунотерапии .....	92
4.2. Хроническая форма РТПХ после адоптивной иммунотерапии .....	96
4.3. Влияние химиотерапии предшествовавшей ТЛД на частоту развития РТПХ.....	100
4.4. Частота РТПХ после ТЛД в зависимости от диагноза, продолжительности ремиссии после алло-ТГСК, режима кондиционирования и наличия РТПХ после алло-ТГСК.....	101
Глава 5. Результаты адоптивной иммунотерапии, в зависимости от дозы перелитых лимфоцитов донора и режима их введения.....	105

5.1. Сравнение эффективности адоптивной иммунотерапии и частоты развития РТПХ в зависимости от суммарного количества перелитых CD3 <sup>+</sup> клеток .....	105
5.2. Влияние конкретизации начальной дозы перелитых лимфоцитов донора с последующей их эскалацией на результаты адоптивной иммунотерапии.....	108
Глава 6. Субпопуляции Т-лимфоцитов периферической крови у больных гемобластозами на фоне ТЛД после трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток.....	112
6.1. Субпопуляции Т-лимфоцитов периферической крови больных гемобластозами на фоне ТЛД по поводу посттрансплантационного рецидива гемобластоза.....	113
6.2. Субпопуляции Т-лимфоцитов периферической крови больных гемобластозами на фоне ТЛД по поводу убывающего донорского химеризма.....	119
Заключение.....	126
Выводы.....	144
Практические рекомендации.....	146
Список сокращений .....	147
Список литературы.....	149
Приложение 1.....	171

## Введение

### Актуальность темы

Трансплантация аллогенных гемопоэтических стволовых клеток при гемобластозах является эффективным методом терапии, обеспечивающим не только достижение полной продолжительной ремиссии, но и в ряде случаев – биологического излечения за счет полной замены патологического кроветворения реципиента на здоровое донорское [Б.В. Афанасьев и соавт., 2007; Л.С. Зубаровская и соавт., 2009; Л.С. Любимова и соавт., 2007; М.А. Масчан и соавт., 2011; Л.П. Менделеева и соавт., 2007; В.Г. Савченко и соавт., 2003; А.Г. Румянцев и соавт., 2003]. Ежегодно в мире выполняется более 25000 алломиелотрансплантаций. При этом растет число алло-ТГСК не только от гистосовместимых сиблингов, но и от неродственных доноров [J.R. Passweg et al., 2012].

В настоящее время алло-ТГСК перешла из метода «терапии отчаяния» прогрессирующих резистентных форм онкогематологических заболеваний в один из этапов лечения гемобластозов, а именно в этап консолидации противоопухолевого эффекта, достигнутого индукционной химиотерапией [Л.П. Менделеева и соавт., 2007; В.Г. Савченко и соавт., 2003].

Пятилетняя безрецидивная выживаемость после алло-ТГСК, выполненной при остром лейкозе (ОЛ) в период первой ремиссии, колеблется в пределах 65-75% [B.N. Savani et al., 2009; Y.J. Kim et al., 2010; C. Schmid et al., 2006; E. Morris et al., 2004]. Анализ результатов алло-ТГСК у больных хроническим миелолейкозом (ХМЛ), выполненных на фоне первой хронической фазы показал, что общая выживаемость больных в течение 20 лет составляет 73%, а вероятность сохранения ремиссии на фоне полного донорского химеризма может достигать 96% [Л.С. Любимова и соавт., 2012].

Несмотря на попытки повысить противоопухолевую эффективность предтрансплантационного кондиционирования, а также наличие трансплантационного иммунологического феномена «трансплантат против лейкоза», рецидив гемобластоза после алло-ТГСК остается одной из основных причин неудач миелотрансплантации [A.J. Barrett et al., 2010; M. Duval et al., 2010; F. Dazzi et al., 2007; И.А. Демидова и соавт., 2007; Е.В. Семенова и соавт., 2011; Ю.Г. Иоффе и соавт., 2009, N.W. J van de Donk et al., 2006].

Посттрансплантационный рецидив развивается у 25 – 50% пациентов, при этом частота рецидивов зависит от степени гистосовместимости реципиента и донора, нозологической формы гемобластоза, а также фазы заболевания на момент алло-ТГСК [A.J. Barrett et al., 2010; M. Duval et al., 2010; F. Dazzi et al., 2007]. Рецидив является самой частой причиной летального исхода после алло-ТГСК. Так, в 49% летальных исходов после алло-ТГСК от HLA-идентичного родственного донора (HLA – human leukocyte antigen, лейкоцитарный антиген человека) и 37% случаев после алло-ТГСК от неродственного донора обусловлены рецидивом заболевания [M.C. Pasquini et al., 2012].

В случае выполнения алло-ТГСК во время первой ремиссии острого лейкоза (ОЛ) или хронической фазы ХМЛ частота рецидивов не превышает 20%. Если алло-ТГСК выполнена во второй и последующих ремиссиях или резистентном течении острого лейкоза, бластном кризе хронического миелолейкоза доля рецидивов достигает 40–70% [M. Duval et al., 2011].

Лечение посттрансплантационного рецидива гемобластоза всегда крайне затруднено, особенно в случаях рецидива, развившегося в ранние сроки после алло-ТГСК. Предлагались различные подходы к лечению посттрансплантационного рецидива: прекращение иммуносупрессивной профилактики РТПХ, применение противорецидивной химиотерапии и выполнение повторной алло-ТГСК [B.E. Shaw et al., 2008; N. Kroger, 2011, R. Formankova et al., 2010].

Альтернативным и наиболее эффективным методом лечения посттрансплантационных рецидивов является адоптивная иммунотерапия трансфузиями лимфоцитов донора костного мозга, индуцирующая эффект «трансплантат против лейкоза» [H.J. Kolb et al., 1990; S. Slavin et al., 2002; V. Savchenko et al., 1996; C. Schmid et al., 2007].

Результаты этого вида лечения зависят от многих причин, среди которых рассматриваются вариант заболевания, величина опухолевой массы и степень агрессивности рецидива, доза перелитых лимфоцитов донора. Так, у больных с молекулярным или цитогенетическим посттрансплантационным рецидивом ХМЛ частота достижения повторной ремиссии в результате применения ТЛД достигает 80%, при гематологическом рецидиве составляет 70-78%, а при рецидиве в виде бластного криза всего лишь 15 - 35% [P. Garland et al., 2010; M. Lubbert et al., 2010; H.J. Kolb et al., 2008; A. Deol et al., 2010]. При других нозологических формах результаты терапии посттрансплантационного рецидива весьма различны. Так при остром миелобластном лейкозе (ОМЛ) ТЛД способствуют достижению ремиссии у 35 — 65% больных [A. Candoni et al., 2009; Z.A. Yegin et al., 2010; A.W. Loren et al., 2008; M.R. Bishop et al., 2008], а при остром лимфобластном лейкозе (ОЛЛ) - 15-30% [M. Yoshimitsu et al., 2008; S.J. Choi et al., 2005]. У больных ОМЛ и ОЛЛ, которым проводились ТЛД на фоне развернутого рецидива частота повторных ремиссий, равнялась 15% и 18%, соответственно [R. Collins et al., 1997].

С целью оптимизации результатов адоптивной иммунотерапии и снижения риска наиболее тяжелого осложнения трансфузий лимфоцитов донора – РТПХ, предпринимались различные модификации этого метода лечения посттрансплантационных рецидивов. Так, перед трансфузиями лимфоцитов донора применялась химиотерапия, назначалась кратковременная иммуносупрессивная терапия, использовались специфические субпопуляции Т-лимфоцитов или гено-модифицированные эффекторные клетки, обсуждались варианты эскалации дозы переливаемых CD3<sup>+</sup> клеток донора [G. Orti et al., 2009;

S.R. Riddell et al., 2002; M. Bornhäuser et al., 2011; A.J. Barrett et al., 2010; K. Rezvani et al., 2011; S. Mackinnon et al., 1995].

Однако до настоящего времени не найдено четких ответов на вопросы о схемах и интенсивности адоптивной иммунотерапии. Большое внимание в настоящее время уделяется поиску наиболее эффективных методик, направленных на предупреждение посттрансплантационного рецидива. И в этой области значимое место отводится трансфузиям лимфоцитов донора. Предшествовавшими исследованиями убедительно доказано, что снижение донорского химеризма после алло-ТГСК свидетельствует о высоком риске рецидива гемобластоза.

В этой ситуации применение трансфузий лимфоцитов донора в качестве превентивной иммунотерапии может явиться единственным преимущественным терапевтическим подходом, опережающим развитие посттрансплантационного рецидива.

Приведенные сведения указывают на высокую актуальность проблемы, касающейся лечения и предупреждения посттрансплантационного рецидива гемобластоза. Предпринятые нами исследования в этой области трансплантологии, возможно, позволят разработать наиболее адекватный алгоритм терапии гемобластозов с помощью алло-ТГСК, включая ТЛД с лечебной и профилактической целью в посттрансплантационном периоде.

### **Цель исследования**

Изучить эффективность адоптивной иммунотерапии, включающей трансфузии лимфоцитов донора, у больных гемобластозами при гематологическом рецидиве и убывающем донорском химеризме после трансплантации аллогенного костного мозга.



### **Задачи исследования:**

1. Оценить эффективность различных схем адоптивной иммунотерапии у больных с гематологическим рецидивом и убывающим донорским химеризмом после алло-ТГСК.
2. Изучить результаты применения трансфузий лимфоцитов донора после химиотерапии в период миелотоксического агранулоцитоза у больных ОМЛ. Определить прогностические факторы, способствующие достижению максимальных результатов.
3. Оценить возможность повторного применения адоптивной иммунотерапии в случае диагностики второго посттрансплантационного рецидива.
4. Оценить вероятность РТПХ после трансфузий лимфоцитов донора и ее клинические характеристики, а также влияние РТПХ на результаты адоптивной иммунотерапии.
5. Сопоставить эффективность адоптивной иммунотерапии и частоту РТПХ при переливании различных доз лимфоцитов донора. Проанализировать значение конкретизации начальной дозы переливаемых CD3<sup>+</sup> клеток.
6. Проанализировать изменение содержания субпопуляций Т-лимфоцитов периферической крови у больных гемобластозами на фоне трансфузий лимфоцитов донора по поводу посттрансплантационного рецидива гемобластоза или убывающего донорского химеризма

### **Научная новизна и практическая ценность работы**

В данной работе показана эффективность трансфузий лимфоцитов донора при гематологическом рецидиве и убывающем донорском химеризме у больных гемобластозами после алло-ТГСК. Проанализированы результаты адоптивной иммунотерапии в зависимости от схемы применения ТЛД при гематологическом рецидиве. Показана эффективность лечения повторного гематологического рецидива после проведения второго эпизода ТЛД. Выделены факторы,

определяющие эффективность ТЛД, а также длительность сохранения ответа после адоптивной иммунотерапии.

Изучена частота развития острой и хронической формы РТПХ после адоптивной иммунотерапии.

Оптимизирован алгоритм адоптивной иммунотерапии у больных гемобластозами после алло-ТГСК. Определена начальная доза  $CD3^+$ клеток, равная  $1 \times 10^7$ клеток/кг. Введена эскалация дозы  $CD3^+$ клеток во время второй и третьей трансфузий лимфоцитов донора ( $5 \times 10^7 CD3^+$ клеток/кг и  $10 \times 10^7 CD3^+$ клеток/кг, соответственно). В качестве поддерживающей терапии после достижения полного донорского химеризма и отсутствия РТПХ рекомендовано введение интерлейкина-2 (5-дневный курс, суммарная доза 10 млн.МЕ).

Проанализированы в динамике субпопуляции Т-лимфоцитов периферической крови у больных гемобластозами на фоне ТЛД по поводу посттрансплантационного рецидива гемобластоза или убывающего донорского химеризма.

### **Пути практической реализации**

Полученные результаты используются в работе отдела химиотерапии гемобластозов, депрессий кроветворения и трансплантации костного мозга ФГБУ ГНЦ Минздрава России (Генеральный директор - академик РАН, профессор, д.м.н. В.Г. Савченко, заведующая отделом – д.м.н. Е.Н. Паровичникова).

Разработан и внедрен в клиническую практику ФГБУ ГНЦ Минздрава России алгоритм адоптивной иммунотерапии гематологического рецидива, а также предупреждения рецидива при убывающем донорском химеризме после алло-ТГСК.

### **Основные положения, выносимые на защиту**

Показано, что адоптивная иммунотерапия посттрансплантационного рецидива, включающая ТЛД (+ИЛ-2) в период миелотоксического агранулоцитоза после курса химиотерапии, позволила повысить частоту полных ремиссий ОМЛ.

Частота достижения полного ответа и его продолжительность у пациентов с гематологическим рецидивом после алло-ТГСК зависит от нозологической формы заболевания, схемы адоптивной иммунотерапии (применение химиотерапевтических препаратов перед переливаем лимфоцитов донора) и длительности ремиссии после алло-ТГСК (более 6 месяцев).

Несмотря на то, что больные со вторым посттрансплантационным рецидивом гемобластоза относятся к группе с крайне неблагоприятным прогнозом, повторные ТЛД с предшествовавшей ХТ обеспечивают достижение очередной ремиссии.

Наличие РТПХ после ТЛД было ассоциировано с достижением ремиссии и восстановлением полного донорского химеризма, а длительность сохранения ответа зависела от наличия хронической формы РТПХ.

Клиническое течение хронической РТПХ аналогично коррелировало с величиной дозы перелитых  $CD3^+$  клеток: чем больше доза  $CD3^+$  клеток, тем большее число органов-мишеней вовлекалось в иммунологический конфликт, характеризующийся и более тяжелыми клиническими проявлениями.

Отмечено, что применение нового алгоритма ТЛД, основанного на конкретизации начальной дозы  $CD3^+$  клеток, позволило достоверно снизить частоту острой РТПХ.

Результаты качественной и количественной оценки субпопуляций Т-лимфоцитов позволили охарактеризовать изменения содержания количества Т-хелперов, цитотоксических клеток, Т-регуляторных клеток и НК-клеток в зависимости от фазы заболевания и степени ответа на проводимую адоптивную иммунотерапию.

### **Апробация и реализация работы**

Основные положения диссертации представлены в постерных докладах на XXXVIII симпозиуме Европейской группы по трансплантации костного мозга (Париж, 2011г.); на Конгрессе гематологов России (Москва, 2012г.); на 55-м конгрессе Американского общества гематологов (Новый Орлеан, 2013г.);

включены в доклад на V международном симпозиуме «Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток у детей и взрослых» (Санкт-Петербург, 2011г.), а также в доклад на Конгрессе гематологов России (Москва, 2012г.). По теме диссертации опубликовано 7 научных работ из них 2 статьи в журналах, рекомендованных ВАК. Подана заявка на получение патента на изобретение: «Способ лечения рецидива острого миелоидного лейкоза после трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток» (регистрационный номер – 2013133428, от 19.07.2013г.).

### **Структура диссертации**

Работа выполнена в клинике ФГБУ ГНЦ Минздрава России (Генеральный директор - академик РАН, профессор, д.м.н. В.Г. Савченко). Диссертация состоит из шести частей, включающих введение, обзор литературных данных, клиническую характеристику больных и методы исследования, результаты, заключение, выводы и список литературы. Работа изложена на 172 страницах машинописного текста. Текст работы содержит 41 таблицу, 13 рисунков и одно приложение. Указатель литературы включает 163 отечественных и зарубежных источников.

## **Глава 1. Обзор литературы. Трансфузии лимфоцитов донора у реципиентов аллогенных гемопоэтических стволовых клеток**

### **1.1. Рецидив гемобластоза после алло-ТГСК, значение иммунологических феноменов: РТПХ и РТПЛ**

Трансплантация аллогенных гемопоэтических стволовых клеток в настоящее время занимает твердые позиции в клинической медицине, превратившись из метода «терапии отчаяния» крайне тяжелых резистентных форм онкогематологических заболеваний в один из этапов терапии [1, 14, 15, 16, 17, 20, 21]. Кроме гематологических заболеваний алло-ТГСК применяется при некоторых онкологических и наследственных заболеваниях [1, 6, 10]. С каждым годом увеличивается количество выполненных алло-ТГСК. Так, ежегодно в мире проводят более 25 000 алло-ТГСК от гистосовместимого родственного или неродственного, а также гаплоидентичного доноров [11, 28, 110, 111, 149].

Пятилетняя безрецидивная выживаемость после аллогенной миелотрансплантации колеблется от 65 до 75% для больных острыми лейкозами (ОЛ) в первой ремиссии и ХМЛ в хронической фазе. Данный показатель снижается до 7 - 20%, если алло-ТГСК была выполнена вне ремиссии ОЛ или бластном кризе и фазе акселерации ХМЛ [14, 55, 103].

Анализ результатов алло-ТСК у больных ХМЛ, выполненных в научно-клиническом отделении высокодозной химиотерапии и трансплантации костного мозга ФГБУ Гематологический научный центр Минздрава России, показал, что общая выживаемость больных в течение 20 лет составила 73%, при этом частота рецидивов не превышала 11%. Вероятность сохранения ремиссии на фоне полного донорского химеризма может достигать 96%, если алло-ТГСК предпринималась в первой хронической фазе хронического миелолейкоза [15].

Преимущество алло-ТГСК перед стандартной высокодозной химиотерапией заключается в комбинированном эффекте химио- или радиотерапевтического

воздействия предтрансплантационного кондиционирования и в способности иммунокомпетентных аллогенных донорских Т-лимфоцитов элиминировать остаточные опухолевые клетки в результате эффекта РТПЛ [70, 75].

Идея присутствия этого иммунологического эффекта была выдвинута в 1957г D. Barnes и J. Loutit, которые показали, что у всех мышей с ОЛ после проведения миелоаблативного облучения с последующей трансплантацией сингенного костного мозга развился рецидив, а у мышей, получивших аллогенный миелотрансплантат и погибших от тяжелой РТПХ, при аутопсии не было признаков ОЛ [32]. Из этого исследования было сделано два вывода. Первый вывод заключался в том, что миелоаблативная радиотерапия не обеспечивает полной эррадикации лейкемических клеток, но существует противоопухолевый иммунный эффект. И второй вывод - именно присутствием иммунных механизмов объясняется сниженный риск рецидивов лейкоза после трансплантации аллогенного костного мозга, в сравнении с трансплантацией аутологичного или сингенного. Кроме того при развитии у реципиента РТПХ наблюдается меньшая частота рецидивов лейкоза [70, 75].

Успех алло-ТГСК ограничивают многочисленные посттрансплантационные осложнения. РТПХ является самым частым осложнением, возникающим в результате сложных взаимодействий между иммунокомпетентными клетками костного мозга донора и клетками органов-мишеней реципиента [6, 69].

Развитие РТПХ после алло-ТГСК является частью иммунологического ответа и служит маркером протекающей параллельно РТПЛ [156, 157]. Наличие острой или хронической РТПХ сопровождается меньшим риском рецидива после алло-ТГСК. [10, 37, 68, 146, 148]. В последующих исследованиях с целью индукции РТПХ и соответственно РТПЛ стали использовать раннюю отмену посттрансплантационной иммуносупрессии для профилактики рецидива, а также при смешанном химеризме [83, 118, 146].

РТПХ и РТПЛ реализуются при участии Т-лимфоцитов и клеток естественных киллеров, которые взаимодействуют с клетками реципиента.

Иммунологическая реакция после алло-ТГСК проходит фазы индукции, экспансии и непосредственного воздействия. В фазе индукции принимают участие CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клетки, взаимодействующие с антигенами I и II классов главного комплекса гистосовместимости антигенпрезентирующих клеток реципиента. Сигнал активации для Т-клеток осуществляется с участием Т-клеточного рецептора и рецепторов CD3, CD4 и CD8, а также молекул, обеспечивающих дополнительный (вторичный) стимулирующий эффект, к которым относятся CD80 и CD86, также присутствующие на антигенпрезентирующих клетках, и CD28 на лимфоцитах [10, 59, 82].

Под воздействием ростовых факторов интерлейкина-2 (ИЛ-2) и интерлейкина-12 Т-клетки приобретают характеристики Т-хелперов (Th-1 и Th-2) или цитотоксических Т-лимфоцитов (Tc1- или Tc2), синтезирующих про- или противовоспалительные факторы. Активированные Т-лимфоциты донора повреждают клетки органов – мишеней реципиента, а также и злокачественные клетки, что приводит к развитию острой и хронической РТПХ и РТПЛ. При развитии острой РТПХ происходит преимущественная активация Th1 Т-хелперов, при возникновении хронической РТПХ - Th2 Т-хелперов [59, 68]. Однако, в некоторых случаях индукция РТПЛ может происходить при отсутствии РТПХ [92].

Кроме того, посттрансплантационный период может осложниться первичным неприживлением или отторжением миелотрансплантата, а также рецидивом заболевания [27, 35, 71]. Каждое из перечисленных осложнений может явиться причиной гибели больного.

Рецидив гемобластоза после алло-ТГСК остается довольно частой причиной неудач данного метода терапии. [35, 52, 61, 66, 119]. Так, 37% случаев летальных исходов при родственной и 49% случаев при неродственной алло-ТГСК обусловлены рецидивом заболевания. [110].

Несмотря на высокую интенсивность режимов кондиционирования и переливание большого количества донорских Т-лимфоцитов при

миелотрансплантации, аутологичные гемопоэтические клетки могут длительное время оставаться в организме реципиента [4, 13, 29, 34, 125, 147]. За счет этих резидуальных клеток в ряде случаев происходит полное или частичное восстановление кроветворения хозяина, в котором могут присутствовать как нормальные, так и опухолевые клетки [109].

В подавляющем большинстве случаев рецидив возникает из опухолевых клеток хозяина, «переживших» режим кондиционирования [46]. Состояние, при котором Т-клетки донора «контролируют» резидуальный клон опухолевых клеток и сдерживают развитие рецидива, может продолжаться длительное время. Однако персистенция остаточных опухолевых клеток всегда свидетельствует о высоком риске рецидива [9, 118, 121]. В очень редких случаях рецидив гемобластоза может возникнуть из донорских клеток [25, 101, 127].

С течением времени существование резидуального клона опухолевых клеток приводит к селекции субклонов клеток с измененным фенотипом. Основные механизмы иммунологического «избегания» опухолевыми клетками реципиента взаимодействия с иммунокомпетентными клетками донора представлены в работе Н.Ж. Kolb и соавт. [82]. Так, авторы отмечают, что клетки центральной нервной системы, кожи, яичек, подкожной жировой клетчатки, признаны иммунологически «привилегированными» и экстрамедуллярное распространение опухолевых клеток является наиболее неблагоприятным признаком при посттрансплантационном рецидиве. Среди других факторов авторы выделяют снижение экспрессии костимуляторных молекул (CD80, CD83, CD86, CD40, LFA-1) на опухолевых клетках, секрецию опухолевыми клетками ингибиторных цитокинов (Интерлейкина-10, трансформирующего фактора роста-бета), резистентность опухолевых клеток к провоспалительным цитокинам (Фактор некроза опухоли-альфа (ФНО-альфа), ИНФ-гамма).

В результате присутствия указанных процессов, в костном мозге реципиента отбираются опухолевые субклоны, резистентные к воздействию



иммунокомпетентных клеток донора, бесконтрольная пролиферация которых приводит к развернутому рецидиву лейкоза [54].

Активация естественных киллерных клеток (NK-клетки) также является частью иммунологической реакции и происходит в ранний период после алло-ТГСК. Клетки натуральные киллеры выделяют цитокины, ответственные за регуляцию Т-клеток (ИНФ-альфа, ФНО-альфа), и отвечают за противовирусный и противоопухолевый иммунитет. Клетки натуральные киллеры экспрессируют антигены CD56 и CD16, посредством которых осуществляется антителозависимая цитотоксическая реакция. Функция этих клеток зависит от присутствия иммуноглобулиноподобных рецепторов естественных киллеров – KIRs (killer immunoglobulin-like receptors), взаимодействующих с I классом HLA- системы на клетках мишенях реципиента. Несовместимость KIRs-лиганда, выявляемая на основании различия антигенов HLA-системы I класса пары донор-реципиент приводит к развитию аллореактивности естественных киллеров донора с последующим лизисом клеток – мишеней, в том числе опухолевой природы [10, 106].

Высокая вероятность развития рецидива при наличии смешанного химеризма и маркеров остаточной болезни, объясняется тем, что сосуществование резидуальных опухолевых клеток и клеток донора приводит к ослаблению РТПЛ за счет формирования взаимной толерантности [72, 90, 147].

Большое значение при изучении механизмов таких феноменов, как развитие посттрансплантационной толерантности, РТПХ и РТПЛ, а также приживления или отторжения миелотрансплантата, придается исследованию гемопоезического химеризма после алло-ТГСК [2, 9, 23, 94].

В трансплантологии термин «химера» впервые был использован в 1956 г., К. Ford и соавт. применили этот термин при описании мышей, которым после облучения были введены гемопоезические клетки другого животного [60].

В настоящее время термин «гемопоезический химеризм» включает в себя несколько понятий, принятых Международным регистром трансплантации

костного мозга (International Bone Marrow Transplant Registry, IBMTR) [27]. Так, «полный донорский химеризм» подразумевает обнаружение в костном мозге реципиента 100% клеток донора. Термин «смешанный химеризм» используют для описания ситуаций, когда после алло-ТГСК в костном мозге обнаруживают клетки реципиента и донора одновременно.

Стабильный смешанный химеризм диагностируется при обнаружении относительно постоянного соотношения клеток донора и реципиента (колебания менее 5%) в двух и более последовательно исследованных образцах крови или костного мозга. При этом содержание донорских клеток может составлять около 80%. Возрастающий (или убывающий) донорский химеризм устанавливается при выявлении увеличения (или уменьшения) числа донорских клеток более, чем на 5% от предыдущего уровня.

В исследовании, проведенном Е.И. Желновой и соавт., обнаружена высокая корреляция возникновения посттрансплантационных рецидивов с наличием смешанного гемопоэтического химеризма хотя бы в одной клеточной популяции у больных в течение года после алло-ТГСК ( $p = 0,005$ ). Наиболее значимой оказалась взаимозависимость наличия смешанного гемопоэтического химеризма с возникновением рецидива у пациентов из группы высокого риска, страдающих ОЛ и МДС ( $p = 0,0005$ ) [9].

В работе G. Rossi и соавт. также указывалось на тесную связь наличия смешанного химеризма и резидуальной болезни после алло-ТГСК. Так, у больных ОЛ при наличии смешанного химеризма чаще выявлялись признаки остаточной болезни (75% против 33%) и экспрессия гена *WT1* (58% против 29%), чем у пациентов с полным донорским химеризмом. При этом двухлетняя безрецидивная выживаемость и общая выживаемость были выше в группе пациентов без признаков резидуальной болезни [125].

## 1.2. Лечение посттрансплантационных рецидивов

Лечение посттрансплантационного рецидива, особенно в ранние сроки после алло-ТГСК, всегда затруднено. По данным исследования, проведенного A. Logen и соавт., однолетняя общая выживаемость больных ОМЛ, рецидив у которых развился через 6 и более месяцев после алло-ТГСК, составила 44%, по сравнению с 10% для больных, рецидив у которых был диагностирован в первые 6 месяцев после алло-ТГСК [87].

В качестве терапии гематологического рецидива гемобластоза после алло-ТГСК в различное время предлагали следующие методики: химиотерапия, вторая алломиелотрансплантация, цитокиновая терапия и адоптивная иммунотерапия [53, 57, 61, 80, 103, 130, 140, 151]. При изолированном экстрамедуллярном или сочетанном рецидиве (экстрамедуллярный + костномозговой) проводится также лучевая терапия или оперативное вмешательство, как правило, в сочетании с перечисленными выше методами [13, 47, 129].

Эффективность химиотерапии, как единственного метода лечения посттрансплантационного рецидива гемобластоза, невысока и напрямую зависит от нозологической формы гемобластоза и сроков возникновения рецидива [105, 136]. Результаты исследования S. Sica и соавт. свидетельствовали о том, что при позднем посттрансплантационном рецидиве (более 9 месяцев после алло-ТГСК) число больных ОЛ, достигших ремиссии после высокодозных курсов химиотерапии, могло быть весьма значительным (71%). Однако продолжительность этих ремиссий была короткой (14 месяцев) [140].

По оценкам большинства специалистов, в случае рецидива лейкоза на ранних сроках (на протяжении 6-12 месяцев после алло-ТГСК) результаты терапии значительно хуже, что обусловлено, в том числе тем, что в эти сроки интенсивная химиотерапия сопровождается крайне высокой летальностью. У пациентов с рецидивом, возникшим в более поздние сроки после алло-ТГСК,

повторные ремиссии удается индуцировать чаще. Однако эти результаты лечения нельзя считать удовлетворительными вследствие краткосрочности достигнутых ремиссий. Ретроспективное исследование Европейской группы по трансплантации костного мозга показало, что стандартная химиотерапия позволяет достигнуть повторной ремиссии у 40% больных с ОЛ, но продолжительность ее составляет не более 8-14 месяцев. Всего у 3% пациентов период ремиссии превышает 2 года [53].

Вторая алло-ТГСК может рассматриваться в качестве эффективного метода терапии посттрансплантационного рецидива. Однако выполняется вторая аллогенная миелотрансплантация только 2-20% реципиентов с рецидивом после алло-ТГСК [57]. Это обусловлено высокой летальностью, связанной с повторной трансплантацией (36%-50%) и весьма скромными показателями двухлетней общей выживаемости (27%). Среди прогностических факторов, влияющих на результат второй алло-ТГСК, наиболее важными являются интервал времени между первой алло-ТГСК и рецидивом и наличие хронической РТПХ после второй алло-ТГСК [130].

По данным В.Е. Shaw и соавт. после второй алло-ТГСК, выполненной с кондиционированием пониженной интенсивности, частота посттрансплантационных рецидивов в течение первого года у больных ОЛ превышала 50% и была несколько ниже у реципиентов с лимфопролиферативными заболеваниями (18%) [138].

Наиболее эффективным методом лечения посттрансплантационного рецидива является адоптивная иммунотерапия [80, 131, 145].

Иммунотерапия - это метод лечения, основанный на стимулировании иммунокомпетентных клеток, атакующих, в том числе опухолевые клетки.

Выделяют два вида иммунотерапии. Активная иммунотерапия подразумевает воздействие на иммунную систему организма человека с целью получения эффективного иммунного ответа против опухолевых клеток. К ней

относится активная специфическая иммунотерапия с использованием различных противоопухолевых вакцин.

Пассивная иммунотерапия подразумевает введение в организм больного рекомбинантных цитокинов или иммунокомпетентных клеток. В соответствии с основным компонентом, используемым при лечении, пассивная иммунотерапия подразделяется на клеточную и цитокинотерапию [12].

При цитокиновой терапии в лечении онкологических заболеваний используют: ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-10, ИЛ-12; ФНО-альфа; Интерферон-альфа (ИНФ-альфа) и гамма (ИНФ-гамма) [12, 26, 63, 155, 158].

Интерлейкин-2 известен с 1967 года как белковая молекула, стимулирующая рост Т-клеток [88]. ИЛ-2 вырабатывается активированными Т-хелперами I типа (Th1) (90% продукции эндогенного ИЛ-2), а также цитотоксическими CD8<sup>+</sup> лимфоцитами (10% продукции эндогенного ИЛ-2) [30]. ИЛ-2 обладает выраженным стимулирующим эффектом на НК-клетки и лимфокинактивированные киллеры клетки [26].

Основное иммуномодулирующее свойство ИЛ-2 состоит в активации цитотоксических Т-лимфоцитов при взаимодействии со специфическими рецепторами на их мембране [26].

С целью предупреждения рецидива после трансплантации аутологичных гемопоэтических стволовых клеток в начале 1990-х годов были предприняты попытки использования посттрансплантационной цитокиновой терапии. При применении этого метода рассчитывали на достижение лучшего контроля над минимальной резидуальной болезнью (МРБ) за счет активации различных звеньев неспецифического противоопухолевого иммунитета. В публикациях этого периода приводились доказательства, что рекомбинантный ИЛ-2 может контролировать миелоидные лейкоэмические клетки, а терапия ИЛ-2 способна восстанавливать нарушенные функции аутологичных НК-клеток [143, 144].

Первая успешная ТЛД была выполнена двухлетнему ребенку с ОЛЛ в Иерусалиме в 1986 г. [142]. Через несколько лет опубликованы результаты

успешного применения переливаний донорских лимфоцитов в Германии. По данным клинического исследования Н.И. Kolb и соавт. [80], у больных с гематологическим рецидивом ХМЛ после алло-ТГСК, удалось достичь полную цитогенетическую ремиссию в результате ТЛД без использования химио- или лучевой терапии. Лечение посттрансплантационного рецидива с помощью ТЛД позже было описано и другими учеными [48, 88, 131].

Впервые результаты успешного применения ИЛ-2 в сочетании с ТЛД при рецидиве гемобластоза после алло-ТГСК были опубликованы S. Slavin и соавт. в 1996г [144]. Пациенту с посттрансплантационным рецидивом ОЛЛ были перелиты лимфоциты донора после предварительного их инкубировали с ИЛ-2. В результате у больного была достигнута полная длительная ремиссия заболевания.

В исследовании, представленном Е. Nadal и соавт., была описана эффективность применения рекомбинантного ИЛ-2 у больных гемобластозами, не ответивших на монотерапию лимфоцитами донора по поводу рецидива гемобластоза после алло-ТГСК. В результате терапии ИЛ-2 у 38% больных получена полная ремиссия и у 31% больных частичная ремиссия [103]. Позднее было проведено несколько клинических исследований сочетанного использования ИЛ-2 и ТЛД [8, 43, 154, 163]. Рекомендуемая доза ИЛ-2 в сочетании с ТЛД для индукции ремиссии была равна 1 МЕ/м<sup>2</sup>/день [76].

Переливания лимфоцитов донора как способ индукции иммунного ответа против опухолевых клеток при рецидиве лейкоза после алло-ТГСК в нашей стране применяют с 1993года. В научно-клиническом отделении высокодозной химиотерапии и трансплантации костного мозга ФГБУ ГНЦ Минздрава России впервые в России получены успешные результаты лечения пациентов с посттрансплантационным рецидивом ОЛ [131].

Первоначально переливания лимфоцитов донора при посттрансплантационном гематологическом рецидиве осуществлялись в виде монотерапии и выполнялись на развернутой картины лейкоза. Лейкоконтрат,

полученный из периферической крови донора, вводился большими дозами клеток еженедельно до достижения полной ремиссии или развития РТПХ.

В последующем с целью уменьшения опухолевой массы при гематологическом рецидиве гемобластоза перед ТЛД вводились химиотерапевтические препараты, а переливание лимфоцитов донора выполнялось после достижения ремиссии.

К 2003 году была разработана и внедрена в клиническую практику новая методика адоптивной иммунотерапии посттрансплантационных рецидивов, основанная на применении лимфоцитов донора в период миелотоксического агранулоцитоза после курса ХТ, причем после каждой процедуры ТЛД осуществлялось введение ИЛ-2 в дозе 6 млн.МЕ. Предполагалось, что именно в период миелотоксического агранулоцитоза опухоль максимально угнетена и для восстановления донорского кроветворения созданы наилучшие условия. Введение ИЛ-2 предложено в расчете на его активизирующее влияние на донорские иммунокомпетентные клетки. Кроме того, указанная методика лечения посттрансплантационного рецидива предполагала поддерживающую терапию ИЛ-2 в течение нескольких лет, с целью контроля над минимальной резидуальной болезнью [8].

Именно данная схема адоптивной иммунотерапии сопровождалась наилучшими результатами лечения посттрансплантационного рецидива гемобластоза, однако в данной группе больных была зафиксирована весьма высокая частота РТПХ.

С целью снижения риска РТПХ при ТЛД в 2011г была модифицирована предыдущая схема адоптивной иммунотерапии. Новый алгоритм терапии заключался в конкретизации начальной дозы переливаемых  $CD3^+$ клеток на уровне  $1 \times 10^7$ клеток/кг с последующей эскалацией дозы  $CD3^+$ клеток при каждом переливании на  $5 \times 10^7$ клеток/кг [18].

На основании результатов многочисленных исследований по применению ТЛД были сформулированы факторы, определяющие эффективность данного

метода [22, 87, 120]. Одними из первых были выделены нозологическая форма заболевания и фаза заболевания на момент ТЛД (цитогенетический или гематологический рецидив). Позднее выделен временной фактор – интервал от трансплантации аллогенных гемопоэтических клеток до рецидива, а также фаза заболевания на момент алло-ТГСК и другие.

В первых исследованиях в этой области было показано, что эффективность ТЛД зависела от величины опухолевой массы на момент начала трансфузий [76]. Так, у больных с молекулярным или цитогенетическим посттрансплантационным рецидивом ХМЛ частота достижения повторной ремиссии в результате применения ТЛД более 80%, при гематологическом рецидиве составляет 50-70%, а при рецидиве в виде бластного криза всего лишь 15 - 35% [62, 81]. При других нозологических формах результаты терапии посттрансплантационного рецидива весьма различны. Так при ОМЛ переливания лимфоцитов донора способствуют достижению ремиссии у 35 — 65% больных [45, 56, 115, 130], а при ОЛЛ - 15-30% [46, 160].

Важное значение величины опухолевой массы перед началом ТЛД подтвердило ретроспективное исследование, в котором были проанализированы результаты адоптивной иммунотерапии 140 пациентов с посттрансплантационным рецидивом гемобластоза. Так, частота ремиссий после завершения адоптивной иммунотерапии была выше у пациентов с цитогенетическим рецидивом и хронической фазой ХМЛ (76%). Если адоптивная иммунотерапия выполнялась в фазу акселерации или бластного криза результаты адоптивной иммунотерапии были хуже (33% и 17%, соответственно). У больных с ОМЛ и ОЛЛ, которым проводились ТЛД на фоне развернутого рецидива, частота повторных ремиссий равнялась 15% и 18%, соответственно [48].

У больных с лимфопролиферативными заболеваниями ТЛД обеспечивают более оптимистичные результаты. Так, частота повторных ремиссий при множественной миеломе (ММ) колеблется от 40% до 65% [102, 153], при лимфогранулематозе (лимфома Ходжкина) – от 45% до 55% больных [114], при



фолликулярной лимфоме – от 75% до 85% больных [39, 132] и при диффузной В-крупноклеточной лимфоме равна 60% [38, 95].

Существенные отличия частоты достижения повторной ремиссии в результате терапии лимфоцитами донора у больных с разными заболеваниями обусловлены несколькими причинами: различной кинетикой опухолевых клеток при определенных формах гемобластозов, более выраженной экспрессией антигенов комплекса гистосовместимости и костимуляторных молекул на опухолевых клетках ХМЛ по сравнению с ОЛ, секрецией цитокинов опухолевыми клетками, ингибирующими активированные лимфоциты, экспрессией FASL (FAS ligand, лиганд рецептора смерти), предотвращающего апоптоз клетки, и наличием специфических опухолевых антигенов на злокачественных клетках, позволяющих избегать контакта с донорскими цитотоксическими Т-лимфоцитами [82].

Другим объяснением более низкой эффективности ТЛД при ОЛ является высокая скорость пролиферации лейкемического клона во время рецидива и относительно медленное действие эффекта РТПЛ. Для индукции эффекта «трансплантат против лейкоза» требуется несколько недель. За это время предшественники цитотоксических клеток донора активируются комплексом антигена и молекул МНС I класса МНС (major histocompatibility complex, главный комплекс гистосовместимости), пролиферируют и дифференцируются под действием ИЛ-2. Сформированные цитотоксические клетки донора циркулируют в кровеносной и лимфатической системах. При получении сигнала активации от Т-хелперов начинает пролиферировать определённый клон цитотоксических клеток [62, 75].

Высокая частота достижения ремиссий после ТЛД на фоне хронической фазы ХМЛ, цитогенетического и/или молекулярного рецидивов гемобластозов может быть объяснена более медленной скоростью пролиферации опухоли и наличием времени, необходимого для формирования РТПЛ. У пациентов с развернутым рецидивом гемобластога опухолевые клетки прогрессируют намного

быстрее, таким образом, быстро прогрессирующие гемобластозы менее чувствительны к иммунотерапии [35]. В этом случае для эррадикации опухолевых клеток и индукции повторной ремиссии проводится химиотерапия.

В работе, проведенной J. Miller и соавт., отмечено, что применение ТЛД после предварительного выполнения курсов ХТ, сопряжено с более высокой частотой развития РТПХ, по сравнению с монотерапией лимфоцитами донора. У больных, которым до ТЛД проводилась химиотерапия циклофосфамидом и флударабином, острая РТПХ I – II степени была диагностирована в 60% случаев, а III – IV степени - 47% случаев. При этом в группе больных, получивших только ТЛД, частота острой РТПХ была значительно ниже и составляла 24% и 14% соответственно [98].

Таким образом, для достижения максимального противоопухолевого эффекта за счет РТПЛ при минимальном риске развития РТПХ и токсичности, T. Guillaume и соавт. предложили не только эскалировать дозу CD3<sup>+</sup>клеток при последующих трансфузиях, а также увеличивать дозы химиотерапевтических препаратов, вводимых до ТЛД [65].

В настоящее время среди подходов, направленных на уменьшение частоты РТПХ, рассматривается селективное удаление CD8<sup>+</sup> клеток из лейкоконцентрата [107]. Также в качестве метода, повышающего эффективность РТПЛ, было предложено переливать лимфоциты от гаплоидентичного донора [106, 126]. Проводятся исследования по определению и выделению для последующих трансфузий Т-лимфоцитов, специфичных к антигенам бластных клеток (*WT1*, *PRI*) [41] или к минорным антигенам гистосовместимости (mHAgS) [124]. В последние годы получил развитие метод трансфузий генетически модифицированных лимфоцитов донора [40, 77, 152] и противоопухолевых вакцин [33, 34, 123].

ТЛД для лечения посттрансплантационных рецидивов гемобластоза могут использоваться как в виде монотерапии, так и после введения химиотерапевтических препаратов [113]. Для определенных нозологических форм

ТЛД могут комбинироваться с противоопухолевыми препаратами биологически направленного действия. Так для больных с рецидивом Rh-положительного ОЛ или ХМЛ после последовательного применения ХТ и ТЛД назначают ингибиторы тирозинкиназ (иматиниб, нилотиниб, дазатиниб) [62, 137, 141, 150, 161]. При посттрансплантационном рецидиве ОМЛ, трансформировавшегося из МДС, или МДС переливания лимфоцитов донора комбинируют с гипометилирующими препаратами (азациитидин) [50, 89]. При посттрансплантационном рецидиве множественной миеломы (ММ) в качестве препаратов биологически направленного действия после ТЛД применяют ингибиторы протеасом (бортезомиб) [102, 153] или иммуномодулирующие препараты (леналидомид, талидомид) [84]. При рецидиве лимфопролиферативных заболеваний кроме ХТ и ТЛД дополнительно включают моноклональные антитела [104, 114].

В случае гематологического рецидива гемобластоза после алло-ТГСК, в большинстве трансплантационных центров лечебный процесс начинается с назначения 1-2 курсов ХТ, которые направлены в первую очередь на уменьшение опухолевой массы. Однако пока еще не существует единого мнения об интенсивности проводимой химиотерапии: высокие или малые дозы цитарабина, FLAG-Ida, «7+3-Ida» [3, 22, 96, 105, 134]. Не определены четкие сроки выполнения первой ТЛД после курса ХТ: в период аплазии или после достижения повторной ремиссии [52, 97]. Не уточнено необходимое количество переливаемых CD3<sup>+</sup> клеток. Не определена необходимость и целесообразность сочетания ТЛД с таргентными препаратами (ингибиторы тирозинкиназ, ингибиторы протеасом) [102, 150], цитокинами (ИЛ-2, ИНФ-альфа) [76, 103, 117].

Некоторыми учеными рекомендовано выполнять первую ТЛД после достижения с помощью ХТ повторной ремиссии и восстановления полного донорского химеризма. Несмотря на значительную частоту повторной ремиссии (42-65%) у больных с посттрансплантационным рецидивом ОМЛ общая выживаемость остается низкой (19-30%). Основными причинами высокой летальности являются рецидив и прогрессия ОМЛ, а также тяжелое течение

РТПХ [35, 45]. Повторная ремиссия может быть достигнута после трансфузий лимфоцитов донора без использования предварительной химиотерапии, однако это характерно для заболеваний с медленной опухолевой прогрессией, например ХМЛ, ММ [51, 82, 102].

Большинство исследователей, изучавших эффективность адоптивной иммунотерапии при посттрансплантационном рецидиве гемобластоза, убедительно доказали совместное существование двух иммунологических феноменов: РТПХ и РТПЛ. Авторы выявили прямую корреляцию между эффективностью переливаний лимфоцитов донора и развитием РТПХ [22, 82]. По данным D. Porter и соавт. у 89% больных, достигших ремиссию после адоптивной иммунотерапии, была диагностирована острая РТПХ [116].

A. Raiola и соавт. в своей работе показали, что острая РТПХ после адоптивной иммунотерапии является показателем длительного сохранения полученного эффекта [120].

В работе О.А. Слесарчук и соавт. отражено статистически достоверное влияние хронической РТПХ, развившейся после переливаний лимфоцитов донора, на длительность сохранения ответа. Так, четырехлетняя общая выживаемость всех пациентов и двухлетняя безрецидивная выживаемость пациентов, ответивших на адоптивную иммунотерапию и получивших профилактические ТЛД, при развитии хронической РТПХ после ТЛД составила 64% и 53%, соответственно. У больных без хронической РТПХ после адоптивной иммунотерапии данные показатели были равны 11% и 13%, соответственно [22].

Однако не во всех работах была выявлена зависимость эффекта после адоптивной иммунотерапии от частоты манифестации РТПХ [85].

Попытки разделения этих двух иммунологических феноменов (РТПЛ и РТПХ) предпринимаются различными методами: использование небольших доз лимфоцитов донора с последующей эскалацией количества перелитых клеток, выделение (селекция) для переливания популяции лимфоцитов ответственных за

противоопухолевый ответ, переливание лимфоцитов донора на фоне иммуносупрессивной терапии [92].

Несмотря на большое количество исследований, направленных на определение оптимальной дозы переливаемых лимфоцитов донора, до сих пор нет единого мнения о дозе  $CD3^+$  клеток, которая индуцировала бы РТПЛ при минимальном риске развития острой РТПХ.

Так, в публикациях зарубежных авторов представлены противоположные мнения в отношении зависимости результатов адоптивной иммунотерапии от дозы перелитых  $CD3^+$  клеток. В одних работах утверждалось, что доза  $CD3^+$  клеток не оказывала влияние на эффективность адоптивной иммунотерапии, длительность сохранения ответа и частоту РТПХ. Однако, в других работах была показана зависимость частоты достижения ремиссии и диагностирования РТПХ от количества перелитых лимфоцитов донора [22, 93, 116, 139, 160].

В исследовании S. Maskinnon и соавт., у больных с посттрансплантационным рецидивом ХМЛ была определена оптимальная доза переливаемых  $CD3^+$  клеток для индукции РТПЛ, которая составила  $1 \times 10^7 CD3^+$  клеток/кг веса больного [92].

В 2013 году были опубликованы результаты ретроспективного исследования, проведенного M. Van и соавт. в нескольких трансплантационных центрах США, в котором было оценено влияние начальной дозы  $CD3^+$  клеток на частоту РТПХ и общую выживаемость больных при лечении посттрансплантационного рецидива гемобластоза. Полученные результаты доказали эффективность и низкий риск развития РТПХ после ТЛД в начальной дозе менее  $10 \times 10^7 CD3^+$  клеток/кг. [31]. Наиболее важным прогностическим фактором, влияющим на показатели выживаемости после терапии лимфоцитами донора, оказалось время от алло-ТГСК до констатации рецидива ОЛ.

Поскольку одним из основных осложнений терапии лимфоцитами донора является РТПХ, частота которой может составлять от 10% до 50% [159], S. Maskinnon и соавт., с целью снижения частоты РТПХ предложил новую

тактику переливания лимфоцитов донора. Так, реципиентам с посттрансплантационным рецидивом ХМЛ выполнялось несколько последовательных трансфузий, начиная с низких доз с последующей эскалацией дозы клеток через определенные интервалы времени [92]. Авторы показали, что используя небольшие дозы клеток возможна индукция РТПЛ без развития РТПХ. В дальнейшем эффективность данной схемы терапии изучалась и другими исследователями [52, 65].

С целью повышения эффективности адоптивной иммунотерапии, а также предупреждения иммунного конфликта в виде РТПХ возможно применение селектированной субпопуляции Т-лимфоцитов. Данный метод позволяет выделить из лейкоконцентрата те популяции лимфоцитов, которые обладают наиболее выраженным противоопухолевым эффектом (Т-хелперы, НК-клетки) и удалить иммунокомпетентные клетки, ответственные за развитие РТПХ (цитотоксические Т-лимфоциты). [43, 79, 107, 126, 128].

Применение трансфузий НК–клеток рассматривается в настоящее время в качестве перспективного инновационного метода иммунотерапии. Основным преимуществом НК – клеточной терапии является способность индукции РТПЛ, не вызывая при этом РТПХ [92].

Наиболее выраженный эффект «трансплантат против лейкоза» после трансфузий НК – клеток от гаплоидентичного донора, особенно в условиях несоответствия KIR-лиганда между донором и реципиентом [64, 126].

В исследовании J.E. Rubnitz и соавт. пациентам с высоким риском посттрансплантационного рецидива ОМЛ выполнялись трансфузии НК–клеток после введения малых дозах флударабина и циклофосфамида. Все больные в течение двух лет после адоптивной иммунотерапии были живы без признаков лейкоза и РТПХ, сохраняя полный донорский химеризм. Таким образом, было показано, что трансфузии НК – клеток являются безопасным и эффективным методом профилактики рецидива после алло-ТГСК [126].

В литературе представлены также сведения о том, что этот метод может быть использован для лечения посттрансплантационного рецидива гемобластоза[58]. S. Nguyen и соавт. описали клинический случай достижения ремиссии у больного с рецидивом ОМЛ после гаплоидентичной алло-ТГСК с помощью трансфузий НК – клеток. До трансфузий НК – клеток больному была проведена циторедуктивная терапия, а после трансфузии вводился рекомбинантный ИЛ-2 [106].

Среди других методов, направленных на снижение частоты РТПХ после адоптивной иммунотерапии является переливание лимфоцитов донора в комбинации с иммуносупрессивной терапией. В работе X.J. Huang и соавт. 2-4 недельное применение циклоспорина и метотрексата во время профилактических ТЛД позволило статистически достоверно снизить частоту острой РТПХ ( $p = 0,002$ ) не увеличивая частоту рецидивов и не снижая показатели общей выживаемости [75].

ТЛД могут быть использованы и с профилактической целью при высоком риске рецидива гемобластоза после алло-ТГСК. Первое сообщение о профилактическом назначении адоптивной иммунотерапии было опубликовано E. Naparstek и соавт. в 1995 г [104].

Данное направление адоптивной иммунотерапии в настоящее время активно развивается в связи с увеличением количества алло-ТГСК, выполняемых с использованием режимом кондиционирования пониженной интенсивности или использованием миелотрансплантата, с удаленными Т-лимфоцитами [7, 100, 104, 114].

В работе A. Spyridonidis и соавт., опубликованы результаты проспективного исследования по профилактическому применению ТЛД у 56 больных ОЛ после алло-ТГСК. Кондиционирование проводилось в режиме пониженной интенсивности с использованием алемтузумаба. Критериями включения в исследование являлись высокий риск рецидива ОЛ и убывающий донорский химеризм после алло-ТГСК. В результате профилактических ТЛД полный

донорский химеризм был восстановлен у 75% больных, однако у 47% больных развилась РТПХ после трансфузий CD3<sup>+</sup> клеток в суммарной дозе 2x10<sup>6</sup> клеток/кг. Ни у одного больного, получившего профилактические ТЛД, не было констатировано рецидива ОЛ. Таким образом, выполнение профилактических ТЛД обеспечивает снижение частоты рецидивов ОЛ, однако данный метод сопряжен с высокой частотой развития РТПХ [148].

С. Lutz и соавт. в своем исследовании отметили, что у больных, которым выполнялись профилактические ТЛД по поводу убывающего донорского химеризма, отмечалась более высокая частота РТПХ, чем у больных, которым ТЛД выполнены на фоне полного донорского химеризма [90].

Применение молекулярного, цитогенетического, иммунофенотипического методов, для подтверждения полноты ремиссии, мониторинга МРБ, динамического исследования химеризма после алло-ТГСК, позволило разработать алгоритм своевременной отмены иммуносупрессивной терапии и включения в тактику терапии профилактические и лечебные ТЛД [2, 23].

### **1.3. Изменение содержания субпопуляций Т-лимфоцитов у пациентов после алло-ТГСК и ТЛД**

Выполнение алло-ТГСК сопровождается чрезвычайно глубокой и продолжительной лимфопенией, снижением содержания в крови всех субпопуляций лимфоцитов и, как следствие – выраженными нарушениями противоинфекционного и противоопухолевого иммунного ответа [5, 42, 49].

Поэтому своевременное приживление миелотрансплантата, а также полноценное восстановление всех ростков гемопоэза является залогом успеха этого вида терапии [109, 122].

Впервые состояние иммунодефицита после алло-ТГСК было описано более 40 лет назад. За это время клинические и фундаментальные исследования в трансплантологии шагнули далеко вперед. Однако поиск новых, наиболее



эффективных подходов к профилактике и лечению РТПХ, снижению частоты рецидивов и инфекционных осложнений в посттрансплантационном периоде продолжается по настоящее время [36, 42, 91, 162].

На восстановление параметров клеточного иммунитета после алло-ТГСК оказывают влияние такие факторы как возраст реципиента, нозологическая форма заболевания, степень гистосовместимости донора гемопоэтических стволовых клеток, а также интенсивность предтрансплантационного кондиционирования, источник гемопоэтических стволовых клеток и манипуляции (удаление Т-лимфоцитов из миелотрансплантата). Кроме того, отрицательное воздействие на состояние иммунитета могут оказывать инфекционные осложнения и РТПХ в посттрансплантационном периоде [109, 115].

Исследования В.Н. Вавилова и соавт., также указывали, что на кинетику восстановления кроветворения после алло-ТГСК влияют продолжительность заболевания до трансплантации, совместимость донора и реципиента по системе антигенов HLA, содержание лимфоцитов в миелотрансплантате, применение иммуносупрессивных препаратов в посттрансплантационном периоде [4].

Отсроченное восстановление клеточного иммунитета и, в частности длительное отсутствие нормализации содержания клеток различных субпопуляций лимфоцитов может явиться прогностическим фактором раннего рецидива гемобластоза или высокого риска инфекционных осложнений [42, 78].

Pavletic Z. и соавт. в своей работе показали, что общая выживаемость больных после алло-ТГСК находится в прямой зависимости от скорости восстановления абсолютного числа лимфоцитов периферической крови. Однолетняя общая выживаемость у больных, восстановивших абсолютное число лимфоцитов до 500 клеток /мкл и более на 17-й день после алло-ТГСК, составила 79%, в то время как у больных с более поздним восстановлением абсолютного количества лимфоцитов данный показатель был равен 19% [112].

Полноценность восстановления Т-клеточного звена иммунного ответа после алло-ТГСК играет важную роль в обеспечении противоопухолевого иммунитета,

и соответственно снижению частоты рецидивов. В исследовании, проведенном Bosch M. и соавт., представлены убедительные данные, подтверждающие, что вероятность рецидива зависит от времени и полноценности реконституции Т-клеточного звена лимфоцитов после аллогенной миелотрансплантации [42].

Таким образом, подавление функциональной активности Т-клеток после алло-ТГСК, приводит к потере контроля над резидуальными опухолевыми клетками и, в дальнейшем, к развитию рецидива [4, 118].

Основную роль в осуществлении противоопухолевого ответа играют Т-лимфоциты, а именно цитотоксические лимфоциты и клетки натуральные киллеры. Именно за счет активности лимфоцитарного звена иммунитета осуществляется эррадикация резидуальных опухолевых клеток [40, 115].

Среди иммунологических признаков РТПХ определены такие как экспансия цитотоксических лимфоцитов донора и повышенная продукция ИНФ-гамма цитотоксическими  $CD8^+$  и  $CD4^+$  Т-лимфоцитами донора [10]. Предполагается [74], что острая РТПХ развивается в результате воздействия цитотоксических Т-лимфоцитов донора, на клетки реципиента, что сопровождается элиминацией лимфоцитов реципиента и тяжелым иммунодефицитом.

Регуляторные клетки ( $CD4^+CD25^+$ ) могут блокировать активацию донорских цитотоксических лимфоцитов и, следовательно, препятствовать этой субпопуляции Т-лимфоцитов индуцировать острую РТПХ. Характерным признаком Т-регуляторных клеток является высокий уровень экспрессии  $\alpha$ -цепи рецептора к ИЛ-2. Клетки с высокой экспрессией антигена  $CD25$  ( $CD25^{high}$ ), Foxp3<sup>+</sup> обладают наибольшей иммуносупрессивной активностью. Количество Т-регуляторных клеток в норме составляет 2,6 – 5,2% [86]. Показано, что эти клетки способны пролиферировать в ответ на стимулирующие антигены только в присутствии ИЛ-2 и при активации подавляют пролиферацию как наивных  $CD4^+$ ,  $CD8^+$  Т-клеток, так и эффекторных Т-клеток  $CD4^+CD25^-$ , цитотоксических Т-клеток памяти, а также клеток натуральных киллеров и В-лимфоцитов через контактзависимый механизм [5, 73].

По данным Q. Li и соавт. количество Т-регуляторных клеток снижается при РТПХ. Так, у реципиентов с нормальным или высоким числом  $CD4^+CD25^{high}$  клеток РТПХ не развивалась или была легкой степени, при этом все больные выжили. Напротив, у реципиентов с низким содержанием Т-регуляторных клеток или их отсутствием, развивалась тяжелая РТПХ и все больные умерли в течение 1 года после трансплантации [86].

Клетки натуральные киллеры (NK- клетки) мигрируют в зону локализации опухолевых клеток под воздействием ИНФ-гамма, продуцируемого Т-хелперами I типа. ИНФ-гамма обеспечивает направленную миграцию NK-клеток. Они не обладают антигенной специфичностью, не требуют антигензависимой дифференцировки. NK-клетки способны сразу оказать цитотоксическое воздействие, обнаружив злокачественную клетку [108].

Таким образом, определение абсолютного количества субпопуляций Т-лимфоцитов периферической крови после алло-ТГСК может выявить пациентов с высоким риском рецидива. Вероятно, именно этим больным целесообразно проведение иммунотерапии, направленной на стимуляцию механизмов иммунного ответа и контроль над резидуальными опухолевыми клетками [118].

Одним из вариантов адоптивной иммунотерапии является цитокиновая терапия, с применением, например ИЛ-2 или ИНФ-альфа [19, 103]. Другим наиболее эффективным способом являются переливания лимфоцитов донора, которые используются у реципиентов для профилактики и лечения рецидива после алло-ТГСК [81, 116, 133].

Несмотря на большое количество исследований, посвященных изучению эффектов РТПХ и РТПЛ, индуцированных трансфузиями лимфоцитов донора, опубликованные данные об изменениях количественного и качественного состава популяций Т-лимфоцитов при рецидиве гемобластоза после алло-ТГСК немногочисленны [42, 65, 82].

Итак, многочисленные исследования, посвященные изучению различных аспектов, касающихся развития рецидива и возникновения РТПХ после

алломиелотрансплантации при гемобластозах, свидетельствует о высокой актуальности этой проблемы. Не меньшее внимание уделяется поиску наиболее эффективных лечебных методик, направленных на купирование и предупреждение посттрансплантационных рецидивов. До сих пор не найдено четких ответов на вопросы о схемах и интенсивности адоптивной иммунотерапии. Все это указывает на целесообразность выполнения новых исследований, которые позволят разработать наиболее адекватный алгоритм лечения гемобластозов с помощью применения трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток.

## Глава 2. Характеристика больных и методы исследования

### 2.1. Клиническая характеристика больных

Исследование выполнено в научно-клиническом отделе химиотерапии гемобластозов, депрессий кроветворения и трансплантации костного мозга ФГБУ Гематологический научный центр Минздрава России (Генеральный директор - академик РАМН, профессор, д.м.н. В.Г. Савченко, заведующая отделом – д.м.н. Е.Н. Паровичникова) в период с октября 2010 года по октябрь 2013года. Исследование одобрено Локальным этическим комитетом ФГБУ Гематологический научный центр Минздрава России.

В работу включены 52 больных, которым проводилась адоптивная иммунотерапия после трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток от гистосовместимого родственного (n=49) или неродственного донора (n=3).

У 35 больных был диагностирован ОМЛ, у 4-х больных - ОЛЛ, у 9 больных – ХМЛ и у 4 больных МДС (Рисунок 1).

Возраст больных на момент проведения терапии лимфоцитами донора составлял от 16 до 60 лет (медиана 31 год), 32 мужчины и 20 женщин.

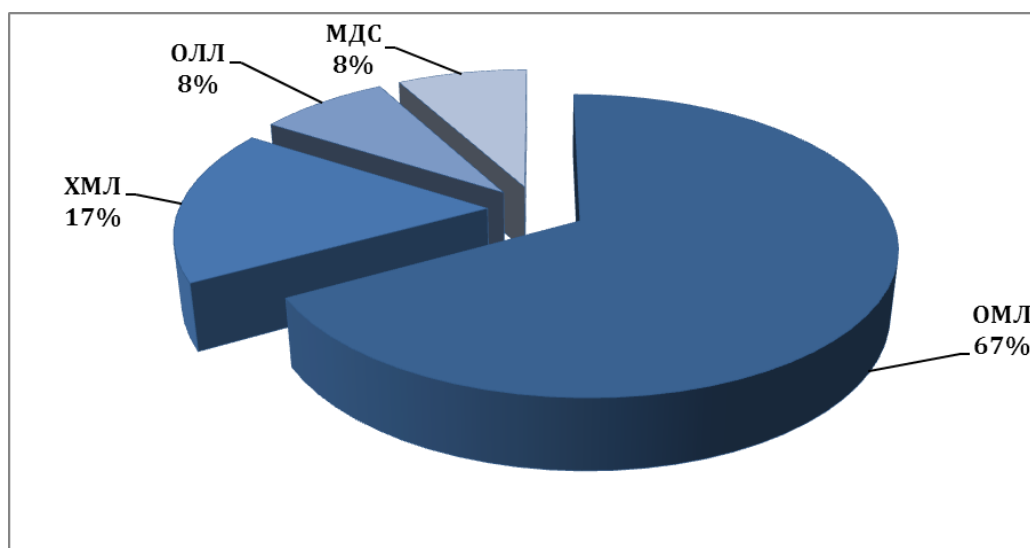


Рисунок 1. Распределение пациентов в зависимости от диагноза

В соответствии с классификацией FAB, цитохимические варианты ОМЛ были представлены следующим образом: недифференцированный (M0) – в 6 (17%) случаях, миелобластный с минимальным созреванием (M1) – в 5 (14%), миелобластный с созреванием (M2) – в 6 (17%), промиелоцитарный (M3) – в 3 (9%), миеломонобластный вариант (M4) – в 13 (37%), эритробластный (M6) – в 2 (6%) случаях. Среди 4-х больных ОЛЛ в одном случае был определен ранний преВ-вариант и в 3 случаях - преВ-вариант.

На момент проведения алло-ТГСК 23 из 39 (59%) больных ОЛ находились в первой клинико-гематологической ремиссии, 5 (13%) больных - во второй полной ремиссии ОЛ, 11 (28%) больных - вне ремиссии заболевания (у 8 был констатирован рецидив и у 3 - резистентное течение).

Среди 9 больных ХМЛ к моменту выполнения алло-ТГСК у 5 была диагностирована первая хроническая фаза (ХФ), у 3-х больных - фаза акселерации (ФА) и у 1-го больной - бластный криз ХМЛ.

Среди 4 больных МДС у 1 больной была диагностирована рефрактерная анемия, у второй - рефрактерная анемия с избытком бластов I (РАИБ I), у третьей больной - рефрактерная анемия с избытком бластов II (РАИБ II) и у четвертой - 5q- синдром.

У 42 из 52 (81%) больных, как дебют заболевания, так и последующее течение гемобластоза сопровождалось наличием одного или нескольких факторов неблагоприятного прогноза, свидетельствующих о высоком риске рецидива заболевания. Так, в 3-х случаях в дебюте заболевания был выявлен гиперлейкоцитоз, в 12 случаях - неблагоприятные хромосомные аномалии в виде моносомии 7 или 5 хромосомы, а также делеции 5 хромосомы. В 5 случаях ОМЛ был диагностирован после завершения химиотерапии по поводу другого онкологического заболевания (так называемый вторичный ОМЛ), в 7 случаях - трансформировался из МДС. В 3-х случаях алло-ТГСК выполнялась в период второй ремиссии ОЛ и еще в 15 случаях вне ремиссии гемобластоза. У 11 больных течение гемобластоза осложнилось первичной резистентностью к

проводимой химиотерапии. У 4 больных ХМЛ алло-ТГСК выполнялась в фазе акселерации или бластного криза (Таблица 1).

**Таблица 1. Факторы высокого риска развития рецидива, отмечавшиеся в дебюте заболевания и перед алло-ТГСК (n = 42)**

Диагноз	Фактор риска рецидива	Количество больных (n=52)
ОЛ (n=39) (ОМЛ + ОЛЛ)	Гиперлейкоцитоз в дебюте заболевания	3
	ОМЛ, трансформация из МДС	7
	ОЛ с неблагоприятными хромосомными аномалиями	8
	Миеломонобластный вариант ОМЛ	13
	Вторая ремиссия ОЛ	3
	Вторичный ОМЛ (обусловлен предшествующей химиотерапией)	5
	Первичная резистентность к ХТ	11
	Рецидив/резистентное течение до алло-ТГСК	15
ХМЛ (n=9)	Фаза акселерации	3
	Фаза бластного криза	1
МДС (n=4)	Неблагоприятными хромосомными аномалиями	4
	Рефрактерная анемия с избытком бластов	2

## **2.2. Протокол трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток**

Совместимость родственного донора и реципиента по антигенам HLA –A,–B,–C,–DR,–DQ выявляли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) (лаборатория молекулярной гематологии ФГБУ ГНЦ Минздрава России, зав. лаб. д.б.н. Судариков А.Б.) и/или в реакции смешанной культуры лимфоцитов, заключавшейся в совместном культивировании лимфоцитов реципиента и донора (лаборатория иммуногематологии ФГБУ ГНЦ Минздрава России, зав. лаб. д.м.н. Головкина Л.Л.).

При отсутствии у пациента родственных HLA–совместимых сиблингов поиск неродственных доноров проводили в Международном регистре доноров гемопоэтических стволовых клеток. HLA-типирование и обследование потенциальных доноров, сбор гемопоэтических стволовых клеток

периферической крови осуществляли в зарубежных трансплантационных центрах, имеющих право осуществлять вышеуказанную деятельность по подготовке и обследованию донора, а также заготовке миелотрансплантата. Все три реципиента неродственных гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) были полностью гистосовместимы с донором.

Предтрансплантационное кондиционирование по миелоаблативной программе выполнено 33 больным. Кондиционирование в режиме пониженной интенсивности проведено 19 больным. Схемы кондиционирования и дозы препаратов указаны в таблице 2.

**Таблица 2. Режимы кондиционирования**

Кондиционирование	Препараты	Количество больных
Миелоаблативный режим (n=33)	бусульфан 4мг/кг/сутки 4 дня циклофосфамид 60мг/кг/сутки 2 дня	29
	тотальное облучение тела 4 Грея/сутки 3 дня циклофосфамид 60мг/кг/сутки 2 дня	4
Режим пониженной интенсивности (n=19)	флюдарабин 30мг/м <sup>2</sup> /сутки 6 дней бусульфан 4мг/кг/сутки 2 дня АТГ 20мг/кг/сутки 4 дня	11
	флюдарабин 30мг/м <sup>2</sup> /сутки 5 дней кармустин 200мг/м <sup>2</sup> /сутки 2 дня бусульфан 4мг/кг/сутки 2 дня АТГ 20мг/кг/сутки 2 дня	3
	флюдарабин 30мг/м <sup>2</sup> /сутки 6 дней бусульфан 4мг/г/сутки 2 дня цитарабин 3г/м <sup>2</sup> /сутки 2 дня идарубицин 12мг/м <sup>2</sup> /сутки 4 дня +/- АТГ 20мг/кг/сутки 2 дня	1
	циклофосфамид 60мг/кг/сутки 2 дня АТГ 20мг/кг/сутки 2 дня	1
	флюдарабин 30мг/м <sup>2</sup> /сутки 6 дней бусульфан 4мг/г/сутки 2 дня цитарабин 3г/м <sup>2</sup> /сутки 2 дня	1
	флюдарабин 30мг/м <sup>2</sup> /сутки 5 дней BCNU 200мг/м <sup>2</sup> /сутки 2 дня мелфалан 140мг/м <sup>2</sup> /сутки 1 день АТГ 20мг/кг/сутки 2 дня	1



Всем реципиентам, имевшим HLA-совместимого родственного сиблинга, был трансплантирован костный мозг (n=49), при трансплантации от неродственного донора (n= 3) источником ГСК была периферическая кровь.

Забор костномозговой взвеси осуществлялся в условиях операционной при строгом соблюдении правил асептики. Количество трансплантированных миелокарицитов варьировало от 2,2 до  $7,0 \times 10^8$  клеток/кг (медиана -  $3,5 \times 10^8$  клеток/кг).

У неродственных доноров мобилизацию ГСК осуществляли с помощью гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (Г-КСФ). Процедуру сбора проводили методом автоматического лейкоцитафереза на сепараторах клеток крови. Количество трансплантированных гемопоэтических стволовых клеток составило от 5,3 до  $8,1 \times 10^6$  CD34<sup>+</sup> клеток/кг.

Профилактика РТПХ осуществлялась по стандартной схеме метотрексатом и циклоспорином у 30 пациентов с острыми лейкозами, которым предтрансплантационное кондиционирование проводили в миелоаблативном режиме. У 7 больных ХМЛ в схему профилактики дополнительно включали преднизолон. 14 больным ОЛ и МДС, которым проводили предтрансплантационное кондиционирование в режиме пониженной интенсивности, дополнительно назначали мофетил микофенолат. Одному пациенту со вторым рецидивом ОМЛ профилактика РТПХ осуществлена только циклофосфамидом.

### **2.3. Исследование гемопоэтического химеризма после алло-ТГСК**

Исследование костно-мозгового химеризма у реципиентов алломиелотрансплантата проводили через 1, 3, 6, 9 и 12 месяцев, а затем каждые 6-12 месяцев после алло-ТГСК.

Состояние гемопоэтического химеризма изучали с использованием молекулярно-биологического (лаборатория молекулярной гематологии, зав. лаб. д.б.н. А.Б. Судариков), стандартного цитогенетического и молекулярно-

цитогенетического методов исследования (научно-клиническая лаборатория кариологии ФГБУ ГНЦ Минздрава России, зав. лаб. к.м.н. Т.Н. Обухова).

Анализ гипервариабельных участков ДНК, содержащих тандемные повторы *STR/VNTR* (short tandem repeat/variable number tandem repeats – короткие тандемные повторы/варьирующие числом тандемные повторы) выполняли с помощью метода ПЦР. В случае различия донора и реципиента по полу контроль донорского химеризма осуществляли с помощью стандартной цитогенетики и методом флюоресцентной *in situ* гибридизации (FISH) с исследованием прямых ДНК-зондов к центромерным участкам X и Y хромосом.

Кроме того, у больных ХМЛ использовались методики FISH и ПЦР для контроля за цитогенетическими и молекулярными маркерами заболевания.

При оценке результатов исследования донорского химеризма ориентировались на следующие понятия [26]:

Так, «полный донорский химеризм» подразумевает обнаружение в костном мозге реципиента 100% клеток донора. Термин «смешанный химеризм» используют для описания ситуаций, когда после алло-ТГСК в костном мозге обнаруживают клетки реципиента и донора одновременно.

Стабильный смешанный химеризм диагностируется при обнаружении относительно постоянного соотношения клеток донора и реципиента (колебания менее 5%) в двух и более последовательно исследованных образцах костного мозга. При этом содержание донорских клеток может составлять около 80%. Возрастающий (или убывающий) донорский химеризм устанавливается при выявлении увеличения (или уменьшения) числа донорских клеток более чем на 5% от предыдущего уровня.

Поскольку стандартные методы изучения химеризма характеризуются чувствительностью от 1-5% до 0,1% [2], мы использовали понятие «полный донорский химеризм» при содержании донорских клеток в костном мозге 97% и более.

В момент констатации рецидива после алло-ТГСК исследование

кроветворения включало как подсчет количества бластных клеток в миелограмме (клинико-диагностическая лаборатория ФГБУ ГНЦ Минздрава России, зав. лаб. к.м.н. В. Н. Двирнык), так и определение состояния донорского химеризма. В течение всего периода проведения адоптивной иммунотерапии костный мозг реципиента исследовали каждые 2-4 недели с целью контроля противоопухолевого ответа и мониторинга гемопоэтического химеризма.

#### **2.4. Адоптивная иммунотерапия после алло-ТГСК**

ТЛД после алло-ТГСК выполнялись 52 больным с гемобластозами. Показанием для адоптивной иммунотерапии послужили гематологический рецидив (у 44 больных) или убывающий донорский химеризм (у 8 больных). Убывающий донорский химеризм подтверждался снижением содержания донорского кроветворения на 5 и более процентов в 2-х исследованиях костного мозга реципиента с интервалом 2-3 недели. В 6 случаях был предпринят второй эпизод адоптивной иммунотерапии ТЛД в связи с повторным гематологическим рецидивом гемобластоза.

Таким образом, в исследование было включено 58 эпизодов адоптивной иммунотерапии. Число всех переливаний лимфоцитов донора составило 183.

Адоптивная иммунотерапия посттрансплантационного рецидива выполнялась по двум основным схемам:

1. Монотерапия ТЛД (n= 15);
2. ТЛД после введения химиотерапевтических препаратов (n= 29):
  - ТЛД после неэффективной предшествующей химиотерапии (n= 2);
  - ТЛД на фоне ремиссии, после проведенной химиотерапии (n= 4);
  - ТЛД в период миелотоксического агранулоцитоза после курса химиотерапии (n= 23).

Доза перелитых лимфоцитов донора и кратность трансфузий колебалась в широких пределах. Так, количество CD3<sup>+</sup>клеток, перелитых за одну трансфузию равнялось от 1 до 29x10<sup>7</sup>CD3<sup>+</sup>клеток/кг. При этом у 18 пациентов однократная

доза перелитых клеток составляла от 1 до  $5,0 \times 10^7$  CD3<sup>+</sup>клеток/кг; в 22 случаях однократная доза CD3<sup>+</sup>клеток колебалась от 5,0 до  $10 \times 10^7$  CD3<sup>+</sup>клеток/кг и в 12 случаях - от 10 до  $29 \times 10^7$  CD3<sup>+</sup>клеток/кг.

Суммарное количество перелитых CD3<sup>+</sup>клеток за весь период адоптивной иммунотерапии у каждого больного составляло от 1 до  $76 \times 10^7$  клеток/кг. В 15 случаях суммарная доза CD3<sup>+</sup>клеток составила менее  $10 \times 10^7$  клеток/кг, 16 пациентам было перелито от 10 до  $25 \times 10^7$  клеток/кг, 15 пациентам - от 25 до  $50 \times 10^7$  клеток/кг и в 6 случаях суммарная доза достигала уровня от 50 до  $76 \times 10^7$  клеток/кг.

Каждому больному было выполнено от 1 до 8 трансфузий лимфоцитов донора. Однократно лимфоциты донора были перелиты в 9 случаях, дважды лимфоциты донора переливали в 13 случаях, трижды – в 11 случаях, четыре и более раз – в 19 случаях.

## **2.5. Протокол адоптивной иммунотерапии**

В отделении трансплантации костного мозга ФГБУ ГНЦ Минздрава России для лечения посттрансплантационного рецидива гемобластоза ТЛД используются более 20 лет. Первоначально лимфоциты донора переливали в виде монотерапии без предшествующего введения химиотерапевтических препаратов. В этот период времени доза перелитых лимфоцитов за 1 трансфузию составляла от 3,5 до  $29 \times 10^7$  CD3<sup>+</sup>/кг, а суммарная доза за все переливания - от 18 до  $76 \times 10^7$  CD3<sup>+</sup>/кг. Переливали лимфоциты донора 1 раз в неделю, число трансфузий колебалось от 4 до 8.

Критерии прекращения иммунотерапии были следующими: достижение ремиссии с восстановлением полного донорского химеризма, отсутствие эффекта и прогрессия лейкоза, возникновение острой РТПХ (II и более степени).

Позднее с целью уменьшения объема опухолевой массы стали проводить курсы химиотерапии, а переливания лимфоцитов донора выполняли после достижения ремиссии.

Схема химиотерапии и ее интенсивность при посттрансплантационном гематологическом рецидиве зависели от нозологической формы гемобластоза и соматического состояния пациента. Различные схемы химиотерапевтических препаратов, применявшихся перед ТЛД, представлены в таблице 3.

В 2003 году был разработан и внедрен в клинику алгоритм лечения посттрансплантационных рецидивов, основанный на применении ТЛД в период миелотоксического агранулоцитоза после курса ХТ, причем каждая процедура ТЛД сопровождалась введением ИЛ-2 в дозе 6 млн.МЕ. Предполагалось, что именно в период миелотоксического агранулоцитоза опухоль максимально угнетена и для восстановления донорского кроветворения созданы наилучшие условия. Введение ИЛ-2 предложено в расчете на его активизирующее влияние на донорские иммунокомпетентные клетки.

В случае достижения полного ответа, то есть ремиссии с восстановлением полного донорского химеризма, и при отсутствии РТПХ проводилась поддерживающая терапия ИЛ-2 (5-дневный курс по 2 млн. МЕ/день). Интервал между курсами 4-5 недель, длительность поддерживающей терапии ориентировочно 2 года [3, 8, 93].

В 2011 году протокол адоптивной иммунотерапии был модифицирован. Первая ТЛД по-прежнему выполнялась в период миелотоксического агранулоцитоза после противорецидивного курса ХТ. Но был систематизирован объем переливаемых клеток. Так, доза  $CD3^+$ клеток, переливаемых в первую процедуру, была определена в пределах  $1 \times 10^7 CD3^+$ клеток/кг массы тела реципиента, последующие трансфузии осуществлялись с увеличением (эскалацией) дозы клеток: при второй трансфузии -  $5 \times 10^7 CD3^+$ клеток/кг массы тела реципиента, при третьей трансфузии -  $10 \times 10^7 CD3^+$ клеток/кг массы тела

реципиента. После каждой трансфузии внутривенно вводился ИЛ-2 в дозе 6 млн.МЕ. Интервал между трансфузиями составлял 2-4 недели [18].

**Таблица 3. Курсы химиотерапии, проводимой перед ТЛД у пациентов с посттрансплантационным рецидивом**

Диагноз	Курс ХТ	Препараты	Число больных
ОМЛ/ МДС	«7+3» (Ida) (с идарубицином)	цитарабин 100 мг/м <sup>2</sup> x 2 раза в сутки, дни 1-7 идарубицин 12 мг/м <sup>2</sup> x 1 раз в сутки, дни 1-3	18
	«7+3» (Mito) с митоксантроном	цитарабин 100 мг/м <sup>2</sup> x 2 раза в сутки, дни 1-7 митоксантрон 10 мг/м <sup>2</sup> x 1 раз в сутки, дни 1-3	1
	Малые дозы цитарабина +/- гранулоцитарно- макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ)	цитарабин 10 мг/м <sup>2</sup> x 2 раза в сутки, подкожно, дни 1-28 ГМ-КСФ 2 мкг/кг x 1 раз в сутки, подкожно, с 1-го по 7-й день после первой ТЛД	3
	децитабин	децитабин 20 мг/м <sup>2</sup> x 1 раз в сутки, дни 1-5	1
ОЛЛ	Индукция по протоколу ОЛЛ-2009 (предфаза, 1 фаза индукции)	дексаметазон 10 мг/м <sup>2</sup> x 1 раз в сутки, дни 1-28 даунорубицин 45 мг/м <sup>2</sup> x 2 раз в сутки, дни 8,15, 22 винкристин 2 мг/м <sup>2</sup> x 1 раз в сутки, дни 8,15, 22 L-аспарагиназа — не вводилась в связи с печеночной недостаточностью	1
	RACOP	даунорубицин 45 мг/м <sup>2</sup> x 1 раз в сутки, дни 1-3 цитарабин 100 мг/м <sup>2</sup> x 2 раз в сутки, дни 1-7 циклофосфамид 400 мг/м <sup>2</sup> x 1 раз в сутки, дни 1-7 винкристин 2 мг x 1 раз в сутки, дни 1, 7 преднизолон 60 мг/м <sup>2</sup> x 1 раз в сутки, дни 1-7	1
ОЛЛ/ ОМЛ	FLAG-Ida	флюдарабин 25 мг/м <sup>2</sup> x 1 раз в сутки, дни 1-5 цитарабин 2 г/м <sup>2</sup> x 1 раз в сутки, дни 1-5 Г-КСФ 5мкг/кг, с 7-го дня до выхода из цитопении идарубицин 10 мг/м <sup>2</sup> x 1 раз в сутки, дни 1, 3	2
ХМЛ	FLAG-Ida+ иматиниб	FLAG-Ida иматиниб 400 мг в сутки, через 2 недели после курса ХТ, постоянно	2

Представленная модификация алгоритма адоптивной иммунотерапии была предпринята с целью индукции РТПЛ при минимальном риске развития РТПХ, за счет использования небольших систематизированных доз лимфоцитов донора в сочетании с ИЛ-2.

## **2.6. Сбор и криоконсервирование лейкоконцентрата из периферической крови донора костного мозга**

Сбор лейкоконцентрата из периферической крови донора костного мозга (лейкоцитаферез) осуществляли на сепараторах непрерывного тока крови по программе стандартного лейкоцитафереза или программе сбора стволовых клеток крови в научно-клиническом отделении донорского и лечебного гемафереза ФГБУ ГНЦ Минздрава России (зав.отд. д.м.н. Н.Н. Калинин). Перерыв между процедурами составлял не менее 4 недель. За один сеанс лейкоцитафереза обрабатывали 1,5-2 объема циркулирующей крови.

Допуск доноров костного мозга к лейкоцитаферезу проводили на основании дополнения к инструкции по медицинскому освидетельствованию доноров крови, плазмы, клеток крови утвержденной Минздравом России 16.11.1998г.

Оценка дозы заготовленных лимфоцитов донора основывался на подсчете количества  $CD3^+$ клеток в лейкоконцентрате и определялся методом иммунофенотипирования с проточной цитофлуориметрией. Подсчет количества  $CD3^+$ клеток выполнялся совместно с сотрудниками научно-клинической лаборатории иммунофенотипирования клеток крови и костного мозга ФГБУ ГНЦ Минздрава России (зав. лаб., к.м.н. И.В. Гальцева), лаборатории молекулярной биотехнологии ГУ НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи (зав. лаб., д.м.н. Б.С. Народицкий).

После подсчета собранного количества  $CD3^+$ клеток производилось формирование терапевтических доз, содержащих  $1 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$  и  $10 \times 10^7$   $CD3^+$ клеток/кг массы тела реципиента.

Если объем лейкоконцентрата, содержащего терапевтическую дозу CD3<sup>+</sup>клеток, превышал 100 мл, его уменьшали путем центрифугирования (7 минут, при температуре +4°C, 850g) и удаления плазмы до достижения конечного объема лейкоконцентрата в пределах 40,0-60,0 мл.

Подготовленные терапевтические дозы CD3<sup>+</sup>клеток замораживали в лаборатории криоконсервирования стволовых клеток и костного мозга ФГБУ ГНЦ Минздрава России (зав. лаб., к.м.н. Т.В. Гапонова). В качестве криопротектора использовали диметилсульфоксид в конечной концентрации 10%. Для глубокой заморозки применяли криоконтейнеры Nemofreeze DF 200 («Fresenius», Германия) и CryoMACS (Miltenyi Biotec GmbH, Германия), процедура осуществлялась в соответствии с инструкцией производителя. Для заморозки использовали программный замораживатель. Лейкоконцентрат хранился в парах жидкого азота.

Размораживание лейкоконцентрата производили в программном размораживателе по программе для стволовых клеток или на водяной бане, при температуре 37-39°C. Размороженный лейкоконцентрат вводили больному внутривенно, струйно, непосредственно после разморозки, без отмывки от диметилсульфоксида. С целью дезинтоксикации и выведения переливаемого больному свободного гемоглобина трансфузию проводили на фоне форсированного диуреза, контролируя электролитный состав и кислотно-щелочное равновесие крови.

Для профилактики токсических, пирогенных и аллергических реакций во время ТЛД больному проводили премедикацию десенсибилизирующими препаратами (антигистаминные, глюкокортикостероиды, в некоторых случаях наркотические анальгетики).

Побочными реакциями на трансфузию размороженного лейкоконцентрата в ряде случаев являлись тошнота, спастические боли в животе, затрудненное дыхание, покраснение кожи лица и шеи, брадикардия и гипотония. Все эти



проявления были обусловлены токсическим действием криопротектора и, в большинстве случаев, проходили самостоятельно.

## 2.7. Диагностика и лечение РТПХ после адоптивной иммунотерапии

Диагноз острой и хронической РТПХ устанавливали на основании клинической картины, результатов лабораторных исследований, морфологического исследования биоптатов пораженного органа.

Острая РТПХ диагностировалась в течение первых 100 дней после первой ТЛД. Тяжесть её течения определялась в соответствии с классификацией Н. Glucksberg. [67] (Таблица 4, 5).

**Таблица 4. Классификация острой РТПХ**

Степень	Кожа	Печень	Кишечник
I степень	Сыпь покрывает менее 25% тела	Уровень билирубина – 20-30 мг/л	Диарея более 500 мл/сут
II степень	Сыпь покрывает 25-50% тела	Уровень билирубина 31-60 мг/л	Диарея более 1000 мл/сут
III степень	Генерализованная эритродермия	Уровень билирубина 61-150 мг/л	Диарея более 1500 мл/сут
IV степень	Генерализованная эритродермия с буллезными изменениями и десквамацией	Уровень билирубина более 150 мг/л	Диарея более 2000 мл/сут или сильные абдоминальные боли с/без илеуса

**Таблица 5. Стадии тяжести острой РТПХ**

Стадии	Степени		
	Кожа	Печень	Кишечник
0 (нет)	0	0	0
I (легкая)	1-2	0	0
II (средняя)	1-3	1	0-1
III (тяжелая)	2-3	2-4	2-3
IV (жизнеугрожающая)	2-4	2-4	2-4

Хроническая РТПХ – клиничко-патологический синдром, появляющийся спустя 100 и более дней после первой ТЛД. Классификация хронической РТПХ основана на наличии предшествовавшей острой РТПХ (развившаяся *de novo*, персистирующая, прогрессирующая), количестве вовлеченных органов

(локализованная - ограниченное поражение кожи или печеночная дисфункция, экстенсивная - генерализованное поражение кожи или дисфункция печени в сочетании с поражением других органов).

Лечение острой и хронической РТПХ после алло-ТГСК и адоптивной иммунотерапии проводилось согласно стандартным схемам, включающих циклоспорин (2-5 мг/кг в сутки), метилпреднизолон (1,5-2мг/кг в сутки), мофетил микофенолат (1-2 г в сутки).

## **2.8. Исследование субпопуляций Т-лимфоцитов периферической крови на фоне ТЛД**

В соответствии с поставленными задачами нами был изучен количественный и качественный состав субпопуляций Т-лимфоцитов периферической крови 15 больных гемобластозами на фоне ТЛД. Исследование выполнялось с помощью метода иммунофенотипирования с проточной цитофлюориметрией. Материалом исследования служила венозная кровь, стабилизированная К2-ЭДТА. Использовались моноклональные антитела к следующим антигенам: CD3 (PerCP), CD4 (PE), CD8 (FITC), CD25 (FITC), CD56 (FITC) («Becton Dickinson», США).

Для определения экспрессии исследуемых белков применяли панель моноклональных антител (мкАТ), меченых одним из 4 флюорохромов: изотиоцианат флуоресциина (FITC), с max эмиссией при  $\lambda=525$  нм, фикоэритрин (PE), с max эмиссией при  $\lambda=575$  нм, перидинин-хлорофилл протеин (PerCP), с max эмиссией при  $\lambda=660$  нм (Таблица 5).

Для окраски клеток моноклональными антителами использовали два протокола («Becton Dickinson» и «Beckman Coulter», США).

**Таблица 6. Характеристики используемых моноклональных антител**

Препараты мкАТ	Клон	CD принадлежность	Класс Ig	Флюорохром	Производитель
Anti-CD3	SK7	CD3	G1	PerCP	BD
Anti-CD4	RPA-T4	CD4	G1	PE	BD
Anti-CD8	RPA-T8	CD8	G1	FITC	BD
Anti-CD25	2A3	CD25	G1	FITC	BD
Anti-CD56	B159	CD56	G1	PE	BD
Mouse control	X40	-	G1	FITC	BD
Mouse control	X40	-	G1	PerCP	BD
Mouse control	X40	-	G1	PE	BD

Для определения экспрессии поверхностных антигенов (CD3, CD4, CD8, CD25, CD56) 100 мкл периферической крови распределяли одноканальной пипеткой в пробирки (соответственно количеству комбинаций антител) и добавляли в требуемом объеме мкАТ. В пробирки с изотипическим контролем добавляли неспецифические мышинные иммуноглобулины, меченые соответствующими флюорохромами. Пробы инкубировали 30 минут при температуре 2-8°C. После инкубации для лизиса эритроцитов в пробирки вносили 1 мл лизирующего раствора (FACS Lysing Solution, BD). Инкубировали 10-15 минут при комнатной температуре в темноте и затем центрифугировали пробирки 5 минут в режиме 1500 оборотов в минуту. Удаляли надосадочную жидкость, добавляли 1 мл раствор фосфатного буфера (pH =7,4) для отмывания образца от разрушенных клеток. Ресуспензировали и центрифугировали 5 минут в режиме 1500 оборотов в минуту. Удаляли надосадочную жидкость, добавляли 1 мл раствор фосфатного буфера (pH =7,4). Затем выполняли анализ проб на проточном цитофлюориметре Cytomics FC 500 («Beckman Coulter», США) и FACS Canto II («Becton Dickinson», США). Обработка данных осуществлялась с помощью программного обеспечения BD FACS Diva 6.1.3. Анализируемая

область, лимфоцитарный гейт, выбирался на основании характеристик прямого светорассеяния FSC и бокового светорассеяния SSC.

Проточная цитофлуориметрия основана на проведение оптических и флуоресцентных измерений отдельных клеток. Сигналы светорассеивания, характеризующие размер клетки (FSC) и цитоплазматические особенности (SSC), позволяют связать данные иммунофенотипического анализа с определенными популяциями клеток. Лимфоциты располагаются в нижней части точечного графика, так как имеют невысокие сигналы переднего и бокового светорассеивания. Для моноцитов характерно расположение несколько выше и правее, а нейтрофилы располагаются в его верхней части, так как дают высокие значения показателей FSC и SSC. С помощью точечных графиков определяли процентное соотношение клеток, несущих специфические антигены.

Для анализа были использованы комбинации антител, характеризующие иммунофенотип следующих субпопуляций лимфоцитов: Т-лимфоциты ( $CD3^+$ ); Т-хелперные клетки ( $CD3^+/CD4^+$ ); Т-цитотоксические клетки ( $CD3^+/CD8^+$ ); Т-регуляторные клетки ( $CD4^+/CD25^{high}$ ); клетки натуральные киллеры - НК-клетки ( $CD3^+/CD56^+$ ); Т-клетки натуральные киллеры - Т-НК ( $CD3^+/CD56^+$ ).

Подсчет абсолютного количества Т-лимфоцитов каждой субпопуляции выполняли с учетом данных гемограммы, полученных на автоматическом гематологическом анализаторе КХ-21N («Sysmex», Япония) в экспресс лаборатории отдела анестезиологии и реаниматологии и интенсивной терапии ФГБУ ГНЦ Минздрава России (зав. лаб., к.м.н. А.В. Кречетова).

Результаты подсчета абсолютного количества Т-лимфоцитов у пациентов на фоне ТЛД представлены в виде среднего значения и стандартного отклонения. В качестве нормальных значений были использованы результаты иммунофенотипирования периферической крови условно здоровых людей [24].

Исследование субпопуляционного состава Т-лимфоцитов проводили в момент констатации посттрансплантационного рецидива или при снижении

содержания донорских клеток в костном мозге реципиента до начала ТЛД, затем пятикратно каждые 2 недели после первой ТЛД.

## **2.9. Статистический анализ**

При статистическом анализе данных использовали анализ выживаемости (метод Каплана-Мейера). Результаты считались статистически значимыми при  $p \leq 0,05$ . Результаты были обработаны с помощью программы SAS, Statistica version 6 (Stat Soft Inc). Работа выполнена совместно с сотрудниками лаборатории биостатистики ФГБУ ГНЦ Минздрава России (зав. лаб., к.т.н. С.М. Куликов).

### **Глава 3. Адоптивная иммунотерапия после трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток**

За период с 1993 по 2013 годы 52 реципиентам аллогенного миелотрансплантата были выполнены ТЛД по поводу посттрансплантационного рецидива гемобластоза (n=44) или убывающего донорского химеризма (n=8), который характеризовался появлением уменьшением содержания клеток донорского кроветворения в костном мозге. В 6 случаях была предпринята вторая процедура иммунотерапии ТЛД в связи повторным гематологическим рецидивом гемобластоза.

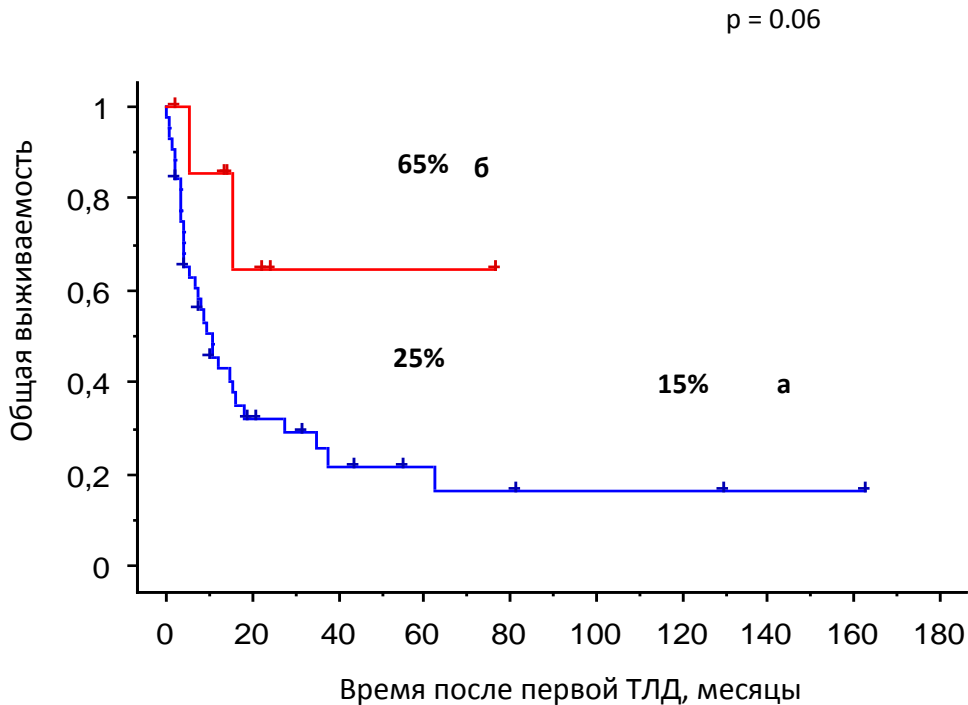
Достижение ремиссии с восстановлением полного донорского химеризма в результате адоптивной иммунотерапии оценивалось по показателям гемограммы, миелограммы, а также по результатам молекулярного и цитогенетического исследования химеризма.

Адоптивная иммунотерапия расценивалась нами как эффективная только в тех случаях, когда кроветворение реципиента было полностью замещено донорским, т.е. был достигнут полный донорский химеризм.

Кривые, иллюстрирующие общую выживаемость больных в зависимости от показаний для начала адоптивной иммунотерапии, представлена на рисунке 2.

Пятилетняя общая выживаемость в результате адоптивной иммунотерапии, включавшей ТЛД, составляет 25% для больных с посттрансплантационным гематологическим рецидивом гемобластоза и 65% для больных, в посттрансплантационном периоде у которых выявлен убывающий донорский химеризм.

Кривая общей выживаемости больных, получивших ТЛД по поводу посттрансплантационного рецидива, после пятилетнего наблюдения «выходит» на «плато», что указывает на возможность сохранения полного донорского химеризма в течение более 10 лет у 15% больных гемобластозами.



**Рисунок 2. Общая выживаемость больных гемобластозами после адоптивной иммунотерапии по поводу посттрансплантационного гематологического рецидива (а) и убывающего донорского химеризма (б)**

### **3.1. Адоптивная иммунотерапия посттрансплантационного гематологического рецидива гемобластоза**

44 пациентам адоптивная иммунотерапия, включавшая ТЛД, проводилась по поводу гематологического рецидива гемобластоза после алло-ТГСК. В результате терапии у 25 (57%) из 44 больных была достигнута повторная ремиссия с восстановлением полного донорского химеризма, продолжительность которой составила от 2 до 162 месяцев (медиана 7 месяцев). На момент проведения анализа живы 12 (27%) больных, полный донорский химеризм сохраняется у них в течение 3 - 162 месяцев (медиана 26 месяцев). В остальных 19 (43%) случаях через 1-2 месяца от начала иммунотерапии была констатирована прогрессия гемобластоза, что расценивалось нами как отсутствие эффекта.

Адоптивная иммунотерапия посттрансплантационного рецидива выполнялась по двум схемам. Первая схема включала применение трансфузий лимфоцитов донора в виде монотерапии на фоне развернутого рецидива гемобластоза.

Вторая схема лечения гематологического рецидива гемобластоза после алло-ТГСК состояла из применения одного курса химиотерапевтических препаратов с последующим переливанием лимфоцитов донора. При этом каждая ТЛД сопровождалась введением ИЛ-2.

### **3.1.1. ТЛД в виде монотерапии посттрансплантационного рецидива гемобластоза**

Переливания лимфоцитов донора в виде монотерапии выполнялись 15 больным. Среди них были 6 пациентов с ОМЛ, 5 пациентов с ХМЛ, 3 пациентов с МДС и 1 пациент с ОЛЛ. Алло-ТГСК была выполнена больным ОМЛ в одном случае в ремиссии, в остальных 5 случаях вне ремиссии. Больному ОЛЛ во 2-ой ремиссии заболевания. Из 5 больных ХМЛ на момент алло-ТГСК 2 больных были в хронической фазе и 3-м больных в фазе акселерации. Всем больным МДС алломиелотрансплантация выполнена вне ремиссии.

У пациентов с ОЛ интервал от алло-ТГСК до развития гематологического рецидива был значительно короче, чем у больных ХМЛ. Так, у больных ОЛ рецидив был диагностирован в ранние сроки после алло-ТГСК: через 2-4 месяца (медиана 3 месяца). Лишь в одном случае рецидив ОМЛ отмечен в более поздние сроки – через 18 месяцев после алло-ТГСК. У больных ХМЛ и МДС ремиссия с полным донорским химеризмом после алло-ТГСК сохранялась значительно дольше. У больных ХМЛ рецидив был диагностирован в среднем через 25 месяцев (от 5 до 48 месяцев), а у больных МДС – через 4, 36 и 45 месяцев после алло-ТГСК.

Гематологический рецидив ОЛ характеризовался высоким бластозом в костном мозге, а также низкими показателями донорского химеризма. При ОМЛ медиана содержания бластных клеток составила 32% (от 8 до 70%), при этом у 3-х из 6 больных количество бластных клеток превышало 50%. При ОЛЛ количество бластных клеток равнялось 52%. Медиана содержания донорских клеток в



костном мозге составляла 50% при ОМЛ и 20% при ОЛЛ. У пациентов с ХМЛ и МДС количество бластных клеток в миелограмме в момент рецидива было ниже (медиана количества бластных клеток составила 15% при ХМЛ и от 1% до 6% при МДС), а показатели донорского химеризма в основном не снижались менее 75% (от 45% до 90%) (Таблица 7).

Параметры, характеризующие интенсивность адоптивной терапии у больных с различными диагнозами, не имели значимых различий. Так, медиана количества перелитых донорских  $CD3^+$  клеток за одну трансфузию ( $7 \times 10^7$   $CD3^+$  клеток/кг), суммарного количества перелитых  $CD3^+$  клеток ( $27 \times 10^7$   $CD3^+$  клеток/кг) и числа трансфузий лимфоцитов донора (3 ТЛД) у пациентов различных нозологических форм было примерно одинаковым.

У 5 (33 %) пациентов ТЛД на фоне развернутого посттрансплантационного рецидива гемобластоза обеспечили достижение ремиссии с восстановлением полного донорского химеризма. В остальных 10 случаях была отмечена дальнейшая прогрессия гемобластоза.

**Таблица 7. Характеристика гематологического рецидива гемобластоза после алло-ТГСК и интенсивность адоптивной иммунотерапии при различных формах гемобластозов**

Параметры медиана (разброс значений)	Характеристика гематологического рецидива гемобластоза и интенсивность адоптивной иммунотерапии			
	ОМЛ	ОЛЛ	ХМЛ	МДС
Диагноз	ОМЛ	ОЛЛ	ХМЛ	МДС
Количество пациентов	6	1	5	3
Возраст, лет	31 (20-60)	18	31 (31-39)	35-43-45
Интервал от алло-ТГСК до рецидива, месяцы	3 (2-18)	3	23 (5-48)	4-36-43
Количество бластных клеток в костном мозге при рецидиве, %	32 (8-70)	52	15 (8-52)	4-1-6
Донорский химеризм в момент рецидива, %	50 (50-90)	20	85 (45-90)	75-80-80
Количество $CD3^+$ клеток за одну ТЛД, $\times 10^7$ клеток/кг	7 (1-14,6)	11	7 (4,7- 10)	6-5-20
Суммарное количество $CD3^+$ клеток, $\times 10^7$ клеток/кг	27 (1-76)	22	28 (18-47)	16-15-55
Количество ТЛД	3 (1-8)	2	4 (3-5)	3-3-3
Достижение ремиссии с полным донорским химеризмом	1/6	Без эффекта	3/5	1/3
Продолжительность эффекта после иммунотерапии, месяцы	30	Без эффекта	8-44-162	2

Наилучшие результаты применения переливаний лимфоцитов донора в монорежиме были достигнуты при лечении гематологического рецидива ХМЛ (Таблица 8). Так, полная ремиссия с восстановлением полного донорского химеризма была диагностирована у 3-х из 5 пациентов. Следует отметить, что именно у этих 3-х больных посттрансплантационный рецидив был диагностирован в поздние сроки после алло-ТГСК (через 23, 26 и 48 месяцев), а средние дозы перелитых  $CD3^+$  клеток за одну ТЛД были весьма высокими и равнялись 7, 8 и  $10 \times 10^7$  клеток/кг. При этом суммарное количество  $CD3^+$  клеток достигало 27, 34 и  $47 \times 10^7$  клеток/кг.

Длительность повторной ремиссии составила 8, 44 и 162 месяца. Следует отметить, что у пациентки с наибольшей продолжительностью эффекта после адоптивной иммунотерапии (162 месяца) длительность противоопухолевого эффекта в 7 раз превышает продолжительность посттрансплантационной ремиссии. В остальных случаях пациенты находились в ремиссии с полным донорским химеризмом во время последнего контакта (8 и 44 месяца), однако дальнейшая их судьба не известна.

**Таблица 8. Эффективность трансфузий лимфоцитов донора в виде монотерапии посттрансплантационного рецидива гемобластоза**

Диагноз	Ремиссия с восстановлением полного донорского химеризма		Общая выживаемость (от начала адоптивной иммунотерапии)
	Частота	Продолжительность, месяцы	
ОМЛ	1 из 6 (17%)	30	Прогрессия заболевания, смерть через 37 месяцев
ХМЛ	3 из 5 (60%)	8	Во время последнего контакта (8 месяцев), сохранялась полная ремиссия
		44	Во время последнего контакта (44 месяца), сохранялась полная ремиссия
		162	Жива, ремиссия сохраняется 162 месяца
МДС	1 из 3 (33%)	2	Жив, ремиссия сохраняется 2 месяца

Два случая неэффективной иммунотерапии рецидива ХМЛ возможно объясняются ранними сроками развития этих рецидивов (через 5 и 13 месяцев после алло-ТГСК). Несмотря на значительные дозы перелитых  $CD3^+$  клеток, ремиссия достигнута не была.

При МДС монотерапия посттрансплантационного гематологического рецидива ТЛД индуцировала ремиссию с восстановлением полного донорского химеризма лишь у 1-го из 3 больных. Интервал от алло-ТГСК до рецидива у этого больного был весьма продолжительным и составил 36 месяцев. Количество бластных клеток в момент констатации рецидива равнялось 4%, процент донорского химеризма составлял 80%. Выполнено 3 переливания лимфоцитов донора в сочетании с ИЛ-2, медиана количества  $CD3^+$  клеток за одну трансфузию была равна  $5 \times 10^7$  клеток/кг, а суммарное количество -  $15 \times 10^7$  клеток/кг. Продолжительность достигнутого эффекта в настоящее время составляет 2 месяца. Больной жив и находится под наблюдением. Ему проводится поддерживающая терапия ИЛ-2.

При посттрансплантационном рецидиве ОМЛ эффективность трансфузий лимфоцитов донора в качестве единственного терапевтического агента оказалась низкой. Лишь, в одном случае из 6 (16,7%) удалось индуцировать повторную ремиссию, продолжительность которой оказалась значительно больше ремиссии, наблюдавшейся после алло-ТГСК (30 месяцев против 4 месяцев). Ранний посттрансплантационный рецидив у этой пациентки характеризовался агрессивным течением: количество бластных клеток в костном мозге достигало 70%, а донорский химеризм снижался до 30%. Можно предположить, что столь яркий и продолжительный эффект у этой больной обусловлен большим количеством перелитых  $CD3^+$  клеток: за одну трансфузию переливали в среднем  $10,5 \times 10^7$  клеток/кг, а суммарная доза лимфоцитов донора за 8 трансфузий составила  $76 \times 10^7$  клеток/кг.

У больного ОЛЛ переливания лимфоцитов донора оказались неэффективными.

Результаты адоптивной иммунотерапии гематологического рецидива ОЛ и МДС только лимфоцитами донора свидетельствуют о недостаточной эффективности этого терапевтического подхода, хотя единичные случаи длительных ремиссий, сопровождающихся восстановлением полного донорского химеризма, указывают на наличие сложных иммунологических механизмов реакции «трансплантат против лейкоза».

### **3.1.2. Химиотерапия с последующими трансфузиями лимфоцитов донора при гематологическом рецидиве гемобластоза после алло-ТГСК**

ТЛД после предварительного применения химиотерапевтических препаратов (1 курса ХТ) осуществлены у 29 больных. Этот терапевтический метод выполнялся нами по 3-м схемам:

1. Лимфоциты донора переливали после неэффективной предшествующей химиотерапии (т.е. проведенный курс химиотерапии не обеспечил достижения гематологической ремиссии и лимфоциты донора переливали на фоне развернутого рецидива);
2. ТЛД выполняли в период ремиссии, достигнутой в результате проведенной химиотерапии;
3. ТЛД применяли в период миелотоксического агранулоцитоза после курса химиотерапии.

#### **ТЛД после неэффективной предшествующей химиотерапии**

Данная схема лечения посттрансплантационного рецидива была предпринята двум пациентам с ХМЛ и МДС. Рецидив заболевания у этих больных был диагностирован в отдаленные сроки после алло-ТГСК (через 33 и 43 месяцев) и характеризовался невысоким бластозом в костном мозге (8% и 15% бластных клеток), но весьма низкими показателями донорского химеризма (15% и 40%).

Курс специфической противоопухолевой терапии (малые дозы цитарабина при МДС и «7+3» (цитарабин+идарубицин) с последующей терапией иматинибом в дозе 800 мг в сутки при ХМЛ) не обеспечили достижение гематологической ремиссии.

У больного МДС положительным моментом после химиотерапии являлось повышение показателей донорского химеризма с 15% до 65%. Однако, проводившиеся затем ТЛД в сочетании с ИЛ-2 не привели к стойкому результату, несмотря на значительное суммарное количество перелитых CD3<sup>+</sup> клеток, которое составило  $39 \times 10^7$  клеток/кг. Наблюдалась дальнейшая прогрессия заболевания и отторжение миелотрансплантата, что подтверждалось снижением донорского химеризма до 50%.

У больной ХМЛ после 4-х трансфузий лимфоцитов донора, несмотря на нормализацию показателей гемограммы и снижение количества бластных клеток в костном мозге до 4%, сохранялся смешанный химеризм (30% клеток донорского генотипа и 70% клеток костного мозга, содержащих химерный ген *BCR-ABL*). Пациентка погибла от прогрессии основного заболевания (Таблица 9).

Применение трансфузий лимфоцитов донора после неэффективного химиотерапевтического воздействия, не оказало достаточного эффекта для восстановления полного донорского химеризма, несмотря на большое количество перелитых CD3<sup>+</sup> клеток.

#### **ТЛД на фоне ремиссии, индуцированной курсом химиотерапии**

Лечение посттрансплантационного рецидива по данной схеме проведено 4-м пациентам: 3-м с ОМЛ и 1-му с ХМЛ. Интервал времени от алло-ТГСК до констатации рецидива колебался от 3,5 до 24 месяцев (медиана 19 месяцев).

Количество бластных клеток в костном мозге в момент констатации рецидива ОМЛ равнялось 25%, 92% и 93%, у больного ХМЛ - 34%.

**Таблица 9. Характеристика гематологического рецидива гемобластоза после алло-ТГСК и интенсивность адоптивной иммунотерапии при различных формах гемобластозов у больных, которым ТЛД выполнены после неэффективной предшествующей химиотерапии**

Параметр	Характеристика гематологического рецидива гемобластоза и интенсивность адоптивной иммунотерапии	
	МДС	ХМЛ
Интервал от алло-ТГСК до рецидива, месяцы	33	43
Количество бластных клеток в костном мозге в момент рецидива, %	8	15
Донорский химеризм в момент рецидива, %	15	40
Курс химиотерапии	Малые дозы цитарабина	«7+3» (цитарабин + идарубицин) + иматиниб
Количество бластных клеток в костном мозге после курса ХТ, %	6	10
Донорский химеризм после курса ХТ, %	65	30
Медиана количество CD3 <sup>+</sup> клеток на 1 ТЛД, x10 <sup>7</sup> клеток/кг	10	12
Суммарное количество CD3 <sup>+</sup> клеток, x10 <sup>7</sup> клеток/кг	39	45
Количество ТЛД+ ИЛ-2	4	4
Количество бластных клеток в костном мозге после иммунотерапии, %	8	4
Донорский химеризм после иммунотерапии, %	50	30
Продолжительность эффекта после иммунотерапии, месяцы	Без эффекта, прогрессия	Без эффекта, прогрессия

Отторжение миелотрансплантата в момент констатации рецидива гемобластоза проявлялось значительным снижением содержания в костном мозге больного клеток донорского кроветворения. Процент клеток донорского генотипа в момент рецидива у больных ОМЛ составлял 5%, 22% и 30%, у больного ХМЛ – 50%.

С целью эррадикации опухолевого клона пациентам с ОМЛ был выполнен курс ХТ по схеме «7+3», пациенту с ХМЛ по схеме FLAG-Ida с последующим назначением иматиниба (в дозе 400 мг/сутки, постоянный прием после курса ХТ и

иммунотерапии). ТЛД проводились после восстановления кроветворения на фоне ремиссии гемобластоза, подтвержденной морфологически (миелограмма) и цитогенетически (стандартное цитогенетическое исследование, FISH с использованием ДНК зонда к *BCR-ABL*). Восстановление полного донорского химеризма после химиотерапии было подтверждено у 3-х больных.

Количество перелитых донорских  $CD3^+$  клеток за одну трансфузию у больных ОМЛ равнялось 9, 10 и  $14 \times 10^7$   $CD3^+$  клеток/кг, а у больного ХМЛ -  $9,0 \times 10^7$   $CD3^+$  клеток/кг. Суммарное количество перелитых  $CD3^+$  клеток у больных ОМЛ равнялась 40, 57 и  $63 \times 10^7$   $CD3^+$  клеток/кг, у больного ХМЛ -  $36 \times 10^7$   $CD3^+$  клеток/кг. Число трансфузий лимфоцитов донора составляло 4 - 6. После каждого переливания лимфоцитов донора осуществлялось введение ИЛ-2 в дозе 2-8 млн.МЕ (Таблица 10).

У больных ОМЛ полный донорский химеризм на фоне ремиссии сохранялся в течение 2, 4 и 52 месяцев после окончания адоптивной иммунотерапии, затем был констатирован повторный рецидив ОМЛ.

Наиболее оптимистичные результаты трансфузий лимфоцитов донора наблюдались у пациентки с поздним посттрансплантационным рецидивом ОМЛ (через 24 месяца после алло-ТГСК). Несмотря на агрессивное течение рецидива (92% - бластных клеток в миелограмме и отторжение миелотрансплантата до 22% донорского химеризма), один курс химиотерапии обеспечил достижение полной ремиссии (1,5% бластных клеток в миелограмме). Последующие ТЛД в сочетании с ИЛ-2 способствовали сохранению полного донорского химеризма в течение 52 месяцев, что более чем в 2 раза превышало продолжительность безрецидивной выживаемости после алло-ТГСК.

Возможно, индукция столь продолжительного эффекта «трансплантат против лейкоза» была обеспечена переливанием высоких доз  $CD3^+$  клеток (медиана количества клеток за одну трансфузию равнялась  $18 \times 10^7$  клеток/кг и суммарно за 6 переливаний –  $63 \times 10^7$  клеток/кг).

**Таблица 10. Характеристика гематологического рецидива после алло-ТГСК и интенсивность адоптивной иммунотерапии при различных формах гемобластозов у больных, на фоне полной ремиссии, индуцированной курсом ХТ**

Параметры	Характеристика гематологического рецидива гемобластоза и интенсивность адоптивной иммунотерапии			
	ОМЛ	ОМЛ	ОМЛ	ХМЛ
Диагноз	ОМЛ	ОМЛ	ОМЛ	ХМЛ
Интервал от алло-ТГСК до рецидива, месяцы	24	15	3,5	9
Количество бластных клеток в костном мозге при рецидиве, %	92	25	93	34
Донорский химеризм в момент рецидива, %	22	30	5	50
Курс ХТ	«7+3» (цитарабин + идарубицин)	«7+3» (цитарабин + идарубицин)	«7+3» (цитарабин + митоксантрон)	FLAG-IDA + иматиниб
Количество бластных клеток в костном мозге после ХТ, %	1,5	2	3	1
Донорское кроветворение после ХТ, %	Нет данных	100	100	100
Количество CD3 <sup>+</sup> клеток за одну ТЛД, $\times 10^7$ клеток/кг медиана (разброс значений)	14 (5 - 20)	10 (9 - 15)	9,0 (7 - 12)	9,0 (7-11)
Суммарное количество CD3 <sup>+</sup> клеток, $\times 10^7$ клеток/кг	63	57	40	36
Количество ТЛД	6	4	4	4
Достижение ремиссии с полным донорским химеризмом	Да	Да	Да	Да
Продолжительность эффекта после иммунотерапии, месяцы	52	4	2	3

У больного ХМЛ ремиссия с восстановлением полного донорского кроветворения сохранялась непродолжительное время. Несмотря на постоянный прием иматиниба (400 мг в сутки) через 3 месяца после завершения адоптивной иммунотерапии был констатирован повторный рецидив в виде бластного криза (в гемограмме: лейкоцитоз  $236 \times 10^9$  клеток/л, бластемия – 72%; в миелограмме - 87% бластных клеток).

Переливание лимфоцитов донора на фоне ремиссии, сопровождающейся восстановлением полного донорского химеризма, индуцированной предшествующей химиотерапией, позволяет сохранять достигнутый эффект в течение длительного времени в 25% случаях. В остальных 75% (у 3-х из 4-х



больных) случаях в короткие сроки после окончания иммунотерапии происходит прогрессия заболевания. Что может быть объяснено недостаточным эффектом «трансплантат против лейкоза».

### **ТЛД в период миелотоксического агранулоцитоза после курса химиотерапии**

Данная схема лечения посттрансплантационного рецидива гемобластоза была выполнена 23 больным. В 19 случаях иммунотерапия в период миелотоксического агранулоцитоза проводилась в связи с рецидивом ОМЛ, в 3-х случаях по поводу рецидива ОЛЛ и в 1-м случае - больному с рецидивом ХМЛ. Возраст пациентов колебался от 16 до 57 лет (медиана 34 года).

Интервал от алло-ТГСК до рецидива гемобластоза составлял от 2 до 51 месяца (медиана 5 месяцев). При этом посттрансплантационный рецидив ОМЛ был диагностирован через 2-51 месяц (медиана 7 месяцев), рецидив ОЛЛ развился через 3, 4 и 35 месяцев после алло-ТГСК, а рецидив ХМЛ - через 4 месяца. Количество бластных клеток в костном мозге в момент констатации рецидива ОМЛ составляло 15% - 93% (медиана 32%), у больных ОЛЛ - 51%, 67% и 94%, а у больного ХМЛ - 15%.

Развернутый рецидив лейкоза сопровождался отторжением миелотрансплантата, что проявлялось значительным снижением содержания в костном мозге реципиентов клеток донорского кроветворения. Процент клеток донорского генотипа в момент рецидива составлял от 5% до 80% (медиана 40%).

Всем больным был проведен курс ХТ (Таблица 11), и через 2-14 (медиана 7) дней после его завершения на фоне миелотоксического агранулоцитоза выполняли первую ТЛД. Количество  $CD3^+$  клеток на одно переливание составляло от 1 до  $15 \times 10^7$  клеток/кг (медиана  $4,5 \times 10^7$   $CD3^+$  клеток/кг). При этом суммарное количество  $CD3^+$  клеток колебалось от 1 до  $54 \times 10^7$   $CD3^+$  клеток/кг (медиана  $12 \times 10^7$   $CD3^+$  клеток/кг).

22 из 23 больных после каждой ТЛД однократно внутривенно вводился ИЛ-2 в дозе от 2 до 6 млн. МЕ за одно введение, одному больному после первой ТЛД проводилась терапия ГМ-КСФ 2 мкг/кг в сутки, подкожно, с 1-го по 7-й день после первой ТЛД). Введение ИЛ-2 и ГМ-КСФ осуществлялось с целью стимуляции донорских лимфоцитов.

Общее количество ТЛД у больных с рецидивом ОМЛ колебалось от 1 до 4 (медиана 2), у больных с рецидивом ОЛЛ - 1, 4 и 4 ТЛД и больному с посттрансплантационным рецидивом ХМЛ было выполнено 4 переливания лимфоцитов донора (Таблица 11).

**Таблица 11. Характеристика гематологического рецидива гемобластоза после алло-ТГСК и интенсивность адоптивной иммунотерапии в период миелотоксического агранулоцитоза после ХТ**

Параметры медиана (разброс значений)	Характеристика гематологического рецидива гемобластоза и интенсивность адоптивной иммунотерапии		
	ОМЛ (n=19)	ОЛЛ (n=3)	ХМЛ (n=1)
Диагноз	ОМЛ (n=19)	ОЛЛ (n=3)	ХМЛ (n=1)
Интервал от алло-ТГСК до рецидива, месяцы	7 (2-51)	3, 4, 35	4
Количество бластных клеток в костном мозге при рецидиве, %	32 (15-93)	51, 67, 94	15
Донорский химеризм в момент рецидива, %	43 (5-80)	5, 30, 40	35
Курсы ХТ	«7+3» (цитарабин+ идарубицин), HD-AraC (высокие дозы цитарабина), малые дозы цитарабина, FLAG-Ida, курс децитабина	FLAG-Ida, RACOP, ОЛЛ-2009 (предфаза, I фаза индукции)	FLAG-Ida + иматиниб
Медиана количества CD3 <sup>+</sup> клеток за одну ТЛД, x10 <sup>7</sup> клеток/кг	4,5 (1-15)	1, 6, 7	7
Суммарное количество перелитых CD3 <sup>+</sup> клеток, x10 <sup>7</sup> клеток/кг	10,5 (1-54)	2, 23, 30	33
Количество ТЛД	2 (1-4)	1, 4, 4	4
Применение цитокинов после ТЛД	ИЛ-2 (n=18) ГМ-КСФ (n=1)	ИЛ-2	ИЛ-2
Достижение ремиссии с полным донорским химеризмом	14 /19 (74%)	1/3 (33%)	1/1
Продолжительность эффекта после иммунотерапии, месяцы	6,5 (2-77)	2	5

В результате проведенного лечения ремиссия с восстановлением полного донорского химеризма была достигнута у 14 из 19 (74%) больных ОМЛ, у 1-го и 3-х (33%) больных ОЛЛ и у больного ХМЛ.

Поскольку группа больных ОМЛ была наиболее многочисленной, нами проведено исследование некоторых прогностических параметров с целью определения их возможного влияния на результаты адоптивной иммунотерапии посттрансплантационного рецидива (Таблица 12).

**Таблица 12. Эффективность адоптивной иммунотерапии рецидива ОМЛ в зависимости от прогностических параметров (n=19)**

Прогностические параметры медиана (разброс значений)		Достижение ремиссии с полным донорским химеризмом	
		Да (n=14)	Нет (n=5)
Фаза заболевания на момент алло-ТГСК	В ремиссии	12 (86%)*	1 (20 %)**
	Вне ремиссии	2 (14%)*	4 (80 %)**
Интервал от алло-ТГСК до рецидива, месяцы		10,5 (3-51)	3 (2-13)
Количество бластных клеток в костном мозге при рецидиве, %		39 (15-93)	20 (15 - 40)
Донорский химеризм в момент рецидива, %		45 (5 - 80)	40 (25-45)
Медиана количества CD3 <sup>+</sup> клеток за одну ТЛД, x10 <sup>7</sup> клеток/кг		5,5 (1-15)	1 (1-4,5)
Суммарное количество перелитых CD3 <sup>+</sup> клеток, x10 <sup>7</sup> клеток/кг		16 (1-54)	1 (1-9)
Количество трансфузий лимфоцитов донора		2 (1-4)	2 (1-2)

\* - p = 0,01      \*\* - p = 0,01

Анализ результатов, представленных в таблице 12, позволил обратить внимание на значение некоторых факторов, характеризующих течение пред- и посттрансплантационного периода. Так, в группе больных ОМЛ, у которых после иммунотерапии была достигнута ремиссия с восстановлением полного донорского химеризма в 12 из 14 случаев (86%) алло-ТГСК осуществлена в I ремиссии, медиана интервала времени от алло-ТГСК до рецидива составила 10,5 месяцев, медиана количества перелитых CD3<sup>+</sup>клеток за одну трансфузию и суммарное количество CD3<sup>+</sup>клеток равнялось 5,5 и 16x10<sup>7</sup>клеток/кг, соответственно.

У других 5 больных ОМЛ химиотерапия с последующими переливаниями лимфоцитов донора и введениями ИЛ-2 не оказала ожидаемого противорецидивного эффекта, во всех случаях после первой трансфузии CD3<sup>+</sup> клеток наблюдалась дальнейшая прогрессия заболевания. Для этой группы пациентов было характерно выполнение алло-ТГСК вне ремиссии ОМЛ (4 из 5 случаев), количество перелитых CD3<sup>+</sup> клеток за одну трансфузию, было низким и колебалось от 1,0 до 4,5x10<sup>7</sup> клеток/кг.

Таким образом, можно предположить, что на результаты лечения посттрансплантационного рецидива в большей степени повлияли факторы, характеризовавшие течение ОМЛ на этапе индукционной терапии и раннего посттрансплантационного периода, а именно достижение полной ремиссии после первых курсов ХТ и предтрансплантационного кондиционирования.

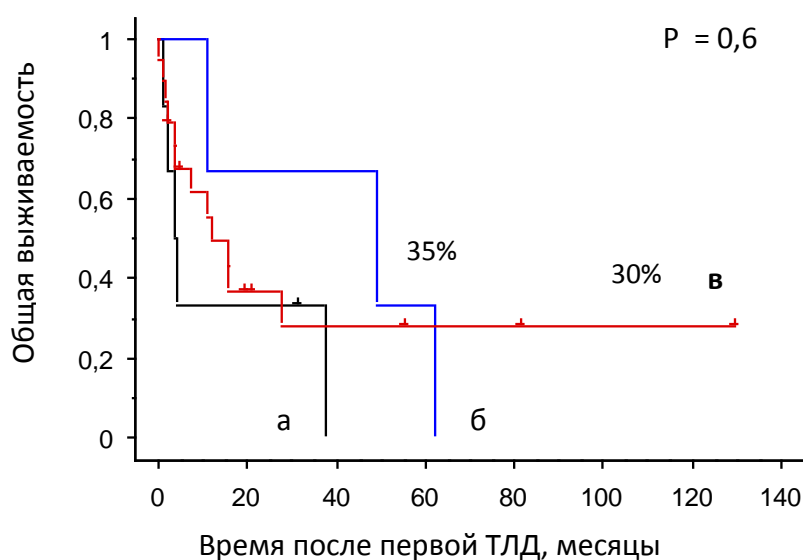
Так, если алло-ТГСК была выполнена вне ремиссии ОМЛ и рецидив диагностирован в ранние сроки после миелотрансплантации, химиотерапия с последующей иммунотерапией в 67% случаев оказались малоэффективными. Ремиссия с восстановлением полного донорского химеризма была достигнута лишь у 2-х из 6 больных с ранним посттрансплантационным рецидивом ОМЛ, трансплантированных вне ремиссии заболевания. Длительность этих ремиссий оказалась непродолжительной и составила всего 2 и 6 месяцев. Больные погибли от прогрессии ОМЛ.

Количество бластных клеток и клеток донорского кроветворения в костном мозге в момент констатации гематологического рецидива в обеих группах больных ОМЛ было примерно одинаковым, что указывает на отсутствие значимой роли массы опухоли.

Так, количество бластных клеток у больных, ответивших на проводимую терапию, составляло 39%, а процент донорского химеризма был равен 45%. У больных с прогрессией ОМЛ после трансфузий лимфоцитов донора исходный процент бластных клеток был равен 20%, а количество клеток донорского кроветворения во время посттрансплантационного рецидива составляло 40%.

Меньшие дозы перелитых  $CD3^+$  клеток за весь период адаптивной иммунотерапии у больных с рецидивом ОМЛ объясняется тем, что уже после первого переливания лимфоцитов донора была констатирована прогрессия лейкоза. Последующие трансфузии лимфоцитов этим больным не проводились.

На рисунке 3 представлены кривые общей выживаемости больных с посттрансплантационным рецидивом ОМЛ, которым проводилась терапия по различным схемам (n=28): ТЛД в монорежиме на фоне развернутого рецидива (n=6) (а) или химиотерапия с последующими переливаниями лимфоцитов донора. Вторая схема лечения посттрансплантационного рецидива включала в себя два варианта. Переливания лимфоцитов донора были выполнены после достижения гематологической ремиссии (n=3) (б) или в период посткурсового миелотоксического агранулоцитоза (n=19) (в).



**Рисунок 3. Общая выживаемость больных ОМЛ после адаптивной иммунотерапии по поводу посттрансплантационного гематологического рецидива по различным схемам: а – ТЛД в виде монотерапии при рецидиве ОМЛ после алло-ТГСК, б – ТЛД в ремиссии ОМЛ после ХТ, в – ТЛД в период миелотоксического агранулоцитоза**

Если иммунотерапия проводилась в монорежиме, то длительность сохранения эффекта была самой короткой и составила 38 месяцев. Все больные погибли от прогрессии заболевания.

Пятилетняя общая выживаемость больных ОМЛ, которым выполнены ТЛД после достижения ремиссии составила 35%. Наиболее длительный период наблюдения (более 10 лет) был в группе больных, которым ТЛД выполнены в период миелотоксического агранулоцитоза. Десятилетняя общая выживаемость больных равна 25%. Кривая общей выживаемости вышла на «плато» после двух лет наблюдения в данной группе.

При анализе эффективности ТЛД в период миелотоксического агранулоцитоза в зависимости от интенсивности курса противорецидивной химиотерапии были обнаружены некоторые закономерности, свидетельствующие о целесообразности применения интенсивных курсов, являющихся стандартными для лечения рецидивов лейкоза (Таблица 13).

С целью уменьшения опухолевой массы при рецидиве гемобластоза после алло-ТГСК в 20 случаях проводился курс интенсивной химиотерапии («7+3», FLAG-IDA, HD-AraC, RACOP). В остальных 3-х случаях курс химиотерапии был менее интенсивным (малые дозы цитарабина, протокол ОЛЛ-2009, курс децитабина), хотя в послекурсовом периоде у этих больных также развивался миелотоксический агранулоцитоз.

**Таблица 13. Результаты адоптивной иммунотерапии в период миелотоксического агранулоцитоза после курса ХТ**

Диагноз	Курс ХТ	Число больных	Результат адоптивной иммунотерапии	
			Ремиссия с полным донорским химеризмом	Без эффекта
ОМЛ	«7+3» идарубицин	15	12	3
	HD - AraC	1	1	0
	FLAG-IDA	1	1	0
	малые дозы цитарабина +ГМ-КСФ	1	0	1
	децитибин	1	0	1
ОЛЛ	FLAG-IDA	1	1	
	RACOP	1	0	1
	Протокол ОЛЛ-2009 (предфаза, I фаза индукции)	1	0	1
ХМЛ	FLAG-IDA + иматиниб	1	1	0
<b>Всего</b>		<b>23</b>	<b>16</b>	<b>7</b>

Ремиссия с восстановлением полного донорского химеризма после проведения интенсивных курсов ХТ и трансфузий лимфоцитов донора была достигнута у 16 (80%) из 20 больных. Если с противорецидивной целью проводился курс меньшей интенсивности с последующими ТЛД, то ремиссия с восстановлением 100% донорского химеризма не была достигнута ни у одного из 3-х больных.

В таблице 14 представлены результаты сравнительного анализа эффективности адоптивной иммунотерапии, проводившейся по трем схемам, включавшим применение химиотерапевтических препаратов с последующими трансфузиями лимфоцитов донора и введениями ИЛ-2.

**Таблица 14. Сравнение результатов адоптивной иммунотерапии посттрансплантационного рецидива гемобластоза, проводившейся по различным схемам**

Схема адоптивной иммунотерапии	Число больных	Результат адоптивной иммунотерапии	
		Ремиссия с полным донорским химеризмом	Без эффекта
ТЛД после неэффективной ХТ	2	0	2
ТЛД на фоне ремиссии после ХТ	4	4	0
ТЛД в период миелотоксического агранулоцитоза после ХТ	23	16 (70 %)	7 (30 %)
<b>Всего по схеме ХТ + ТЛД (+ ИЛ-2)</b>	<b>29</b>	<b>20 (69%)*</b>	<b>9 (31%)</b>
<b>Монотерапия ТЛД (+/- ИЛ-2)</b>	<b>15</b>	<b>5 (33%)*</b>	<b>10 (67%)</b>

\*-  $p = 0.03$

Анализируя результаты лечения посттрансплантационного рецидива гемобластоза, следует отметить, что включение в схемы адоптивной иммунотерапии химиотерапевтических препаратов статистически достоверно повышало эффективность лечебных мероприятий. Так, монотерапия лимфоцитами донора обеспечила достижение ремиссии с восстановлением полного донорского кроветворения у 33% больных, а предварительный курс химиотерапии позволял увеличить частоту полного ответа до 69% ( $p = 0,03$ ).

Кроме того замечено, что результаты лечения посттрансплантационного рецидива в значительной степени зависят от достижения ремиссии после ХТ. На это указывает отсутствие эффекта после переливания лимфоцитов донора у больных с резистентным к химиотерапии посттрансплантационным рецидивом.

Тем не менее, присутствие иммунологических механизмов реакции «трансплантат против лейкоза» подтверждается возможностью получения длительного противоопухолевого ответа в результате применения только лишь трансфузий лимфоцитов донора у 33% больных.

### **3.1.3. Эффективность адоптивной иммунотерапии в зависимости от нозологической формы, фазы заболевания на момент алло-ТГСК, продолжительности ремиссии после алло-ТГСК**

Адоптивная иммунотерапия, включающая ТЛД, проведена 28 больным ОМЛ, 4 больным ОЛЛ, 8 больным ХМЛ и 4 больным МДС.

У 18 (64%) из 28 больных ОМЛ после окончания адоптивной иммунотерапии была диагностирована повторная ремиссия с полным донорским химеризмом. У больных ОЛЛ ремиссия с восстановлением донорского химеризма была получена только в 1-м (25%) из 4-х случаев. Среди больных ХМЛ в 5 (63%) из 8 случаев после адоптивной иммунотерапии была диагностирована ремиссия с полным донорским химеризмом. У 3-х (37%) пациентов после окончания лечения отмечалась дальнейшая прогрессия ХМЛ.

Использование трансфузий лимфоцитов донора с целью лечения рецидива МДС после алло-ТГСК оказалось эффективным лишь в 1-м (25%) из 4-х случаев.

Результаты применения ТЛД по поводу посттрансплантационного рецидива у пациентов с различными нозологическими формами представлены в таблице 15.

Итак, адоптивная иммунотерапия трансфузиями лимфоцитов донора при посттрансплантационном рецидиве гемобластоза обеспечила наибольшую частоту достижения полного ответа у больных с ОМЛ (64%) и ХМЛ (63%).



**Таблица 15. Результаты адоптивной иммунотерапии посттрансплантационного рецидива в зависимости от нозологической формы**

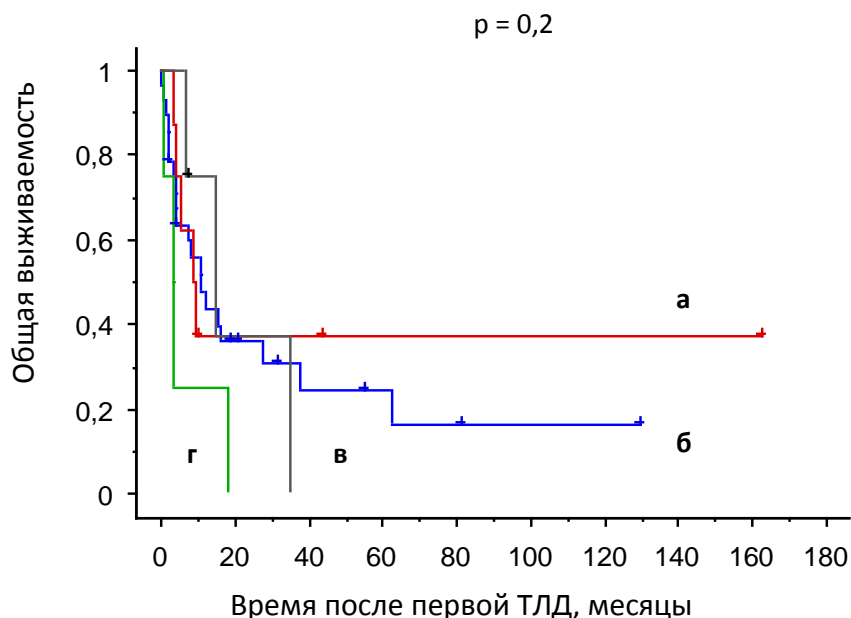
Диагноз	Число больных	Результат адоптивной иммунотерапии		
		Достижение ремиссии с полным донорским химеризмом	Продолжительность эффекта, месяцы	Без эффекта
ОМЛ	28	18 (64%)	8,5 (2 – 76)	10 (36 %)
ОЛЛ	4	1 (25%)	13	3 (75 %)
ХМЛ	8	5 (63%)	4,5 (2,5 -162)	3 (37 %)
МДС	4	1 (25%)	2,5	3 (75 %)
<b>Всего</b>	<b>44</b>	<b>25 (57 %)</b>	<b>8,5 (2-162)</b>	<b>19 (43%)</b>

Поскольку оценка эффективности лечения включала в себя не только частоту достижения ремиссии и полного донорского химеризма, но и возможность сохранения этого результата, нами проведен анализ общей выживаемости больных с различными нозологическими формами после адоптивной иммунотерапии посттрансплантационного рецидива

Общая выживаемость больных после адоптивной иммунотерапии в зависимости от диагноза представлена на рисунке 3.

Представленные кривые свидетельствуют о том, что в течение первых пяти лет после окончания адоптивной иммунотерапии общая выживаемость больных с посттрансплантационным рецидивом ОМЛ и ХМЛ составляет 25% и 40%, соответственно. Десятилетняя общая выживаемость больных ХМЛ остается на уровне 40%, а для больных ОМЛ составляет не менее 20%.

У больных ХМЛ кривая общей выживаемости выходит на «плато» через год от начала адоптивной иммунотерапии. Для больных ОМЛ частота повторных рецидивов постепенно снижается к 5-му году наблюдения, после чего кривая общей выживаемости выходит на «плато» на уровне 15%.



**Рисунок 4. Общая выживаемость больных гемобластозами после адоптивной иммунотерапии по поводу посттрансплантационного рецидива в зависимости от диагноза: ХМЛ (а), ОМЛ (б), ОЛЛ (в), МДС (г)**

У больных ОЛЛ и МДС проводимая адоптивная иммунотерапия не сопровождалась достаточным противоопухолевым эффектом, частота достижения повторной ремиссии составила 25%, а общая выживаемость не превысила 1,5 лет для больных МДС и 3-х лет для больных ОЛЛ.

Поскольку при анализе эффективности различных схем адоптивной иммунотерапии посттрансплантационного рецидива было обращено внимание на некоторую зависимость результатов лечения от фазы заболевания, в которой выполнялось алло-ТГСК, и от продолжительности ремиссии после алло-ТГСК, нами более подробно рассмотрены выявленные взаимосвязи.

Алло-ТГСК была выполнена в ремиссии 21 больному (1-й ремиссии 18 больным, во 2-й ремиссии - 3 больным) и вне ремиссии – 15 больным. У пациентов, которым алло-ТГСК была выполнена на фоне 1-й ремиссии острого лейкоза, ремиссия с полным донорским химеризмом была достигнута в 16 из 18 случаев (89%). У всех 3-х пациентов ОЛ, трансплантированных во 2-й ремиссии адоптивная иммунотерапия не обеспечила достижение ремиссии, в ближайшие сроки была отмечена прогрессия ОЛ.

В тех случаях, когда алломиелотрансплантация, выполненная вне ремиссии гемобластоза, обеспечила достижение ремиссии с полным донорским химеризмом, но после достигнутого эффекта развился рецидив, адоптивная иммунотерапия этого посттрансплантационного рецидива только в 3-х из 15 случаев (20%) сопровождалась повторной ремиссией. У 12 (80%) других больных была констатирована дальнейшая прогрессия заболевания. Таким образом, частота достижения ремиссии с полным донорским химеризмом у больных ОЛ достоверно лучше была у больных, трансплантированных в ремиссии ( $p=0,002$ ).

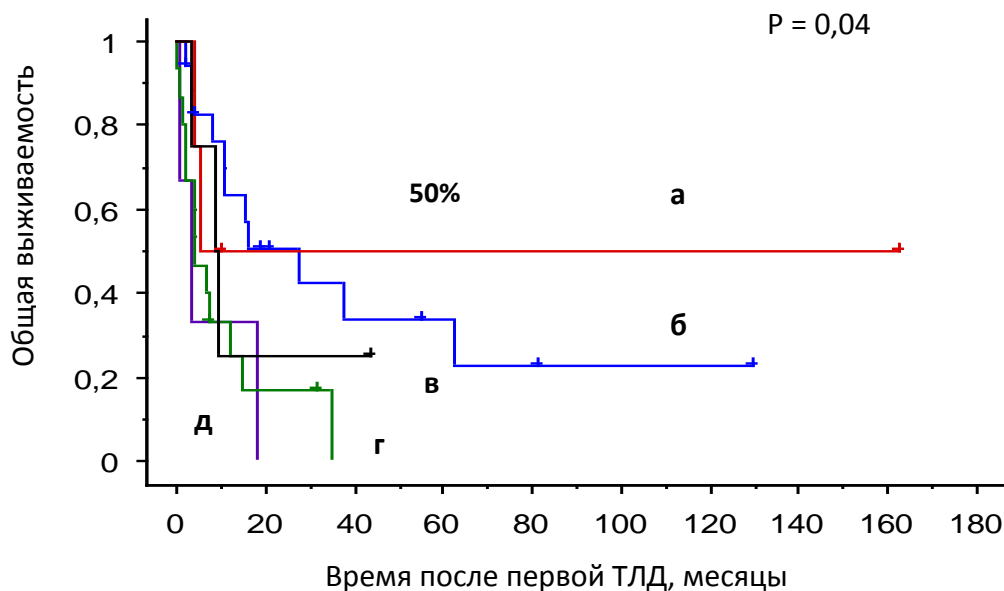
В 4-х из 8 случаев ХМЛ алло-ТГСК была осуществлена в хронической фазе заболевания. Адоптивная иммунотерапия посттрансплантационного рецидива обеспечила ремиссию с восстановлением полного донорского химеризма у всех этих больных. Среди 4-х пациентов с ХМЛ, которым алло-ТГСК была проведена в фазе акселерации или бластного криза, только у 1-го (25%) больного диагностирована ремиссия с восстановлением донорского химеризма после ТЛД по поводу посттрансплантационного рецидива (Таблица 16).

**Таблица 16. Результаты адоптивной иммунотерапии лимфоцитами донора посттрансплантационного рецидива в зависимости от фазы заболевания на момент алло-ТГСК**

Диагноз	Фаза заболевания на момент алло-ТГСК		Число больных		Результат адоптивной иммунотерапии			
					Ремиссия с полным донорским химеризмом		Без эффекта	
ОМЛ+ ОЛЛ+ МДС	В ремиссии	I ремиссия	21	18	16	16 (89 %)	5	2 (11 %)
		II ремиссия		3	(76%)*	0	(24%)	3 (100 %)
	Вне ремиссии			15	3 (20 %)*		12 (80%)	
ХМЛ	Хроническая фаза		4		4 (100%)		0	
	Фаза акселерации/ бластного криза		4		1 (25%)		3 (75%)	

\*-  $p = 0,002$

Общая выживаемость больных после адоптивной иммунотерапии в зависимости от фазы заболевания на момент алло-ТГСК представлены на рисунке 5.



**Рисунок 5. Общая выживаемость больных гемобластозами после адоптивной иммунотерапии по поводу посттрансплантационного гематологического рецидива в зависимости от фазы заболевания на момент алло-ТГСК: хроническая фаза ХМЛ (а), I ремиссия ОЛ (б), фаза акселерации/бластного криза ХМЛ (в), вне ремиссии ОЛ/МДС (г), II ремиссия ОЛ (д)**

Кривые общей выживаемости представленные на рисунке 5, свидетельствуют о достоверно ( $p = 0,04$ ) лучших показателях общей выживаемости у больных, у которых рецидив развился после алломиелотрансплантации, выполненной в период хронической фазы ХМЛ и 1 полной ремиссии ОЛ. Именно у этих больных адоптивная иммунотерапия рецидива обеспечивает наиболее высокие и продолжительные результаты.

Так, пятилетняя и десятилетняя общая выживаемость у больных ХМЛ, которым алло-ТГСК выполнена в хронической фазе, после ТЛД по поводу посттрансплантационного рецидива, составляет 50%. Если алло-ТГСК была выполнена в 1 ремиссии ОМЛ, то пятилетняя общая выживаемость после успешной адоптивной иммунотерапии посттрансплантационного рецидива равняется 25%.

Для определения влияния сроков развития посттрансплантационного рецидива на результаты адоптивной иммунотерапии лимфоцитами донора, нами была проанализирована частота и продолжительность ответа на лечение у

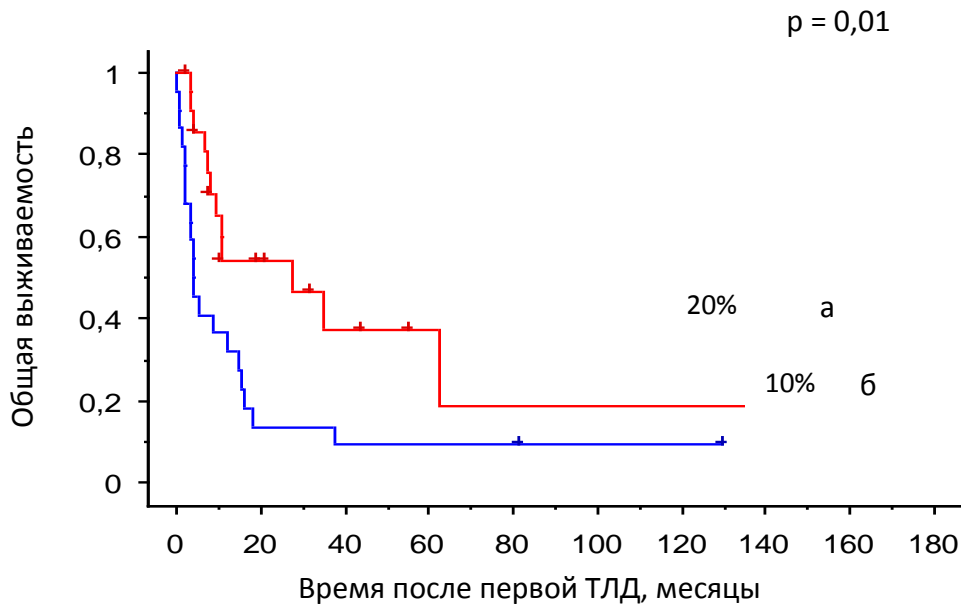
больных с ранним (менее 6 месяцев) и поздним (более 6 месяцев) рецидивом гемобластоза.

Как представлено в таблице 17, у больных с ранним рецидивом гемобластоза частота достижения ремиссии с полным донорским химеризмом после ТЛД составила 45%. В случае переливания лимфоцитов донора при рецидиве, развившимся после 6 месяцев от алло-ТГСК частота достижения повторной ремиссии равнялась 68%.

**Таблица 17. Результаты адоптивной иммунотерапии в зависимости от продолжительности ремиссии после алло-ТГСК.**

Продолжительность ремиссии после алло-ТГСК, месяцы	Число больных	Результат адоптивной иммунотерапии		
		Ремиссия с полным донорским химеризмом	Продолжительность эффекта, месяцы	Без эффекта
Менее 6 месяцев	22	10 (45 %)	7 (2 – 76)	12 (55%)
6 и более месяцев	22	15 (68%)	8 (2-162)	7 (32 %)
<b>Всего</b>	<b>44</b>	<b>25 (57%)</b>	<b>8,5 (2 - 162)</b>	<b>19 (43%)</b>

На рисунке 6 представлены кривые общей выживаемости больных гемобластозами, которым выполнены ТЛД по поводу посттрансплантационного рецидива. Так, если рецидив был диагностирован более чем через 6 месяцев после алло-ТГСК, показатели общей выживаемости после адоптивной иммунотерапии достоверно превышают таковые у больных с ранним (в первые 6 месяцев) посттрансплантационным рецидивом. Десятилетняя общая выживаемость больных составляет 20% и 10%, соответственно.



**Рисунок 6. Общая выживаемость больных гемобластозами после адоптивной иммунотерапии по поводу посттрансплантационного гематологического рецидива в зависимости от сроков развития этого рецидива: более 6 месяцев (а), менее 6 месяцев (б)**

### **3.1.4. Показатели общей выживаемости в зависимости от эффективности адоптивной иммунотерапии**

В 25 из 44 случаев (57%) после проведения адоптивной иммунотерапии у больных с посттрансплантационным рецидивом гемобластоза была достигнута ремиссия с восстановлением полного донорского химеризма. При этом длительность наблюдения в среднем составила 11 месяцев (от 2 до 163 месяцев).

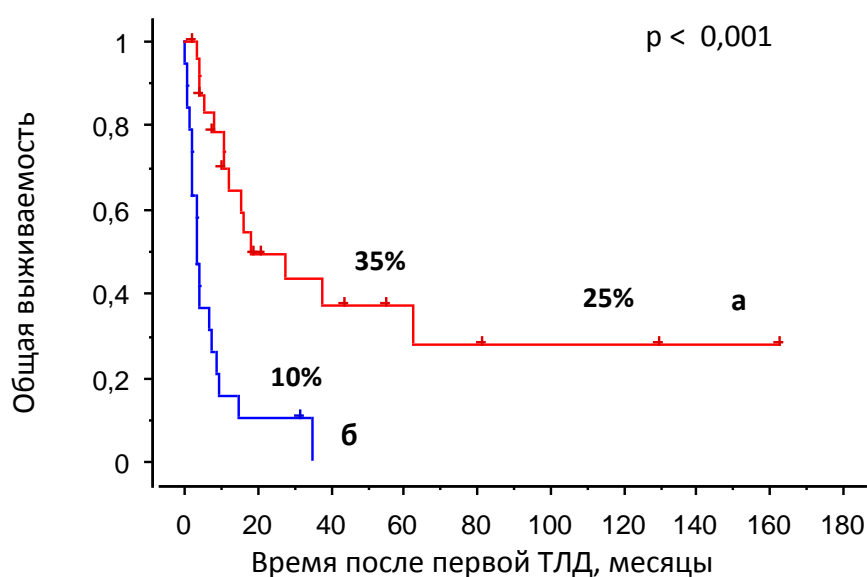
В остальных 19 (43%) случаях иммунотерапия не оказала достаточного эффекта и констатирована прогрессия заболевания. Время наблюдения в этой группе в среднем равнялась 10 месяцам (от 0,2 до 35 месяцев) (Таблица 18).

**Таблица 18. Продолжительность жизни в зависимости от результатов после адоптивной иммунотерапии**

Результат адоптивной иммунотерапии	Количество больных	Продолжительность наблюдения, месяцы
Ремиссия с полным донорским химеризмом	25	11 (2-162)
Без эффекта	19	10 (0,2 -35)
<b>Всего</b>	<b>44</b>	<b>11 (0,2 -162)</b>

Достижение ремиссии с полным донорским химеризмом статистически достоверно ( $p < 0,001$ ) влияло на показатели общей выживаемости в течение пяти и десяти лет. Пятилетняя и десятилетняя общая выживаемость у больных, ответивших на иммунотерапию, составила 35% и 25%, соответственно. После пятилетнего срока наблюдения кривая общей выживаемости выходит на «плато».

После неэффективной адоптивной иммунотерапии больные погибали в основном в течение 1 года наблюдения. Двухлетняя общая выживаемость в данной группе составила 10% (Рисунок 7).



**Рисунок 7. Общая выживаемость после иммунотерапии по поводу гематологического рецидива после алло-ТГСК в зависимости от ее результата: с эффектом (а), без эффекта (б)**

### **3.2. Повторная адоптивная иммуноterapia второго посттрансплантационного рецидива гемобластоза**

6 больным ОМЛ адоптивная иммуноterapia, включавшая ТЛД и инфузии ИЛ-2, проводилась повторно по поводу второго посттрансплантационного рецидива гемобластоза. При этом лимфоциты донора для адоптивной иммунотерапии были получены от того же донора миелотрансплантата (Таблица 19, Приложение 1).

В результате терапии у 5 больных удалось вновь достичь ремиссию с восстановлением полного донорского химеризма, продолжительностью от 2 до 127 месяцев (медиана 3 месяца). В одном случае через 3 недели после окончания иммунотерапии была констатирована прогрессия гемобластоза.

Во всех случаях адоптивная иммуноterapia выполнялась после предварительного проведения одного курса химиотерапии. При этом схемы адоптивной иммунотерапии второго посттрансплантационного рецидива, также как при первом рецидиве, включали в себя ТЛД на фоне ремиссии, индуцированной курсом химиотерапии (n=3), и ТЛД в период миелотоксического агранулоцитоза после химиотерапии (n=3).

Таким образом, лечение повторного посттрансплантационного рецидива ОМЛ трансфузиями лимфоцитов донора после проведения химиотерапии оказалось эффективным. Так, в 5 из 6 случаев (83 %) была достигнута ремиссия с восстановлением полного донорского кроветворения. Продолжительность полученного эффекта составила от 2 до 127 месяцев (медиана 3 месяца). В настоящее время живы 3 больных. По результатам исследования гемопоэтического химеризма сохраняется ремиссия с полным донорским химеризмом.

В двух случаях продолжительность ремиссии после второго эпизода ТЛД превышала (3 и 2 месяца против 26 и 127 месяцев, соответственно) эффект первого эпизода иммунотерапии.



### **3.2.1. ТЛД на фоне ремиссии, индуцированной курсом химиотерапии с последующим введением ИЛ-2**

В данную группу включены 3 больных ОМЛ. Второй посттрансплантационный рецидив был диагностирован через 2, 4 и 30 месяцев после 1-го эпизода адоптивной иммунотерапии.

Количество бластных клеток в костном мозге в момент констатации гематологического рецидива составляло 22, 32 и 92%, а процент донорского химеризма - 25%, 60%, 85%.

Клинико-гематологическая ремиссия ОМЛ была достигнута после проведения противорецидивного курса ХТ («7+3» двум больным и малые дозы цитарабина одной больной).

Доза CD3<sup>+</sup>клеток за одно переливание равнялось в среднем 9, 10 и 11x10<sup>7</sup>клеток/кг. Суммарно было перелито 18, 38 и 41x10<sup>7</sup>CD3<sup>+</sup>клеток/кг. Число трансфузий лимфоцитов донора составляло 2, 4 и 4 ТЛД.

В 2-х случаях после завершения трансфузий лимфоцитов донора было получено полное восстановление донорского кроветворения. Продолжительность ремиссии с полным донорским химеризмом после повторного эпизода адоптивной иммунотерапии составляла 3 и 26 месяцев.

У одного больного очередной рецидив развился через 3 месяца, он умер на фоне прогрессии ОМЛ. Второй больной обследовался последний раз через 26 месяцев после завершения иммунотерапии, у него сохранялась ремиссия на фоне полного донорского кроветворения, дальнейшая судьба его не известна.

В третьем случае, несмотря на достижение ремиссии после курса ХТ, на фоне ТЛД констатирована прогрессия заболевания.

### **3.2.2. ТЛД с последующим введением ИЛ-2 в период миелотоксического агранулоцитоза после курса химиотерапии**

Переливания лимфоцитов донора в период миелотоксического агранулоцитоза после курса химиотерапии выполнено 3 больным. Количество бластных клеток в костном мозге при втором посттрансплантационном рецидиве составляло от 7,5% до 45%. Процент клеток донорского кроветворения при этом был снижен до 55% - 80%.

В трех случаях предыдущий эпизод адаптивной иммунотерапии был эффективным и полный донорский химеризм сохранялся в течение 2, 10 и 14 месяцев.

Противорецидивный курс химиотерапии проводился по схеме «7+3» (цитарабин +митоксантрон) – 2-м больным, малые дозы цитарабина – одной больной.

Через 6-10 дней после окончания курса химиотерапии в период миелотоксического агранулоцитоза было выполнено первое переливание лимфоцитов донора. Количество CD3<sup>+</sup>клеток за одну трансфузию составляло 1; 5;  $9,5 \times 10^7$  клеток/кг. Суммарное количество CD3<sup>+</sup>клеток за все переливания равнялась 1; 16 и  $38 \times 10^7$  клеток/кг. При этом лимфоциты донора переливались 1, 3 и 4 раза.

Очередная ремиссия с восстановлением полного донорского химеризма после завершения трансфузий лимфоцитов донора была констатирована у всех 3-х больных. В настоящее время живы все, длительность наблюдения равна 2, 3 и 126 месяцев. Больным проводится поддерживающая терапия ИЛ-2.

Таким образом, применение лимфоцитов донора с последующим введением ИЛ-2 может обеспечить достижение очередной ремиссии с восстановлением полного донорского химеризма при лечении второго посттрансплантационного рецидива. Продолжительность эффекта после повторного эпизода адаптивной

иммунотерапии в некоторых случаях превышала длительность ремиссии после алло-ТГСК и после первого эпизода иммунотерапии.

В качестве иллюстрации успешной адоптивной иммунотерапии второго посттрансплантационного рецидива приводим описание клинического случая.

***Клинический пример 1. Больной Ф.А.Ю., 19 лет.***

*Острый миеломонобластный лейкоз (M4 –FAB) был диагностирован в сентябре 2001 года. Ремиссия достигнута после первого курса химиотерапии, включавшего цитарабин + даунорубицин + вепезид. С целью консолидации ремиссии ОМЛ было проведено еще два курса по схеме «7+3» (цитарабин+даунорубицин). Учитывая молодой возраст больного, прогностически неблагоприятный вариант острого лейкоза (M4), наличие гистосовместимого брата, в качестве интенсивной консолидации достигнутой ремиссии было решено выполнить трансплантацию аллогенных гемопоэтических стволовых клеток.*

*После проведения кондиционирования в миелоаблативном режиме (бусульфан + циклофосфамид) 14.07.02г. выполнена трансплантация HLA-совместимого MLC-ареактивного аллогенного костного мозга, в дозе  $4,3 \times 10^8$  миелокариоцитов/кг. По результатам контрольных исследований кроветворения на +30, +60, +90 дни после алло-ТГСК сохранялась ремиссия заболевания. 100% донорский химеризм был подтвержден молекулярным исследованием.*

*Через 3,5 месяца после алло-ТГСК появилась субфебрильная лихорадка, оссалгии, артралгии. В миелограмме обнаружено 95% бластных клеток. Результаты цитохимического и иммунофенотипического исследований свидетельствовали о миеломонобластном варианте острого лейкоза. Таким образом, констатирован ранний посттрансплантационный рецидив ОМЛ. Методом ПЦР выявлялся смешанный химеризм, содержание клеток донорского кроветворения было снижено до 5%.*

*С противорецидивной целью больному был проведен курс по схеме «7+3» (цитарабин + идарубицин). Послекурсовой период осложнился миелотоксическим агранулоцитозом, фебрильной лихорадкой, инфекционными осложнениями (двусторонняя плевропневмония, сепсис, язвенно-некротический стоматит, некротическая энтеропатия). В результате терапии антибиотиками широкого спектра действия осложнения купированы.*

Через 30 дней после окончания курса диагностирована вторая ремиссия ОМЛ с восстановлением полного донорского кроветворения. Далее была начата адоптивная иммунотерапия. Суммарно выполнено 4 переливания лимфоцитов донора в сочетании с ИЛ-2 в дозе 2 млн. МЕ. Количество перелитых  $CD3^+$  клеток за каждую трансфузию составило 8; 10,5; 9;  $12,5 \times 10^7$  клеток/кг, а суммарная доза равнялась  $40 \times 10^7$   $CD3^+$  клеток/кг.

Через 18 дней после последней ГЛД была диагностирована острая форма РТПХ с поражением кожи и кишечника, II степени. В результате иммуносупрессивной терапии (циклоsporин 3 мг/кг в сутки и преднизолон 2 мг/кг в сутки) клиника РТПХ полностью регрессировала через 10 дней.

Однако через 2 месяца после завершения трансфузий лимфоцитов донора констатирован 2-й рецидив ОМЛ. Количество бластных клеток в костном мозге составило 45%. Вновь выявлено снижение содержания клеток донорского кроветворения до 65%.

Проведен курс химиотерапии по схеме «7+3» (цитарабин+митоксантрон). Через 6 дней после окончания курса химиотерапии в период миелотоксического агранулоцитоза (лейкоциты –  $0,3 \times 10^9$  клеток/л) были перелиты лимфоциты донора, содержащие  $7 \times 10^7$   $CD3^+$  клеток/кг, а через 2 часа после переливания выполнена инфузия ИЛ-2 в дозе 6 млн.МЕ. Лимфоциты донора + ИЛ-2 выполнялись 4 раза. Медиана количества переливаемых за одну процедуру  $CD3^+$  клеток составила  $9,5 \times 10^7$   $CD3^+$  клеток /кг, а суммарное количество равнялось  $38 \times 10^7$   $CD3^+$  клеток/кг.

Через 41 день после первого переливания лимфоцитов донора при исследовании кроветворения содержание бластных клеток составляло 1,5%, а донорский химеризм вновь восстановился до 100%. Признаков РТПХ после окончания иммунотерапии не отмечено.

В качестве поддерживающей терапии было назначено проведение пятидневных курсов ИЛ-2 в дозе 2 млн.МЕ., с интервалом между курсами 4-5 недель. В течение 7,5 лет больному продолжалась поддерживающая терапия, всего выполнено 60 курсов. Затем поддерживающая терапия была прекращена. Каких-либо осложнений иммунологического характера в течение этого срока не наблюдалось. Больной жив в

настоящее время в течение 127 месяцев после завершения трансфузий лимфоцитов донора. Сохраняется ремиссия и полное донорское кроветворение.

### **3.3. Применение трансфузий лимфоцитов донора при убывающем донорском химеризме после алло-ТГСК**

8 больным (7 больных ОМЛ, 1 больная ХМЛ) ТЛД с последующим введением ИЛ-2 выполнялись на фоне полной ремиссии с убывающим донорским химеризмом, о чем свидетельствовало снижение содержания клеток донорского генотипа в костном мозге пациента или отсутствие прироста донорского химеризма в течение 3-4 месяцев после алло-ТГСК. Основной целью превентивного проведения адоптивной иммунотерапии в данном случае являлось достижение полного донорского химеризма.

У 6 из 7 больных ОМЛ адоптивная иммунотерапия проводилась на ранних сроках (медиана 3,5 месяца) после алло-ТГСК, в связи с убывающим донорским химеризмом. Количество бластных клеток в костном мозге составляло от 1 % до 4%, что подтверждало сохраняющуюся гематологическую ремиссию ОМЛ. Содержание клеток донорского генотипа в костном мозге реципиента на момент начала иммунотерапии не превышало 55% - 90%.

В одном случае через 24 месяца после алло-ТГСК на фоне гематологической ремиссии (в миелограмме 2,5% бластных клеток) был диагностирован молекулярный (выявлена экспрессия гена *PML-RARa*) и цитогенетический (методом FISH 0,8% клеток *PML-RARa*- позитивных) рецидив ОПЛ. При этом процент клеток донорского кроветворения снизился со 100% до 90%.

Количество перелитых донорских  $CD3^+$ клеток за одну трансфузию колебалось от 1 до  $9,5 \times 10^7 CD3^+$ клеток/кг, а медиана числа перелитых лимфоцитов равнялась  $4 \times 10^7 CD3^+$ клеток/кг. Лимфоциты донора переливали от 1 до 5 раз

(медиана 3). Суммарное количество перелитых CD3<sup>+</sup> клеток составило от 1 до 34x10<sup>7</sup> клеток/кг (медиана 16 x10<sup>7</sup> клеток/кг).

У 4-х из 7 больных ОМЛ в результате переливаний лимфоцитов донора с последующим введением ИЛ-2 было отмечено постепенное увеличение показателей донорского химеризма вплоть до полной замены хозяйского на донорское кроветворение.

Время от первой ТЛД до констатации полного донорского химеризма составляло от 15 до 82 дней (медиана 44 дня). Продолжительность достигнутого эффекта, то есть стойкого присутствия полного донорского химеризма у 4-х больных ОМЛ, колебалась от 2 до 23 месяцев (медиана 15 месяцев). Во всех 4-х случаях успешной адоптивной иммунотерапии наличие ответа было ассоциировано с манифестацией острой РТПХ. В одном случае у больной в течение 18 месяцев после иммунотерапии сохранялся полный донорский химеризм, а также экстенсивная форма хронической РТПХ с поражением легких, которая явилась причиной смерти.

В настоящее время живы 3 из 4 больных ОМЛ с сохраняющимся полным донорским кроветворением. Длительность наблюдения равняется 3, 15 и 25 месяцам от начала адоптивной иммунотерапии.

У остальных 3-х больных ОМЛ в результате адоптивной иммунотерапии не удалось достичь полного донорского химеризма. На фоне гематологической ремиссии в костном мозге у этих больных выявлялись клетки хозяйского и донорского кроветворения. Продолжительность гематологической ремиссии со смешанным донорским химеризмом в этой группе больных составила 2, 3, 23 месяцев. В двух случаях констатировано отторжение миелотрансплантата с последующим восстановлением собственного кроветворения. У одной больной восстановление произошло без признаков заболевания, во втором случае больная скончалась от прогрессии острого лейкоза. У третьего больного сохраняется молекулярная и цитогенетическая ремиссия, однако количество клеток донорского кроветворения колеблется от 75% до 90%.

В настоящее время живы двое больных, им проводится поддерживающая химиотерапия (в одном случае малые дозы цитарабина, во втором случае введение триоксида мышьяка). Длительность наблюдения составляет 14 и 23 месяца. В таблице 20 представлена характеристика адоптивной иммунотерапии, проводившейся по поводу убывающего донорского химеризма после алло-ТГСК у больных ОМЛ.

Таким образом, применение ТЛД в связи с убывающим донорским химеризмом у 4 из 7 больных (57%) ОМЛ обеспечить достижение полного донорского химеризма. В этих случаях продолжительность полной ремиссии у 3-х и 4-х пациентов с ОМЛ составила 15-25 месяцев.

Небольшое количество больных, включенных в данное исследование, не позволяет сделать какие-либо достоверные выводы. Однако, возможность обеспечения полноценного приживления миелотрансплантата более чем у половины больных, представляется весьма оптимистичными результатами адоптивной иммунотерапии.

В связи с тем, что убывающий донорский химеризм после алло-ТГСК при ХМЛ была диагностирована только у одной пациентки, подробный анализ выполнения ей адоптивной иммунотерапии представлен в виде клинического примера.

**Таблица 20. Параметры убывающего донорского химеризма после алло-ТГСК у больных ОМЛ и эффективность адоптивной иммунотерапии**

Параметры	Характеристика адоптивной иммунотерапии при убывающем донорском химеризме						
	1	2	3	4	5	6	7
Номер больного	1	2	3	4	5	6	7
Интервал от алло-ТГСК до начала ТЛД, месяцы	24	3	3,5	4	3,5	3,5	8
Количество бластных клеток в костном мозге до начала ТЛД, %	2,5	3	1,5	2	1	4	2,4
Донорский химеризм до начала ТЛД, %	95	70	80	85	55	85	60
Медиана количества CD3+ клеток перелитых за одну трансфузию, $\times 10^7$ клеток/кг	9,5	5	1	1	3,9	5	4
Суммарное количество перелитых CD3+ клеток, $\times 10^7$ клеток/кг	34	16	1	1	7,8	16	19
Количество ТЛД	4	3	1	1	2	3	5
Восстановление полного донорского химеризма	Да (n=4)				Нет (n=3)		
Время до констатации полного донорского химеризма после первой ТЛД, дни	32	56	82	15	0	0	0
Продолжительность эффекта после иммунотерапии, месяцы	18	23	12	2	0	0	0
Продолжительность наблюдения после первой ТЛД, месяцы	20	25	15	3	5	23	14
	Смерть от РПХ	Жив	Жива	Жив	Смерть от прогрессии	Жива	Жив
						Поддерживающая химиотерапия	

**Клинический пример 2. Больная Г.С.Г., 24 года.**

Диагноз ХМЛ (хроническая фаза) был установлен в августе 2005 г. В дебюте заболевания в анализе крови выявляли гиперлейкоцитоз (лейкоциты  $270 \times 10^9/\text{л}$ ), бластные клетки 9%, умеренную анемию (гемоглобин 105 г/л). В миелограмме - 1,5% бластных клеток. При цитогенетическом исследовании клеток костного мозга в 100% метафаз была обнаружена  $t(9;22)$ . По данным УЗИ отмечено увеличение размера селезенки 230 x 122 мм.



*В результате терапии иматинибом (в начальной дозе 600 мг в сутки с последующим снижением дозы до 400 мг в сутки в связи с плохой переносимостью) в марте 2006 г. был достигнут полный цитогенетический ответ, подтвержденный FISH исследованием: химерный ген BCR-ABL не выявлен. Однако сохранялись увеличенный размер селезенки (145 x 70 мм).*

*Учитывая молодой возраст больной и наличие гистосовместимого сиблинга, в качестве интенсивной консолидации было решено выполнить алло-ТГСК.*

*После кондиционирования в миелоаблативном режиме (бусульфан + циклофосфамид) 07.06.06 была выполнена трансплантация аллогенного HLA-совместимого MLC-реагтивного костного мозга от родного брата. Перелито  $3,1 \times 10^6$  миелокариоцитов/кг массы тела больной. Профилактику РТПХ проводили метотрексатом, циклоспорином и преднизолоном. Контроль гемопоэтического химеризма проводили ежемесячно методом FISH с исследованием ДНК-зондов к центромерным участкам X/Y-хромосом в клетках костного мозга.*

*По результатам исследования кроветворения через 2 месяца после алло-ТГСК были подтверждены полный донорский химеризм, цитогенетическая и молекулярная ремиссия заболевания (химерный ген BCR-ABL, а также экспрессия гена BCR-ABL p210 – не выявлялись). Через 5 месяцев после алло-ТГСК была полностью отменена профилактика РТПХ.*

*Однако при мониторинге гемопоэтического химеризма с +3-го до +9-го месяцы после алло-ТГСК наблюдалось постепенное уменьшение количества клеток донорского генотипа на фоне сохраняющейся цитогенетической и молекулярной ремиссии ХМЛ. Так, донорский химеризм через 3 месяца составлял 97%, через 5 месяцев - 95%, а через 7 месяцев – 88%. К +9-му месяцу после алло-ТГСК содержание клеток донорского кроветворения снизилось до 85%.*

*Учитывая высокий риск рецидива заболевания на фоне убывающего донорского химеризма, больной была проведена адоптивная иммунотерапия, включавшая 4 ТЛД с интервалом в 1 неделю. Количество перелитых  $CD3^+$ -клеток за каждую трансфузию составило 4,5 - 9 - 4 -  $8 \times 10^7$  клеток/кг массы тела больного, а суммарная доза перелитых лимфоцитов донора равнялась  $25,5 \times 10^7$   $CD3^+$ -клеток/кг. После каждой процедуры ТЛД вводили ИЛ-2 в дозе 2 млн. МЕ.*

*Через 2 недели после завершения адоптивной иммунотерапии количество клеток донорского кроветворения в костном мозге реципиента оставалось практически на прежнем уровне и равнялось 87%. Однако, через 2 месяца после окончания адоптивной иммунотерапии показатели смешанного химеризма возросли до 95%, хотя полного восстановления донорского кроветворения достичь не удалось. Признаков РТПХ на фоне и после окончания иммунотерапии не отмечено.*

*При обследовании через 5 месяцев после курса ТЛД были выявлены цитогенетические - t(9,22) в 2% клеток костного мозга и молекулярно-биологические - экспрессия гена BCR-ABL p210 - маркеры рецидива ХМЛ. При этом содержание клеток донорского кроветворения в костном мозге по данным FISH-исследования составляло 92%. Больной была начата терапия ИНФ-альфа в дозе 1 млн. МЕ, подкожно, 3 раза в неделю.*

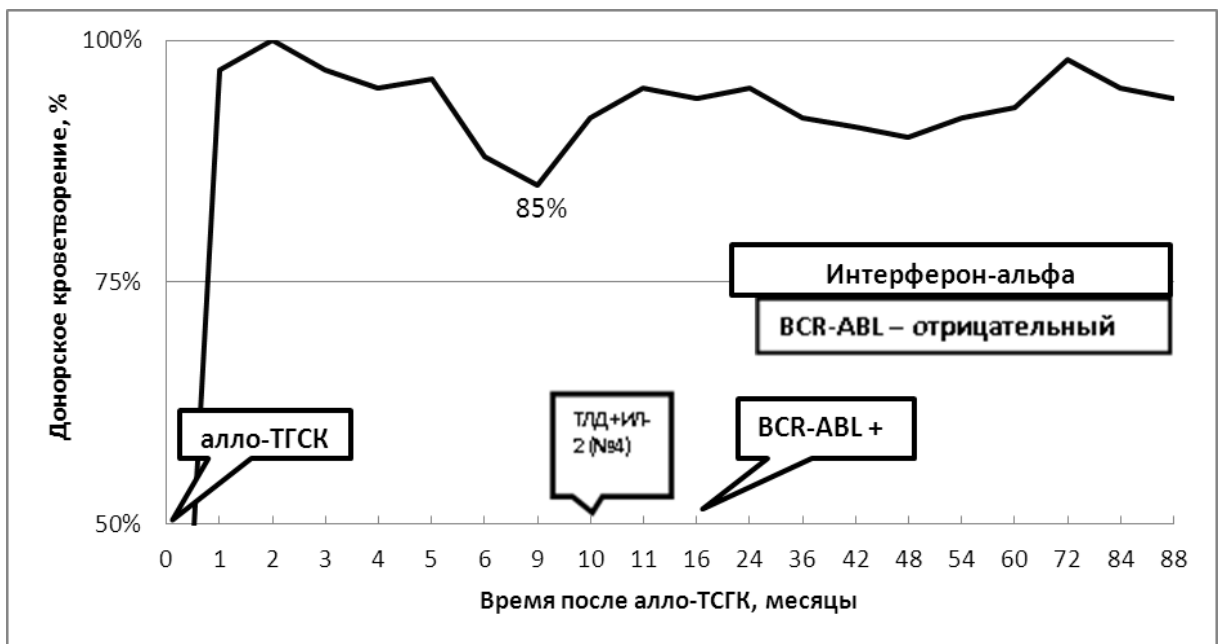
*Контрольное цитогенетическое и молекулярно-биологическое обследование через 3 мес терапии ИНФ-альфа выявило полное исчезновение маркеров ХМЛ. Лечение ИНФ-альфа продолжается в течение 72 мес. Весь этот период сохраняется цитогенетическая и молекулярная ремиссия ХМЛ, в то время как донорский химеризм остается в пределах 90-95%.*

*Представленный клинический случай демонстрирует сложную систему посттрансплантационной иммунологической толерантности. Смешанный гемопозитический химеризм сохраняется у больной ХМЛ в течение длительного времени – более 7 лет после аллогенной миелотрансплантации. За весь период наблюдения содержание клеток донорского генотипа в костном мозге реципиента колебалось от 85 до 97%. ТЛД, применявшиеся с целью предупреждения посттрансплантационного рецидива на фоне убывающего донорского химеризма, не обеспечили полного восстановления донорского кроветворения. Несмотря на большую суммарную дозу CD3<sup>+</sup>-клеток ( $25,5 \times 10^7$  клеток/кг массы тела больной), адоптивная иммунотерапия не сопровождалась РТПХ.*

*Изменения состояния гемопозитического химеризма на фоне адоптивной иммунотерапии, проводимой в посттрансплантационном периоде, представлены на рисунке 8.*

*Сосуществование резидуального «хозяйского» кроветворения и клеток донора, отсутствие РТПХ как после алло-ТГСК, так и после ТЛД, привело к ослаблению реакции «трансплантат против лейкоза», что вероятно и явилось причиной рецидива ХМЛ через 16 месяцев после алломиелотрансплантации.*

*Тем не менее, данный клинический случай свидетельствует о возможности длительной многолетней цитогенетической и молекулярной ремиссии ХМЛ на фоне смешанного гемопоэтического химеризма при условии постоянного применения ИНФ-альфа.*



**Рисунок 8. Динамика гемопоэтического химеризма у больной ХМЛ, на фоне адоптивной иммунотерапии в посттрансплантационном периоде при убывающем донорском химеризме.**

## Глава 4. Реакция «трансплантат против хозяина» после адоптивной иммунотерапии

Реакция «трансплантат против хозяина», являющаяся одним из основных осложнений адоптивной иммунотерапии, была диагностирована у 20 из 52 больных (38%), получивших трансфузий лимфоцитов донора. Среди 20 больных с острой РТПХ после переливания лимфоцитов донора, у 18 (90%) была достигнута ремиссия гемобластоза с восстановлением полного донорского химеризма.

### 4.1. Острая форма РТПХ после адоптивной иммунотерапии

Острая РТПХ была диагностирована у 20 из 52 больных (38%), наблюдавшихся нами. Данное осложнение присоединялось через 0,5 – 3 месяца после первой ТЛД (медиана 1,5 месяца). Тяжесть течения острой РТПХ в 8 случаях соответствовала I-II степени и в 12 случаях - III-IV степени. В половине случаев выявлялось поражение двух органов-мишеней, поражение одного органа диагностировано в 4 (20%), трех органов – в 4 (20%), четырех органов – в 2 (10%) случаях. Летальных исходов от острой РТПХ после адоптивной иммунотерапии не было (Таблица 21).

**Таблица 21. Клиническая характеристика и частота острой РТПХ после адоптивной иммунотерапии (n= 20)**

Тяжесть острой РТПХ	Частота острой РТПХ	Частота поражения органов-мишеней						
		1 орган		2 органа			3 органа	4 органа
		Кожа	Кишечник	Кожа + печень	Печень + кишечник	Кожа + Кишечник	Кожа + Печень + Кишечник	Кожа + Печень + Кишечник + Легкие
I – II степень	8 (40%)	2	1	3	1	0	1	0
III – IV степень	12 (60%)	1	0	3	1	2	3	2

Наиболее часто (16 из 20 случаев - 80%) отмечалось поражение кожи, в 14 (70%) случаях – острая РТПХ протекала с поражением печени, в 10 (50%) случаях с поражением кишечника и 2-х (10%) случаях были вовлечены легкие (Таблица 22).

**Таблица 22. Частота поражения органов-мишеней при острой РТПХ после адоптивной иммунотерапии (n= 20)**

Органы мишени	Число случаев	Частота поражения
Кожа	16	80%
Печень	14	70%
Кишечник	10	50%
Легкие	2	10%

В таблице 23 отражены сроки развития острой РТПХ у больных после адоптивной иммунотерапии, а также эффективность и длительность сохранения достигнутой ремиссии с полным донорским химеризмом.

**Таблица 23. Сроки развития острой РТПХ у больных после адоптивной иммунотерапии и эффективность лечения (n= 20)**

	Время развития острой РТПХ, месяцы после первой ТЛД	Количество ТЛД	Время достижения полного донорского химеризма, месяцы от первой ТЛД	Длительность эффекта, месяцы от первой ТЛД, месяцы	Длительность наблюдения, месяцы
Разброс	0,5 - 3	1 - 4	0,5 - 5	2 - 76	2- 130
Медиана	2	3	1	8	14 Живы 9 (45%)

Время от первого переливания лимфоцитов донора до манифестации острой РТПХ в среднем составляло 2 месяца (от 0,5 до 3 месяцев). Число трансфузий лимфоцитов донора колебалось от 1 до 4 (медиана – 3). Ремиссия с восстановлением полного донорского химеризма была диагностирована в среднем через 1 месяц (разброс от 0,5 до 5 месяцев) от первого переливания лимфоцитов донора. При этом медиана продолжительности сохранения полного ответа составила в среднем 8 месяцев (от 2 до 76 месяцев).

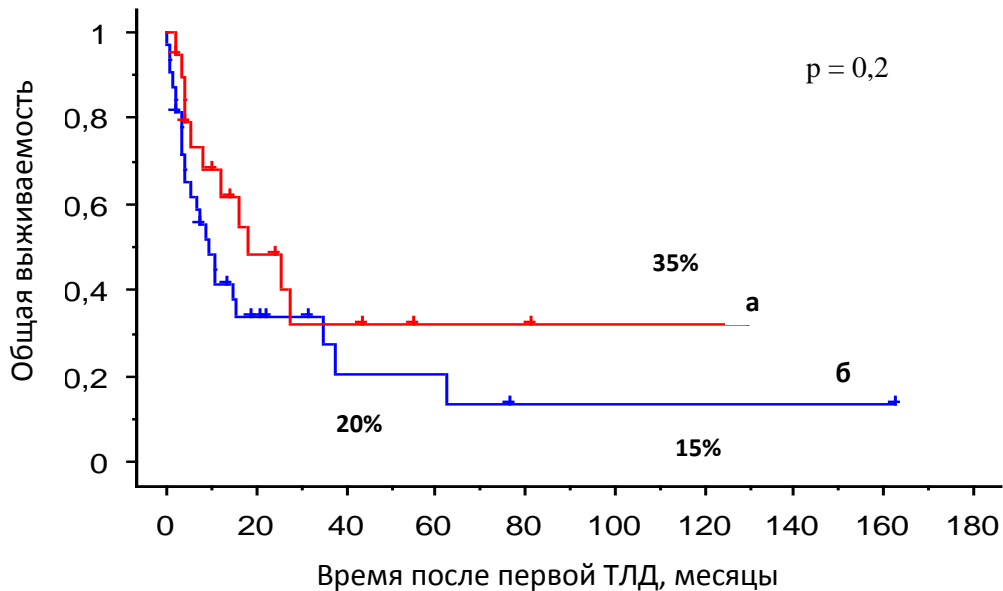
При исследовании химеризма через 1 месяц после первого переливания лимфоцитов донора у 50% больных с острой РТПХ уже выявлялось полное восстановление донорского кроветворения. У других 40% больных для восстановления донорского химеризма потребовалось чуть больше времени (от 2 до 5 месяцев). И у 2-х (10%) больных с острой РТПХ переливания лимфоцитов донора не обеспечили достижение ремиссии, на фоне убывающего донорского химеризма наблюдалась прогрессия заболевания.

Таким образом, достижение полного донорского химеризма после адоптивной иммунотерапии происходило в среднем через 1 месяц после первой ТЛД, а медиана времени до развития острой РТПХ составляла 2 месяца.

У 32 из 52 (62%) больных после адоптивной иммунотерапии не было отмечено клиники РТПХ. В данную группу вошли 19 больных ОМЛ, 3 больных ОЛЛ, 6 больных ХМЛ и 4 больных МДС. Суммарное количество перелитых им лимфоцитов донора было весьма большим и составляло в среднем  $19 \times 10^7 \text{CD3}^+$  клеток/кг ( $1-76 \times 10^7$  клеток/кг), при этом каждому больному было выполнено от 1 до 4 трансфузий (медиана 3).

В результате проведенной адоптивной иммунотерапии в этой группе больных ремиссия с восстановлением полного донорского химеризма была достигнута всего лишь у 11 (34%). В то время как среди больных с острой РТПХ частота восстановления донорского кроветворения достигала 90%. Время от начала адоптивной иммунотерапии до подтверждения полного донорского химеризма также было несколько продолжительнее: при медиане в 2 месяца, сроки колебались от 1 до 11 месяцев. Тем не менее, продолжительность полученного эффекта в среднем равнялась 8 месяцам (от 2 до 160 месяцев), что соответствовало таковому у больных с острой РТПХ.

Влияние острой РТПХ на длительность сохранения результатов у больных после адоптивной иммунотерапии проиллюстрирована на рисунке 8.



**Рисунок 8. Общая выживаемость больных гемобластозами в зависимости от наличия (а) или отсутствия (б) острой РТПХ после адоптивной иммунотерапии**

Как видно из рисунка 8, показатели пятилетней выживаемости у больных с острой РТПХ после адоптивной иммунотерапии оказались более высокими: 35% против 20%, соответственно. Данная зависимость не является статистически достоверной ( $p = 0,2$ ), хотя десятилетнее наблюдение за этими пациентами свидетельствует о сохраняющейся разнице общей выживаемости в пользу наличия острой РТПХ.

В 14 из 20 случаев острая РТПХ трансформировалась в хроническую форму, а в 6 случаях острая РТПХ, развившаяся после адоптивной иммунотерапии, была полностью купирована в результате иммуносупрессивной терапии. Эффективность адоптивной иммунотерапии в этой группе больных мы рассмотрели отдельно. Как представлено в таблице 24 длительность эффекта, а именно ремиссии на фоне сохраняющегося полного донорского кроветворения после трансфузий лимфоцитов донора, оказалась крайне непродолжительной. При медиане в 2 месяца максимальная продолжительность эффекта не превысила 4 месяцев. Из 6 больных только у одного пациента продолжительность наблюдения достигала 130 месяцев. Столь высокие показатели общей выживаемости у этого

больного обусловлены тем, что ему был проведен второй эпизод адоптивной иммунотерапии по поводу повторного рецидива.

**Таблица 24. Эффективность адоптивной иммунотерапии у больных с излеченной острой формой РТПХ (n=6)**

	Количество ТЛД	Время до восстановления полного донорского химеризма, месяцы от первой ТЛД	Длительность эффекта, месяцы от 1-й ТЛД, месяцы	Длительность наблюдения, месяцы от 1-й ТЛД, месяцы
Разброс	1 - 4	0,5 – 2	1,5 – 4	2- 130
Медиана	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>4</b> жива 1 (17%)

#### **4.2. Хроническая форма реакции РТПХ после адоптивной иммунотерапии**

Хроническая форма РТПХ в результате ТЛД была диагностирована у 16 больных (31%) больных. При этом в 14 из 16 случаев хроническая РТПХ трансформировалась из острой формы, а в 2-х случаях хроническая РТПХ развилась без предшествующей острой реакции (через 5 и 8 месяцев от начала адоптивной иммунотерапии).

Время от начала иммунотерапии до развития хронической формы РТПХ составляло от 3 до 8 месяцев (медиана 3 месяца).

Поражение одного органа мишени отмечалось в 7 (44%) случаях, двух органов – также в 7 (44%) случаях и трех органов - в 2 (12%) случаях (Таблица 25).



**Таблица 25. Клиническая характеристика и частота хронической формы РТПХ после адоптивной иммунотерапии (n= 16)**

Форма хронической РТПХ	Частота хронической РТПХ	Количество пораженных органов							
		1 орган		2 органа				3 органа	
		Кожа	Кишечник	Кожа + печень	Печень + Легкие	Кожа + Кишечник	Кожа + Легкие	Кожа + Печень + Кишечник	Кожа + Печень + Легкие
Локальная	10 (63%)	4	1	3	1	0	0	0	1
Экстенсивная	6 (37 %)	2	0	0	0	1	2	1	0

В большинстве случаев (13 больных - 81%) хроническая РТПХ протекала с поражением кожи, с поражением печени - у 7 больных (44%), с вовлечением кишечника - у 3-х больных (19 %) и легких - у 4-х больных (25%). Локальную форму РТПХ (63% - 10 случаев) диагностировали чаще, чем экстенсивную форму (37% - 6 случаев) (Таблица 26). В одном случае основной причиной летального исхода послужила хроническая РТПХ с поражением легких, которую не удалось купировать, несмотря на проводимую иммуносупрессивную терапию.

**Таблица 26. Частота поражения органов-мишеней при хронической РТПХ у больных после адоптивной иммунотерапии (n= 16)**

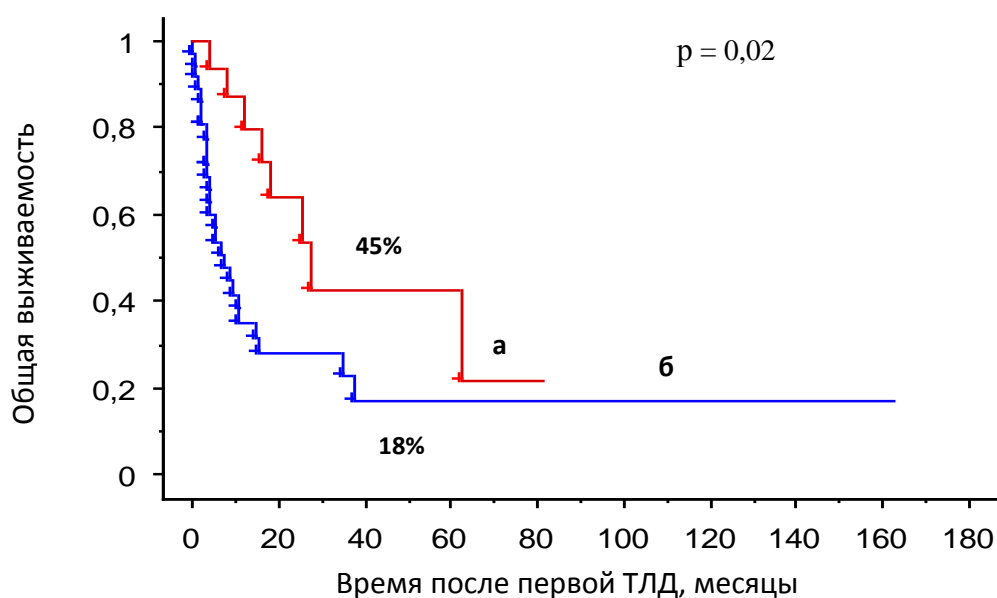
Органы мишени	Число случаев	Частота поражения
Кожа	13	80%
Печень	14	70%
Кишечник	10	50%
Легкие	2	10%

Чтобы оценить влияние острой и хронической РТПХ на продолжительность эффекта после проведения адоптивной иммунотерапии, мы сопоставили результаты, представленные в таблице 23 и 27. Оказалось, что длительность ремиссии с сохраняющимся полным донорским химеризмом при наличии

хронической РТПХ в 1,6 раза (13 против 8 месяцев) превышает таковую у больных с острой РТПХ.

**Таблица 27. Время развития хронической РТПХ у больных после адоптивной иммунотерапии (n= 16)**

	Время развития хронической РТПХ, месяцы после 1-й ТЛД	Количество ТЛД	Время достижения полного донорского химеризма, месяцы от первой ТЛД	Длительность эффекта, месяцы от 1-й ТЛД	Длительность наблюдения, месяцы
Разброс	3 - 15	1 - 4	0,5 – 8,0	6 - 76	4 - 82
Медиана	2	3	1,5	13	20 живы 8 (50%)



**Рисунок 9. Общая выживаемость больных гемобластозами после адоптивной иммунотерапии в зависимости от наличия (а) или отсутствия хронической РТПХ (б)**

На рисунке 9 представлены кривые общей выживаемости больных, в зависимости от наличия или отсутствия хронической РТПХ после ТЛД. Данный рисунок демонстрирует достоверно лучшие показатели пятилетней общей выживаемости пациентов, у которых в результате адоптивной иммунотерапии

имела место хронической РТПХ. Так, пятилетняя общая выживаемость больных после адоптивной иммунотерапии, проводившейся по поводу посттрансплантационного рецидива или убывающего донорского химеризма, в случае присоединения хронической РТПХ составила 45%, а в случае отсутствия хронической РТПХ - лишь 18% ( $p = 0,02$ ). Полученные результаты свидетельствуют о важной роли хронической РТПХ в поддержании стабильного донорского химеризма, и прямой связи её с реакцией «трансплантат против лейкоза».

**Таблица 28. Сводная таблица результатов адоптивной иммунотерапии в зависимости от наличия РТПХ**

Параметр	Результаты адоптивной иммунотерапии в зависимости от наличия РТПХ			
	Острая РТПХ (n= 20)	Хроническая РТПХ (n= 16)	Излеченная острая РТПХ (n= 6)	Не было РТПХ (n=32)
Частота достижения ремиссии с полным донорским химеризмом	90%	94%	83%	34%
Время восстановления полного донорского химеризма, месяцы от первой ТЛД	1	1,5	1	2
Продолжительность эффекта после иммунотерапии, месяцы от первой ТЛД	8	13	2	8
Продолжительность наблюдения после иммунотерапии, месяцы от первой ТЛД	14	20	4	11
Количество живущих больных	9 (45%)	8 (50%)	1 (17%)	9 (28%)

В таблице 28 представлены сравнительные результаты адоптивной иммунотерапии в зависимости от наличия РТПХ. Как видно из таблицы, частота восстановления полного донорского химеризма у больных с острой и хронической РТПХ, а также в случае излечения (купирования) острой РТПХ, была практически одинаковой (83-94%) и значительно отличалась от таковой у больных без РТПХ (34%). Время, потребовавшееся на полноценное восстановление донорского кроветворения, было одинаковым во всех 4-х группах больных. В то же время продолжительность сохранения ремиссии и

донорского химеризма существенно отличалась в пользу больных с хронической РТПХ (13 месяцев при наличии хронической РТПХ против 8 месяцев при отсутствии хронической формы у больных с острой РТПХ). Если же острую РТПХ удавалось полностью купировать в ближайшие сроки после её возникновения, то продолжительность ремиссии и общая выживаемость у этих больных были самыми пессимистичными (2 и 4 месяцев, соответственно).

#### **4.3. Влияние химиотерапии, предшествовавшей ТЛД, на частоту развития РТПХ**

Поскольку адоптивная иммунотерапия посттрансплантационного рецидива гемобластоза проводилась по двум основным схемам: ТЛД в виде монотерапии и ТЛД после химиотерапии, нами проведено исследование - влияет ли предшествовавшая трансфузиям лимфоцитов донора химиотерапия на частоту развития РТПХ.

В 15 из 44 случаев (34%) ТЛД выполнялись в виде монотерапии. У 3 (20%) из этих больных после адоптивной иммунотерапии была диагностирована острая и хроническая формы РТПХ. 29 из 44 больных (66%) ТЛД выполнялись после предшествовавшей химиотерапии. Частота РТПХ в этой группе больных оказалась значительно выше. Так, острая РТПХ была диагностирована у 45% больных, а хроническая РТПХ – у 34% больных (Таблица 29, Приложение 1).

Наиболее часто острая (52%) и хроническая (39%) формы РТПХ отмечалась у больных, ТЛД которым осуществлялись в период миелотоксического агранулоцитоза. В тоже время следует отметить, что предварительное проведение химиотерапии способствовало вдвое более частому достижению ремиссии и полному восстановлению донорского кроветворения (69% против 33%).

Частота РТПХ у больных, которым ТЛД выполнены в период миелотоксического агранулоцитоза, рассмотрена более подробно. Схемы курсов ХТ, предшествовавших ТЛД, отличались по интенсивности. Так 19 из 23 больных проводился интенсивный курс ХТ (по схеме «7+3», FLAG-Ida и др.), а 4 больным

с противорецидивной целью были применены схемы химиотерапии средней интенсивности (малые дозы цитарабина, курс децитабина).

Острая РТПХ после интенсивных курсов ХТ была диагностирована в 10 из 19 случаев (53%), а хроническая форма – в 9 (47%).

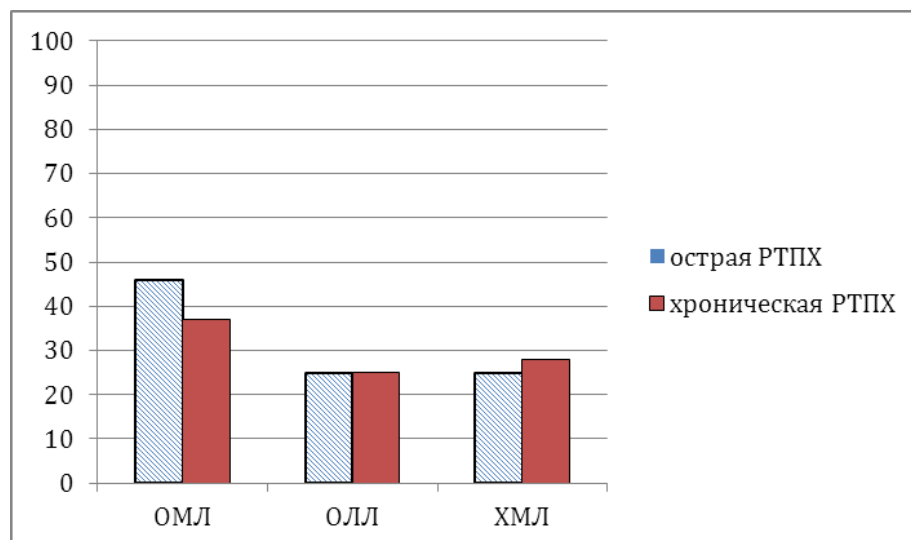
В тоже время ни одного случая острой и хронической РТПХ не было диагностировано, в группе больных, у которых трансфузиям лимфоцитов предшествовало проведение менее интенсивной схемы химиотерапии.

#### **4.4. Частота РТПХ после адоптивной терапии в зависимости от нозологической формы, режима кондиционирования и наличия РТПХ после алломиелотрансплантации**

Нами изучена зависимость частоты РТПХ после ТЛД от нозологической формы заболевания. Острая РТПХ после проведения адоптивной иммунотерапии манифестировала у 16 (46%) из 35 пациентов с ОМЛ, у 1-го (25%) из 4-х пациентов с ОЛЛ, у 3-х (33%) из 9 с ХМЛ.

Хроническая форма РТПХ после ТЛД диагностирована у 13 (37%) из 35 больных с ОМЛ, у 1-го (25%) с ОЛЛ, у 2-х (28%) с ХМЛ. Ни в одном случае среди пациентов с МДС после ТЛД ни острая, ни хроническая РТПХ не присоединилась.

Как представлено на рисунке 10, наибольшая частота острой и хронической РТПХ после ТЛД была отмечена у пациентов с ОМЛ (46% и 37%, соответственно). Несколько реже обе формы РТПХ были диагностированы у больных ХМЛ. У больных ОЛЛ данное осложнение присутствовало в значительно меньшем количестве случаев.



**Рисунок 10. Частота развития РТПХ после адоптивной иммунотерапии в зависимости от нозологической формы**

Возможно, именно присутствие РТПХ после адоптивной иммунотерапии способствовало достижению наибольшего эффекта у пациентов с ОМЛ (64 %) и ХМЛ (63%). Лимфоциты донора в качестве лечения посттрансплантационного рецидива ОЛЛ и МДС оказались мало эффективными.

Нами также была исследована зависимость частоты РТПХ после трансфузий лимфоцитов донора от режима предтрансплантационного кондиционирования.

Миелоаблативный режим кондиционирования был выполнен 34 из 52 больных (65%), у 14 (41%) из них после адоптивной иммунотерапии была диагностирована острая РТПХ. У пациентов, которым кондиционирование было проведено в режиме пониженной интенсивности, частота острой РТПХ составила 33 % (6 из 18 случаев).

Хроническая РТПХ после переливаний лимфоцитов донора, у пациентов с миелоаблативным режимом кондиционирования развилась в 13 из 34 случаев (38%), а после режима пониженной интенсивности - в 3 из 18 случаев (17%) (Таблица 30).

**Таблица 30. Частота развития РТПХ после адоптивной иммунотерапии в зависимости от режима кондиционирования**

Параметр		Число больных	Ремиссия с полным донорским химеризмом	Частота РТПХ	
				Острая	Хроническая
Режим кондиционирования	Миелоаблативный	34	23 (68%)*	14 (41%)	13 (38%)
	Немиелоаблативный	18	6 (33%)*	6 (33%)	3 (17%)

\*-  $p = 0,02$

Таким образом, в нашем наблюдении более высокая интенсивность предтрансплантационного кондиционирования сопровождалась более высоким риском развития РТПХ после адоптивной иммунотерапии, хотя следует учитывать, что эти различия оказались статистически недостоверными. Однако, частота достижения ремиссии с полным донорским химеризмом статистически достоверно была выше у больных, которым был проведен миелоаблативный режим кондиционирования (68% против 33%,  $p = 0,02$ ).

Представляло большой интерес, имеется ли какая-либо зависимость частоты РТПХ после адоптивной иммунотерапии лимфоцитами донора от наличия РТПХ в раннем посттрансплантационном периоде.

В таблице 31 представлены данные, сравнивающие частоту РТПХ после алло-ТГСК и после адоптивной иммунотерапии. Оказалось, что наличие или отсутствие острой РТПХ после алломиелотрансплантации не влияло на частоту острой или хронической РТПХ после адоптивной иммунотерапии.

Что же касается хронической РТПХ после алло-ТГСК, то в этом случае прослеживается некоторая зависимость. Так, среди больных, имевших хроническую РТПХ после алло-ТГСК, частота этого осложнения после ТЛД не превысила 11% (для острой) и 22% (для хронической) формы.

**Таблица 31. Сопоставление частоты РТПХ после алло-ТГСК и частоты РТПХ после адоптивной иммунотерапии**

РТПХ после алло-ТГСК		Число больных	Частота РТПХ после ТЛД	
			Острая РТПХ	Хроническая РТПХ
Острая форма	Да	13	5 (38 %)	3 (23 %)
	Нет	39	15 (38 %)	13 (33 %)
Хроническая форма	Да	9	1 (11 %)*	2 (22 %)
	Нет	43	19 (44 %)*	14 (33 %)

\* -  $p = 0,1$

А среди 43 больных, переживших посттрансплантационный период без хронической РТПХ, частота развития острой (44%) и хронической (33%) РТПХ после адоптивной иммунотерапии была весьма высока, хотя выявленные различия оказались статистически недостоверными.

Тем не менее, по отношению к пациентам, у которых после алло-ТГСК отсутствовала хроническая РТПХ, должна быть повышенная настороженность в плане высокого риска развития этого осложнения после адоптивной иммунотерапии. Возможно, именно этим пациентам необходима более тщательная отработка алгоритма начальной дозы CD3<sup>+</sup> клеток и последующее ее эскалации при проведении адоптивной иммунотерапии. Хотя необходимо учитывать, что наличие именно хронической РТПХ после ТЛД сопряжено с максимальным эффектом «трансплантат против лейкоза».



## **Глава 5. Результаты адоптивной иммунотерапии в зависимости от дозы перелитых лимфоцитов донора и режима их введения**

В данной главе изучена эффективность трансфузий лимфоцитов донора, а также частота иммунологических осложнений в зависимости от интенсивности адоптивной иммунотерапии.

Количество перелитых лимфоцитов донора при проведении адоптивной иммунотерапии варьировало в широких пределах. Так, число  $CD3^+$  клеток, перелитых за одну лечебную процедуру колебалось от 1 до  $20 \times 10^7$  клеток/кг (медиана  $7 \times 10^7$  клеток/кг). Суммарное количество  $CD3^+$  клеток, примененных за весь период адоптивной иммунотерапии, составляло от 1 до  $76 \times 10^7$  клеток/кг (медиана  $18 \times 10^7$  клеток/кг).

Так как первоначально переливания лимфоцитов донора выполнялись без конкретизации начальной и последующих доз  $CD3^+$  клеток, провести достоверный анализ эффективности и влияния количества перелитых лимфоцитов донора за одну процедуру на частоту РТПХ не удалось.

### **5.1. Сравнение эффективности адоптивной иммунотерапии и частоты развития РТПХ в зависимости от суммарного количества перелитых $CD3^+$ клеток**

Результаты проведенной адоптивной иммунотерапии в зависимости от суммарной дозы перелитых  $CD3^+$  клеток проанализированы после разделения больных на 4 группы. В первую группу включены пациенты, у которых суммарное количество  $CD3^+$  клеток, перелитых за весь период адоптивной иммунотерапии, было менее  $10 \times 10^7 CD3^+$  клеток/кг. Во вторую группу вошли пациенты, у которых суммарная доза  $CD3^+$  клеток колебалась от 10 до  $25 \times 10^7$  клеток/кг, в третью группу - пациенты с суммарной дозой  $CD3^+$  клеток от 25 до  $50 \times 10^7$  клеток/кг и четвертую группу составили больные с суммарным количеством перелитых лимфоцитов донора более  $50 \times 10^7 CD3^+$  клеток/кг.

Наибольшая эффективность адоптивной иммунотерапии отмечена при переливании  $CD3^+$  клеток в суммарной дозе от 25 до  $50 \times 10^7$  клеток/кг и более  $50 \times 10^7$  клеток/кг. После окончания иммунотерапии ремиссия с полным донорским химеризмом была получена в 67% и 57%, соответственно. После окончания адоптивной иммунотерапии трансфузиями лимфоцитов донора в суммарной дозе от 10 до  $25 \times 10^7 CD3^+$  клеток/кг частота достижения полной ремиссии была немного меньше и составила 53%. Самая низкая эффективность адоптивной иммунотерапии отмечена в группе больных, которым суммарно было перелито менее  $10 \times 10^7 CD3^+$  клеток/кг. Ремиссия с полным донорским химеризмом была диагностирована лишь у 47% (таблица 32).

**Таблица 32. Результаты адоптивной иммунотерапии в зависимости от суммарной дозы перелитых  $CD3^+$  клеток**

Суммарное количество $CD3^+$ клеток, $\times 10^7$ клеток/кг	Число больных	Результат трансфузий лимфоцитов донора			
		Ремиссия с полным донорским химеризмом	Продолжительность эффекта, месяцы	Частота РТПХ	
				Острая	Хроническая
менее 10	15	7 (47 %)	7 (2 - 55)	6 (40 %)	5 (33 %)
От 10 до 25	15	8 (53%)	7 (2 – 26)	6 (40 %)	4 (27%)
От 25 до 50	15	10 (67%)	6 (2 - 162)	7 (47 %)	5 (33%)
Более 50	7	4 (57 %)	19 (3,5 - 52)	1 (14 %)	2 (29%)
<b>Всего</b>	52	29 (56 %)	8,5 (2-162)	20 (38%)	16 (31%)

Медиана продолжительности полного ответа после применения лимфоцитов донора в суммарной дозе менее  $10 \times 10^7 CD3^+$  клеток/кг, от 10 до  $25 \times 10^7 CD3^+$  клеток/кг, а также от 25 до  $50 \times 10^7 CD3^+$  клеток/кг была примерно одинаковая и составила 6-7 месяцев. В группе больных, которым выполнены ТЛД в суммарной дозе более  $50 \times 10^7 CD3^+$  клеток/кг медиана длительности сохранения полного химеризма была наибольшей и составила 19 месяцев.

Частота острой РТПХ после адоптивной иммунотерапии колебалась от 14% до 47% и была наибольшей при переливании лимфоцитов донора в суммарной

дозе от 25 до  $50 \times 10^7$  CD3<sup>+</sup>клеток/кг. Хроническая форма РТПХ была диагностирована примерно в одинаковом проценте случаев (27% - 33%).

Таким образом, наилучшие показатели эффективности и продолжительности сохранения полного ответа получены у больных, которым выполнены ТЛД в суммарной дозе от 25 до  $50 \times 10^7$  CD3<sup>+</sup>клеток/кг. Однако в данной группе больных была отмечена самая высокая частота диагностирования острой РТПХ.

Отмеченные различия не являются статистически достоверными, возможно в связи с небольшим числом исследуемых больных. Однако, выявленная тенденция диктует необходимость повторного анализа после набора большего числа наблюдений.

Далее нами было рассмотрено, зависит ли тяжесть клинических проявлений РТПХ от суммарного количества перелитых лимфоцитов донора за весь период адаптивной иммунотерапии. Исследуемые данные представлены в таблице 33.

**Таблица 33. Характеристика тяжести клинического течения РТПХ после адаптивной иммунотерапии в зависимости от суммарной дозы перелитых CD3<sup>+</sup>клеток**

Тяжесть клинических проявлений РТПХ		Число больных (n= 20)	Суммарная доза CD3 <sup>+</sup> клеток, $\times 10^7$ клеток/кг	Продолжительность ремиссии, месяцы после 1-ой ТЛД	Продолжительность наблюдения, месяцы после 1-ой ТЛД
Острая РТПХ	I- II степени	8	11,5± 11,9*	9 (2 - 55)	13 (2- 56)
	III-IV степени	12	26,7±15,1*	6 (2 – 76)	15 (4 – 130)
Хроническая РТПХ	Локальная	10	17,5±19,6**	12 (6-55)	17 (4- 62)
	Экстенсивная	6	32,7±14,8**	22 (4 – 76)	27 ( 5 - 82)

\*- p = 0,03    \*\*- p = 0,1

Оказалось, что тяжесть клинического течения острой РТПХ достоверно зависит от суммарной дозы перелитых CD3<sup>+</sup>клеток. Так, если больным за весь

период адоптивной иммунотерапии переливали  $11,5 \pm 11,9 \times 10^7$  CD3<sup>+</sup> клеток/кг, то клинические признаки острой РТПХ не превышали I-II степени тяжести. Если же суммарная доза CD3<sup>+</sup> клеток достигала  $26,7 \pm 15,1 \times 10^7$  CD3<sup>+</sup> клеток/кг, то клинические признаки острой РТПХ соответствовали III-IV степени.

Клиническое течение хронической РТПХ аналогично коррелировало с величиной дозы перелитых CD3<sup>+</sup> клеток: чем больше была доза CD3<sup>+</sup> клеток, тем большее число органов-мишеней вовлекалось в иммунологический конфликт, характеризующийся и более тяжелыми клиническими проявлениями.

Различия, касающиеся хронической РТПХ, статистически не достоверны. Возможно, это связано с недостаточным числом наблюдений. Тем не менее, весьма показательным оказалась практически двукратное увеличение продолжительности ремиссии (22 месяца против 12 месяцев) у больных, у которых в результате переливания большой суммарной дозы CD3<sup>+</sup> клеток развивалась экстенсивная форма хронической РТПХ.

## **5.2. Влияние конкретизации начальной дозы перелитых лимфоцитов донора с последующей их эскалацией на результаты адоптивной иммунотерапии**

Далее нами было рассмотрено, повлияло ли на частоту РТПХ изменение алгоритма трансфузий лимфоцитов донора. А именно, какова частота РТПХ у больных, лимфоциты донора которым переливали в определенной начальной дозе ( $1 \times 10^7$  CD3<sup>+</sup> клеток/кг) с последующей эскалацией дозы клеток.

В анализ включены больные, лимфоциты донора которым переливали по поводу посттрансплантационного рецидива в период миелотоксического агранулоцитоза. 15 больным ТЛД были выполнены без конкретизации начальной дозы и без последующей её эскалации. При этом суммарная доза весь период адоптивной иммунотерапии колебалась от 2 до  $54 \times 10^7$  CD3<sup>+</sup> клеток/кг (медиана  $16 \times 10^7$  CD3<sup>+</sup> клеток/кг). После адоптивной иммунотерапии у 11 (73%) больных

была диагностирована острая РТПХ, частота хронической РТПХ составила 47% (7 больных).

Переливания лимфоцитов донора согласно новому алгоритму, а именно, с начальной дозой, соответствовавшей  $1 \times 10^7 \text{CD3}^+$  клеток/кг, были выполнены 8 больным. Острая РТПХ манифестировала у одного (13%) больного, а хроническая РТПХ у двух (25%) больных.

В таблице 34 представлены сравнительные результаты эффективности адоптивной иммунотерапии и частоты РТПХ у больных с посттрансплантационным рецидивом, которым лимфоциты донора переливали в период миелотоксического агранулоцитоза, но с различным подходом к дозированию  $\text{CD3}^+$  клеток.

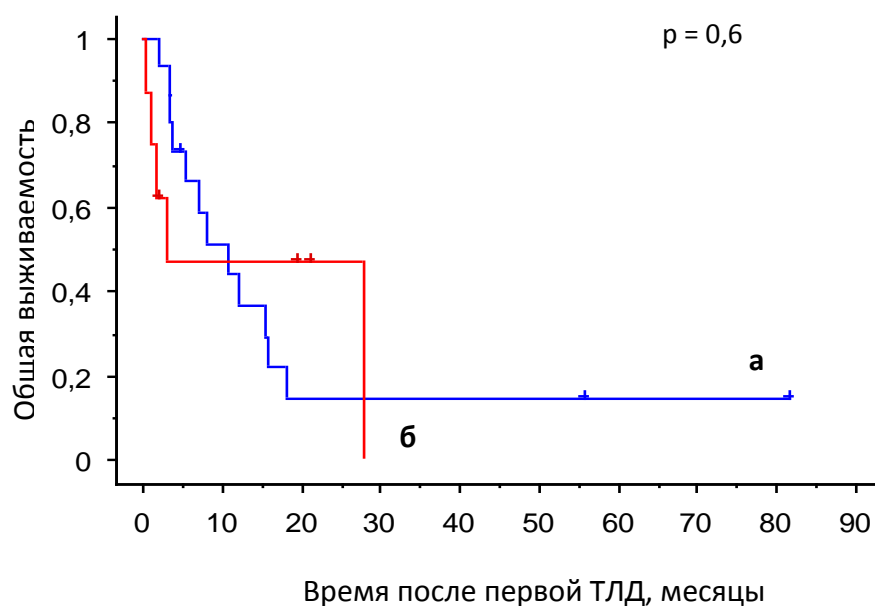
**Таблица 34. Эффективность адоптивной иммунотерапии и частота РТПХ при лечении посттрансплантационного рецидива гемобластоза в зависимости от алгоритма ТЛД**

Режим введения ТЛД	Число больных	Достижение полного донорского химеризма	Длительность эффекта, месяцы от 1-й ТЛД, месяцы	Частота РТПХ	
				Острая	Хроническая
Без конкретизации начальной и последующих дозировок $\text{CD3}^+$ клеток (с1993 до 2011г)	15	12 (80%)	6 (2 – 76)	11 (73%)*	7 (47%)**
С четким определением начальной дозы $\text{CD3}^+$ клеток ( $1 \times 10^7$ клеток/кг) и последующей эскалацией дозы (2011-2013 г)	8	4 (50%)	14 (2 - 26)	1 (13%)*	2 (25%)**

\* - p = 0,01    \*\* - p=0,3

Оказалось, что применение нового алгоритма трансфузий лимфоцитов донора, основанного на конкретизации начальной дозы  $CD3^+$  клеток, позволило достоверно снизить частоту острой РТПХ: с 73% до 12% ( $p = 0,01$ ). Частота хронической РТПХ также была снижена почти в двое (с 47% до 25%), однако эти различия статистически не достоверны ( $p = 0,3$ ).

Четко оценить влияние эскалации дозы  $CD3^+$  клеток на частоту РТПХ не представилось возможным, так как запланированное увеличение дозы лимфоцитов донора согласно новому алгоритму выполнено всего 2-м из 8 больных. В обоих случаях после адоптивной иммунотерапии была достигнута ремиссия с полным донорским химеризмом. У одного из этих больных была диагностирована острая РТПХ, которая в последующем трансформировалась в хроническую форму. Остальным 6 больным лимфоциты донора переливали однократно, поскольку у 2-х из них уже после первой трансфузии была диагностирована ремиссия с восстановлением полного донорского кроветворения, а у 4-х больных после первого переливания лимфоцитов была констатирована прогрессия заболевания.



**Рисунок 11. Общая выживаемость больных после адоптивной иммунотерапии по поводу посттрансплантационного гематологического рецидива в зависимости от режима трансфузий лимфоцитов донора: без (а) и с (б) конкретизации начальной дозы и последующей эскалацией доз лимфоцитов донора**

Представленные на рисунке 11 кривые общей выживаемости показывают, что двухлетняя общая выживаемость больных после адоптивной иммунотерапии выполнявшейся по «старому» алгоритму равна 30%. Если переливания лимфоцитов донора осуществлялись по новому алгоритму, то данный показатель был равен 45%.

Результаты исследования, представленные в данной главе, свидетельствуют о том, что снижение начальной дозы перелитых лимфоцитов донора до  $1 \times 10^7$ /кг позволяет достоверно снизить частоту острой РТПХ. Несмотря на отсутствие явных преимуществ нового алгоритма ТЛД в отношении частоты достижения полного ответа, длительность сохранения ремиссии и полного донорского химеризма у больных этой группы вдвое превышает таковую у больных, которым лимфоциты донора переливали без конкретизации начальной дозы (6 против 14 месяцев).

## **Глава 6. Субпопуляции Т-лимфоцитов периферической крови у больных гемобластозами на фоне трансфузий лимфоцитов донора после трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток**

В данной главе представлены результаты исследования субпопуляций Т-лимфоцитов (Т-хелперы, цитотоксические Т-лимфоциты, Т-регуляторные клетки, НК-клетки, ТНК-клетки) периферической крови больных гемобластозами на фоне трансфузий лимфоцитов донора по поводу посттрансплантационного рецидива гемобластоза или убывающего донорского химеризма. Динамическое исследование проводилось для выявления возможных закономерностей в субпопуляционном составе Т-лимфоцитов периферической крови во время констатации рецидива или убывающего донорского химеризма, а также в течение 10 недель после первой ТЛД.

Определение субпопуляций Т-лимфоцитов периферической крови больных проводили с помощью метода иммунофенотипирования с проточной цитофлюориметрией.

Для оценки клинического эффекта, а также качественного и количественного состава субпопуляций Т-лимфоцитов периферической крови на фоне применения ТЛД больные были разделены на две группы. В 1-ю группу (n=10) вошли больные с посттрансплантационным гематологическим рецидивом, которым ТЛД и инфузии ИЛ-2 выполняли после химиотерапевтического воздействия на фоне миелотоксического агранулоцитоза. Во 2-ю группу (n=6) - больные, ТЛД с последующим введением ИЛ-2 которым выполняли на фоне гематологической ремиссии, но при постепенном снижении содержания клеток донорского кроветворения в костном мозге, что указывало на убывающий донорский химеризм.



### **6.1. Субпопуляции Т-лимфоцитов периферической крови больных гемобластозами на фоне трансфузий лимфоцитов донора по поводу посттрансплантационного рецидива гемобластоза**

У 5 из 10 больных 1-й группы в момент констатации гематологического рецидива результаты иммунофенотипирования лимфоцитов периферической крови свидетельствовали о снижении содержания CD3<sup>+</sup>-клеток в среднем до  $0,46 \pm 0,25 \times 10^9/\text{л}$ . Абсолютное количество Т-хелперов (CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>) было снижено у 9 (90%) больных в среднем до  $0,21 \pm 0,17 \times 10^9/\text{л}$ . Содержание цитотоксических клеток (CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>) было ниже нормальных значений (от 0,01 до  $0,1 \times 10^9/\text{л}$ ) у 3 (30%) больных. Сниженное содержание Т-регуляторных (CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>high</sup>), также как и клеток – натуральных киллеров (CD3<sup>+</sup>/CD56<sup>+</sup>; CD3<sup>-</sup>/CD56<sup>+</sup>) отмечалось значительно реже: в 1 и 2 случаях соответственно.

Среди 5 больных, у которых абсолютное содержание Т-лимфоцитов периферической крови было в пределах нормы, иммунофенотипирование субпопуляций Т-клеток выявило сниженное количество Т-хелперов и цитотоксических клеток у 4 больных, а также Т-регуляторных – у 1, и NK-клеток – у 1 больного.

Изолированное снижение содержания какой-либо одной субпопуляции Т-клеток наблюдалось у 5 больных. У 4 больных выявляли одновременно снижение двух, трех и даже четырех субпопуляций Т-клеток. Лишь у 1 больного абсолютное количество всех исследовавшихся субпопуляций было нормальным (Таблица 35).

**Таблица 35. Абсолютное количество Т-лимфоцитов периферической крови различных субпопуляций в момент рецидива и через 2 недели после 1-й ТЛД у больных с гематологическим рецидивом после алло-ТГСК**

ФИО больных	Эффект ТЛД	Абсолютное количество Т-лимфоцитов в субпопуляции, $\times 10^9$ клеток/л					
		CD3 <sup>+</sup>	CD3 <sup>+</sup> /4 <sup>+</sup>	CD3 <sup>+</sup> /8 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup> /25 <sup>high</sup>	CD3 <sup>+</sup> /56 <sup>+</sup>	CD3 <sup>+</sup> /56 <sup>+</sup>
<b>До начала адоптивной иммунотерапии</b>							
ПСЕ	Ремиссия + 100% химера	0,6	0,5	0,3	0,04	0,03	0,3
СФА (1)		1,8	0,13	0,13	0,04	0,01	0,02
СЭС		1,57	0,45	1,1	0,1	0,18	0,07
СФА (2)		2,5	1,1	1,2	0,039	0,06	0,27
АПХ		1,9	0,55	1	0,03	0,07	0,11
ТПС	Без эффекта	0,7	0,18	0,52	0,03	0,005	0,35
ЯРВ		0,04	0,02	0,01	0,004	0,0012	0,18
ППВ		0,42	0,1	0,1	0,01	0,06	0,06
ИТЛ		0,55	0,13	0,4	0,012	0,069	0,1
УПВ		1,04	0,16	0,81	0,07	0,01	0,08
<b>Через 2 недели после первой ТЛД</b>							
ПСЕ	Ремиссия + 100% химера	0,4	0,2	0,1	0,03	0,02	0,06
СФА (1)		0,3	0,3	0,2	0,02	0,03	0,01
СЭС		0,7	0,2	0,5	0,03	0,02	0,1
СФА (2)		1,1	0,5	0,5	0,01	0,04	0,02
АПХ		1,8	0,6	1,1	0,05	0,13	0,2
ТПС	Без эффекта	<b>Прогрессия</b>					
ЯРВ		0,1	0,05	0,07	0,01	0,003	0,01
ППВ		0,05	0,02	0,004	0,001	0,002	0,06
ИТЛ		0,1	0,06	0,04	0,004	0,01	0,03
УПВ		0,1	0,05	0,04	0,01	0,003	0,03
Нормальные значения Т-лимфоцитов		0,9 - 2,0	0,6 - 1,3	0,37 - 0,9	0,009 - 0,08	0,01 - 0,16	0,12 - 0,4

Через 2 недели после первой ТЛД среди больных 1-й группы нормальные показатели CD3<sup>+</sup>-клеток в крови выявлялись всего лишь у 2-х из 10 больных. У остальных больных было отмечено более глубокое, чем перед началом химиотерапии, снижение абсолютного количества Т-лимфоцитов. Их содержание составляло в среднем  $0,26 \pm 0,24 \times 10^9$ /л. Также более глубокий дефицит, по сравнению с исходными данными, наблюдался у 8 больных при подсчете Т-хелперов ( $0,18 \pm 0,16 \times 10^9$ /л) и у 6 больных при подсчете цитотоксических клеток (в среднем  $0,07 \pm 0,05 \times 10^9$ /л). Сниженное количество Т-НК-клеток и НК-клеток

было отмечено у 4 и 6 больных, при этом минимальное количество указанных клеток составляло в среднем  $0,004 \pm 0,003 \times 10^9/\text{л}$  и  $0,03 \pm 0,02 \times 10^9/\text{л}$ , соответственно.

О глубоком подавлении Т-клеточного звена в ранние сроки после курса ХТ и одной ТЛД свидетельствовал тот факт, что изолированное снижение какой-либо одной субпопуляции Т-клеток наблюдалось лишь у 1 больного, одновременное снижение двух субпопуляций - у 2 больных, у остальных больных были снижены по три, четыре и даже пять изучавшихся клеточных субпопуляций (Таблица 35).

При исследовании лимфоцитов крови через 4 ( $n = 8$ ) и 6 недели ( $n = 8$ ) после первой ТЛД можно было проследить четкое разделение показателей, отражавших содержание субпопуляций Т-клеток, в зависимости от достигнутого эффекта. Так, в случаях полного восстановления донорского кроветворения (у 5 больных) была отмечена постепенная нормализация показателей исследуемых субпопуляций Т-лимфоцитов, за исключением сохранявшегося умеренного снижения Т-хелперов (от  $0,3$  до  $0,4 \times 10^9/\text{л}$ ) у 3 больных. В тех случаях, когда проведенная терапия не обеспечила достижения ремиссии с полным донорским химеризмом к 4-й и 6-й неделе после начала ТЛД ( $n = 3$ ), абсолютное количество практически всех субпопуляций Т-лимфоцитов оставалось значительно сниженным. Так, количество Т-лимфоцитов составляло от  $0,06$  до  $0,6 \times 10^9/\text{л}$ , Т-хелперов от  $0,02$  до  $0,25 \times 10^9/\text{л}$ , цитотоксических Т-лимфоцитов от  $0,02$  до  $0,1 \times 10^9/\text{л}$ , Т-регуляторных клеток – от  $0,005$  до  $0,006 \times 10^9/\text{л}$ , клеток Т-НК-клеток - от  $0,002$  до  $0,004 \times 10^9/\text{л}$  (Таблица 36).

**Таблица 36. Абсолютное количество Т-лимфоцитов периферической крови различных субпопуляций через 4 и 6 недель после 1-й ТЛД у больных с гематологическим рецидивом после алло-ТГСК**

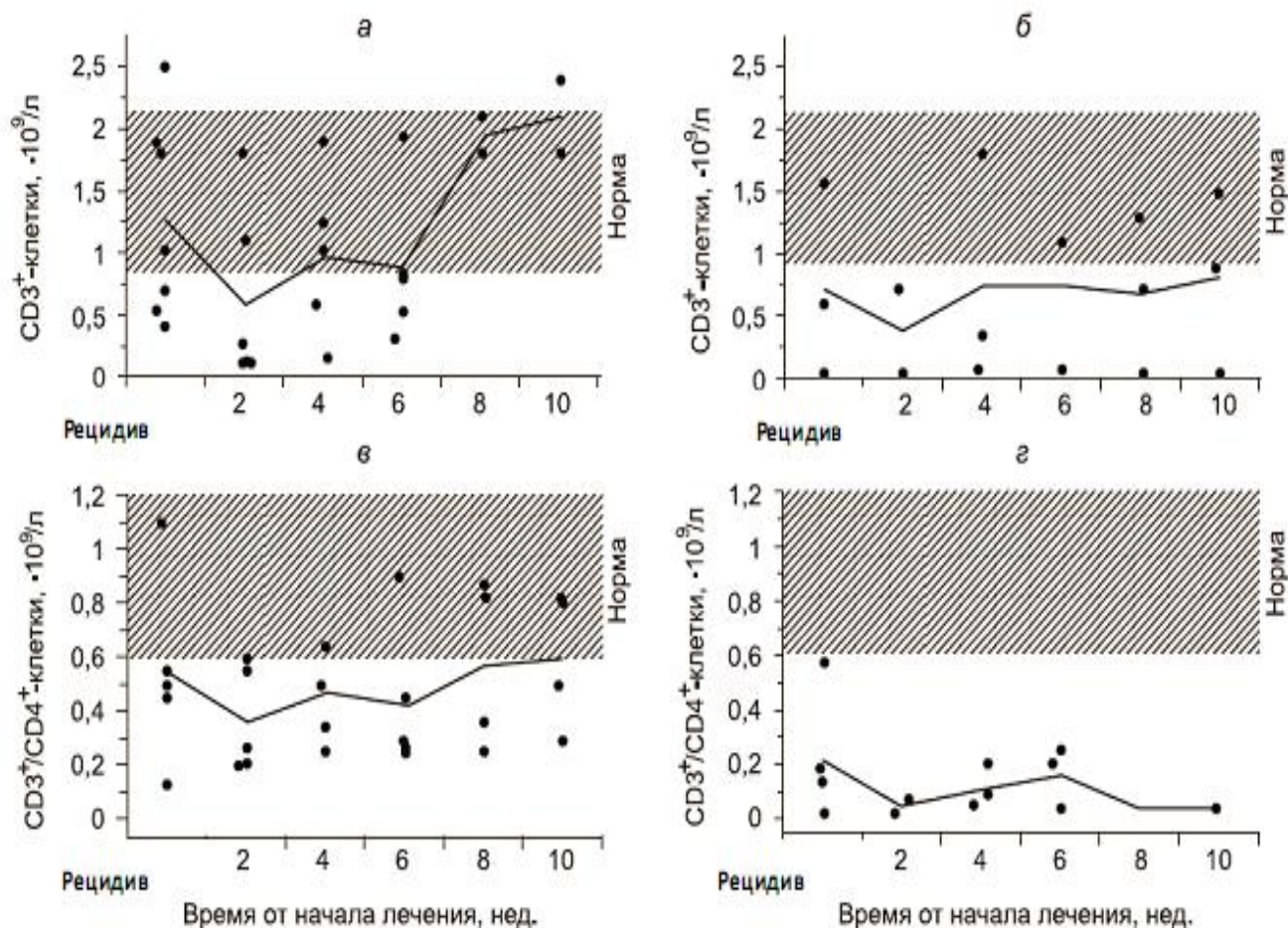
ФИО больных	Эффект ТЛД	Абсолютное количество Т-лимфоцитов в субпопуляции, $\times 10^9$ клеток/л					
		CD3 <sup>+</sup>	CD3 <sup>+</sup> /4 <sup>+</sup>	CD3 <sup>+</sup> /8 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup> /25 <sup>high</sup>	CD3 <sup>+</sup> /56 <sup>+</sup>	CD3 <sup>+</sup> /56 <sup>+</sup>
<b>Через 4 недели после первой ТЛД</b>							
ПСЕ	Ремиссия + 100% химера	0,35	0,26	0,2	0,03	0,04	0,17
СФА (1)		1,03	0,5	0,52	0,1	0,04	0,07
СЭС		1,8	0,35	1,1	0,1	0,02	0,11
СФА (2)		1,23	0,64	0,52	0,03	0,05	0,02
АПХ		1,9	0,65	1,1	0,06	0,15	0,14
ТПС	Без эффекта	<b>Прогрессия</b>					
ППВ		0,06	0,04	0,04	0,006	0,002	0,09
ЯРВ		<b>Прогрессия</b>					
ИТЛ		0,16	0,08	0,057	0,005	0,004	0,006
УПВ		0,6	0,02	0,34	0,03	0,03	0,2
<b>Через 6 недель после первой ТЛД</b>							
ПСЕ	Ремиссия + 100% химера	1,1	0,26	0,3	0,04	0,04	0,25
СФА (1)		1,93	0,9	0,87	0,092	0,16	0,13
СЭС		1,1	0,24	0,73	0,03	0,12	0,1
СФА (2)		0,86	0,45	0,36	0,015	0,07	0,02
АПХ		1,6	0,75	1,3	0,08	0,1	0,18
ТПС	Без эффекта	<b>Прогрессия</b>					
ЯРВ		<b>Прогрессия</b>					
ППВ		0,06	0,03	0,024	0,006	0,0002	0,09
ИТЛ		0,3	0,2	0,1	0,01	0,06	0,18
УПВ		0,52	0,25	0,3	0,03	0,02	0,32
Нормальные значения Т-лимфоцитов		0,9 - 2,0	0,6 - 1,3	0,37 - 0,9	0,009 - 0,08	0,01 - 0,16	0,12 - 0,4

К 8-й и 10-й неделе после первой ТЛД у больных, достигших повторной ремиссии с полным донорским химеризмом ( $n = 5$ ), абсолютное количество клеток исследуемых субпопуляций было нормальным, лишь у 2 больных наблюдалось сниженное количество Т-хелперов ( $0,25$  и  $0,37 \times 10^9$ /л). Оценить результаты иммунофенотипирования лимфоцитов крови в эти сроки у больных, у которых не удалось получить противоопухолевый ответ, не представилось возможным, так как всем больным уже проводили ХТ в связи с прогрессией гемобластоза (Таблица 37).

**Таблица 37. Абсолютное количество Т-лимфоцитов периферической крови различных субпопуляций через 8 и 10 недель после 1-й ТЛД у больных с гематологическим рецидивом после алло-ТГСК**

ФИО больных	Эффект ТЛД	Абсолютное количество Т-лимфоцитов в субпопуляции, $\times 10^9$ клеток/л					
		CD3 <sup>+</sup>	CD3 <sup>+</sup> /4 <sup>+</sup>	CD3 <sup>+</sup> /8 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup> /25 <sup>high</sup>	CD3 <sup>+</sup> /56 <sup>+</sup>	CD3 <sup>+</sup> /56 <sup>+</sup>
<b>Через 8 недель после первой ТЛД</b>							
ПСЕ	Ремиссия + 100% химера	0,9	0,37	0,3	0,07	0,3	0,25
СФА (1)		2,1	0,87	1,2	0,013	0,03	0,41
СЭС		1,3	0,25	0,85	0,04	0,17	0,16
СФА (2)		1,8	0,83	0,83	0,046	0,11	0,11
АПХ		1,4	0,75	0,7	0,04	0,12	0,23
ТПС	Без эффекта	<b>Прогрессия</b>					
ЯРВ		<b>Прогрессия</b>					
ППВ		0,04	0,032	0,018	0,005	0,001	0,031
ИТЛ		<b>Прогрессия</b>					
УПВ		<b>Прогрессия</b>					
<b>Через 10 недель после первой ТЛД</b>							
ПСЕ	Ремиссия + 100% химера	1,5	0,5	0,97	0,07	0,15	0,13
СФА (1)		2,4	0,81	1,4	0,16	0,018	0,23
СЭС		0,9	0,3	0,6	0,03	0,06	0,09
СФА (2)		1,8	0,83	0,83	0,03	0,13	0,18
АПХ		1,3	0,86	0,65	0,03	0,10	0,25
ТПС	Без эффекта	<b>Прогрессия</b>					
ЯРВ		<b>Прогрессия</b>					
ППВ		0,04	0,032	0,018	0,0028	0,0002	0,028
ИТЛ		<b>Прогрессия</b>					
УПВ		<b>Прогрессия</b>					
Нормальные значения Т-лимфоцитов			0,9 - 2,0	0,6 - 1,3	0,37 - 0,9	0,009 - 0,08	0,01 - 0,16

Наиболее выраженные изменения выявлены в абсолютном количестве CD3<sup>+</sup> клеток и Т-хелперов у больных с гематологическим рецидивом после алло-ТГСК, которым проводилась ХТ с последующими трансфузиями лимфоцитов донора. Данные изменения представлены на рисунке 12.



**Рисунок 12.** Изменение содержания Т-лимфоцитов (CD3<sup>+</sup>-клеток) и Т-хелперов (CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>-клеток) на фоне ТЛД у больных с посттрансплантационным рецидивом ОЛ: достигших полного восстановления донорского химеризма (а, в) и без эффекта после ТЛД (б, г)

Абсолютное количество CD3<sup>+</sup>клеток у пациентов с гематологическим рецидивом после алло-ТГСК, в случае достижения полной ремиссии с восстановлением полного донорского химеризма достоверно отличалось ( $p < 0,05$ ) от группы пациентов, у которых проведенная адоптивная иммунотерапия не оказала достаточного противоопухолевого эффекта и была констатирована прогрессия гемобластоза (Таблица 38).



показатели, характеризующие количественное содержание исследованных клеток, оказались нормальными.

Через 2 недели после первой ТЛД в этой группе больных не выявлено каких-либо существенных изменений со стороны количественных показателей исследованных субпопуляций Т-лимфоцитов. Так, абсолютное количество CD3<sup>+</sup>-клеток оставалось нормальным у 5 из 6 больных. Только субпопуляция Т-хелперов оставалась на сниженных абсолютных значениях, причем средний показатель содержания CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>-клеток практически не отличался от исходного ( $0,24 \pm 0,11 \times 10^9/\text{л}$ ) (Таблица 39).

**Таблица 39. Абсолютное количество Т-лимфоцитов периферической крови различных субпопуляций до начала адоптивной иммунотерапии и через 2 недели после 1-й ТЛД у больных с убывающим донорским химеризмом**

ФИО больных	Эффект ТЛД	Абсолютное количество Т-лимфоцитов в субпопуляции, $\times 10^9$ клеток/л					
		CD3 <sup>+</sup>	CD3 <sup>+</sup> /4 <sup>+</sup>	CD3 <sup>+</sup> /8 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup> /25 <sup>high</sup>	CD3 <sup>+</sup> /56 <sup>+</sup>	CD3 <sup>-</sup> /56 <sup>+</sup>
<b>До начала адоптивной иммунотерапии</b>							
ССВ	Ремиссия + 100% химера	3,3	0,63	2,6	0,11	0,09	0,3
АМБ		1,4	0,33	0,9	0,02	0,04	0,2
РСМ		1,46	0,77	0,6	0,05	0,12	0,17
РДА		1,2	0,5	0,7	0,014	0,03	0,098
РАВ	Без эффекта	0,74	0,21	0,5	0,04	0,05	0,2
РСИ		0,4	0,1	0,25	0,02	0,05	0,16
<b>Через 2 недели после первой ТЛД</b>							
ССВ	Ремиссия + 100% химера	2,3	0,3	2	0,05	0,1	0,3
АМБ		1,2	0,3	0,8	0,04	0,04	0,3
РСМ		3,1	1,6	1,2	0,07	0,2	0,4
РДА		1,4	0,3	1,1	0,02	0,02	0,2
РАВ	Без эффекта	1,1	0,2	0,7	0,02	0,04	0,2
РСИ		0,1	0,05	0,06	0,01	0,01	0,1
Нормальные значения Т-лимфоцитов		0,9 - 2,0	0,6 - 1,3	0,37 - 0,9	0,009 - 0,08	0,01 - 0,16	0,12 - 0,4



Результаты иммунофенотипирования лимфоцитов крови через 4, 6, 8 и 10 недели демонстрировали стабильно сниженные показатели содержания Т-хелперов на фоне нормальных значений всех остальных субпопуляций Т-лимфоцитов, несмотря на то, что у 4 из 6 больных в течение всего периода наблюдения продолжали выполнять ТЛД с эскалацией дозы CD3<sup>+</sup>-клеток (Таблица 40). У 1 больной уже после первой ТЛД наблюдалось снижение содержания всех исследованных субпопуляций Т-лимфоцитов. В течение последующих 10 недели наблюдения у нее сохранялся глубокий дефицит как CD3<sup>+</sup>-клеток, так и Т-хелперов, цитотоксических, Т-регуляторных и НК-клеток. Именно у этой больной на фоне ТЛД продолжалось отторжение донорского миелотрансплантата (Таблица 41).

**Таблица 40. Абсолютное количество Т-лимфоцитов периферической крови различных субпопуляций через 4 и 6 недель после 1-й ТЛД у больных с убывающим донорским химеризмом**

ФИО больных	Эффект ТЛД	Абсолютное количество Т-лимфоцитов в субпопуляции, $\times 10^9$ клеток/л					
		CD3 <sup>+</sup>	CD3 <sup>+</sup> /4 <sup>+</sup>	CD3 <sup>+</sup> /8 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup> /25 <sup>high</sup>	CD3 <sup>+</sup> /56 <sup>+</sup>	CD3 <sup>-</sup> /56 <sup>+</sup>
<b>Через 4 недели после первой ТЛД</b>							
ССВ	Ремиссия + 100% химера	1,9	0,31	1,6	0,1	0,05	0,36
АМБ		1,1	0,33	0,3	0,03	0,06	0,27
РСМ		2,5	1,3	1,1	0,044	0,34	0,33
РДА		0,9	0,1	0,7	0,008	0,01	0,07
РАВ	Без эффекта	1,2	0,24	0,8	0,025	0,05	0,2
РСИ		0,26	0,17	0,1	0,03	0,01	0,06
<b>Через 6 недель после первой ТЛД</b>							
ССВ	Ремиссия + 100% химера	1,7	0,31	1,4	0,03	0,06	0,4
АМБ		0,85	0,24	0,5	0,03	0,03	0,19
РСМ		2,2	1,1	0,9	0,045	0,21	0,36
РДА		1,6	1,1	0,6	0,07	0,04	0,15
РАВ	Без эффекта	1,15	0,32	0,8	0,03	0,07	0,17
РСИ		0,18	0,08	0,09	0,01	0,002	0,04
Нормальные значения Т-лимфоцитов		0,9 - 2,0	0,6 - 1,3	0,37 - 0,9	0,009 - 0,08	0,01 - 0,16	0,12 - 0,4

**Таблица 41. Абсолютное количество Т-лимфоцитов периферической крови различных субпопуляций через 8 и 10 недель после 1-й ТЛД у больных с убывающим донорским химеризмом**

ФИО больных	Эффект ТЛД	Абсолютное количество Т-лимфоцитов в субпопуляции, $\times 10^9$ клеток/л					
		CD3 <sup>+</sup>	CD3 <sup>+</sup> /4 <sup>+</sup>	CD3 <sup>+</sup> /8 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup> /25 <sup>high</sup>	CD3 <sup>+</sup> /56 <sup>+</sup>	CD3 <sup>+</sup> /56 <sup>+</sup>
<b>Через 8 недель после первой ТЛД</b>							
ССВ	Ремиссия + 100% химера	1,1	0,24	1,4	0,04	0,05	0,33
АМБ		1,2	0,36	0,8	0,03	0,05	0,46
РСМ		3	1,6	1	0,07	0,17	0,3
РДА		1,8	1,2	0,75	0,05	0,08	0,2
РАВ	Без эффекта	0,8	0,16	0,56	0,01	0,04	0,17
РСИ		<b>Прогрессия</b>					
<b>Через 10 недель после первой ТЛД</b>							
ССВ	Ремиссия + 100% химера	1,3	0,22	1,05	0,03	0,03	0,25
АМБ		0,91	0,36	0,48	0,01	0,04	0,18
РСМ		2,5	1,4	0,9	0,06	0,12	0,21
РДА		1,7	1,3	0,74	0,06	0,03	0,2
РАВ	Без эффекта	1,1	0,25	0,8	0,01	0,05	0,25
РСИ		<b>Прогрессия</b>					
Нормальные значения Т-лимфоцитов		0,9 - 2,0	0,6 - 1,3	0,37 - 0,9	0,009 - 0,08	0,01 - 0,16	0,12 - 0,4

Так, развернутая картина рецидива гемобластоза сопровождалась снижением абсолютного количества Т-клеток у половины больных, при этом количество клеток Т-хелперов было снижено у подавляющего большинства (90%) больных, а одновременное снижение двух, трех и четырех субпопуляций выявлялось у 40% больных. Через 2 недели после ХТ и одной ТЛД отмечался еще более глубокий дефицит практически всех субпопуляций Т-лимфоцитов. Однако уже через 4-6 недели после первой ТЛД у больных, достигших ремиссии и полного восстановления донорского кроветворения, наблюдалась постепенная нормализация содержания Т-клеточных субпопуляций (за исключением клеток Т-хелперов). Напротив, в тех случаях, когда проведенная терапия не обеспечила

достижения противоопухолевого ответа к 4-й и 6-й неделе после начала ТЛД, абсолютное количество практически всех субпопуляций Т-лимфоцитов оставалось значительно сниженным.

В случаях убывающего донорского химеризма, но при сохраняющейся ремиссии ОЛ, ТЛД не сопровождалось снижением содержания субпопуляций Т-лимфоцитов за исключением клеток Т-хелперов. Причем средние показатели абсолютного содержания этих клеток сохранялись на одном и том же уровне.

В качестве иллюстрации представлены результаты иммунофенотипирования лимфоцитов периферической крови больного С.С.В. через 2 недели после 1-й ТЛД (рисунок 13). На рисунке представлено сниженное содержание Т-хелперов ( $CD3^+/CD4^+$ ) в периферической крови до 16% (абсолютное количество равнялось  $0,3 \times 10^9/\text{л}$ ). Адоптивная иммунотерапия была начата в связи с начинающимся отторжением миелотрансплантата, на что указывало снижение содержания донорского кроветворения до 85%.

В результате адоптивной иммунотерапии после 3-х переливаний лимфоцитов донора было достигнуто восстановление полного донорского химеризма на фоне сохраняющейся гематологической ремиссии, однако выраженное снижение Т-хелперов продолжало выявляться в течение 10 недель после первой ТЛД.

Таким образом, результаты качественной и количественной оценки субпопуляций Т-лимфоцитов позволили охарактеризовать изменения содержания количества Т-хелперов, цитотоксических клеток, Т-регуляторных клеток и НК-клеток в зависимости от фазы заболевания и степени ответа на проводимую адоптивную иммунотерапию.

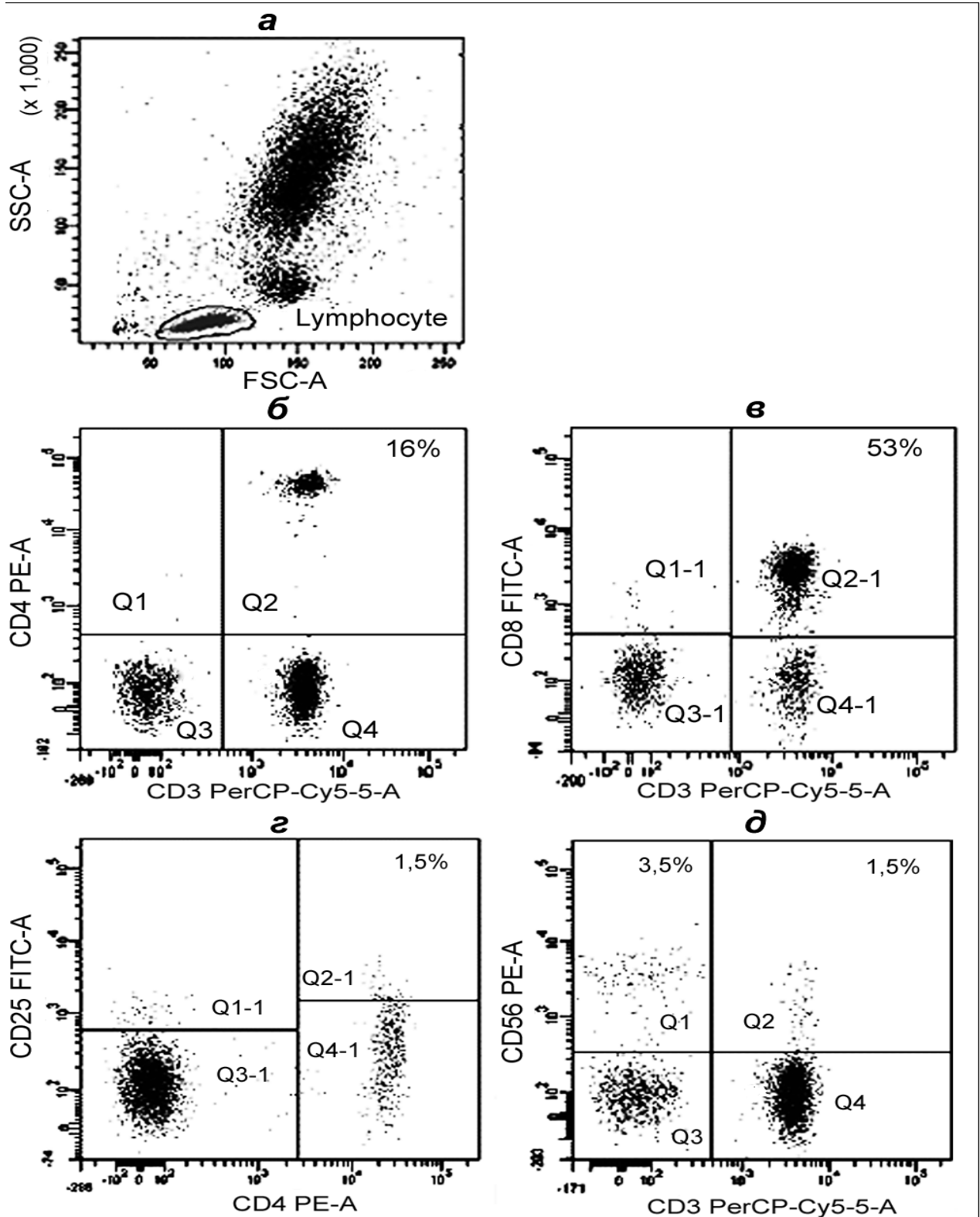


Рисунок 13. Результаты иммунофенотипирования Т-лимфоцитов периферической крови больного С.С.В. через 2 недели после первой ТЛД: *а* - выделение лимфоцитарного гейта по прямому (FSC) и боковому светорассеянию (SSC); *б* - CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>-клетки; *в* – CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>-клетки; *з* - CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>high</sup>-клетки; *д* - CD3<sup>-</sup>/CD56<sup>+</sup>-клетки и CD3<sup>+</sup>/CD56<sup>+</sup>-клетки

Небольшое количество наблюдений не позволило сделать окончательное заключение. Однако выявленные тенденции к восстановлению цитотоксических лимфоцитов и натуральных киллеров у пациентов, достигших ремиссии в результате ТЛД, могут рассматриваться в качестве предикторов клинического эффекта. Возможно, продолжение исследований субпопуляций Т-лимфоцитов позволят в будущем выявить более значимые изменения, характеризующие иммунологический и противоопухолевый эффекты ТЛД.

## Заключение

Рецидивы гемобластозов после трансплантации аллогенного костного мозга являются основной причиной неудач данного метода лечения. В качестве терапии посттрансплантационного рецидива гемобластога в различное время предлагались следующие методики: химиотерапия, вторая алломиелотрансплантация, цитокиновая терапия и адоптивная иммунотерапия, включающая ТЛД.

Настоящая работа была предпринята с целью изучения эффективности ТЛД у больных гемобластогами после алло-ТГСК.

За период с 1993 по 2013 годы 52 реципиентам аллогенного миелотрансплантата были выполнены ТЛД по поводу посттрансплантационного рецидива гемобластога или убывающего смешанного химеризма, который характеризовался уменьшением содержания клеток донорского кроветворения в костном мозге пациента. В 6 случаях была предпринята вторая процедура иммунотерапии ТЛД в связи повторным гематологическим рецидивом гемобластога.

В задачи исследования входил анализ результатов адоптивной иммунотерапии в зависимости от схемы применения ТЛД; изучение возможности повторного применения адоптивной иммунотерапии, в случае диагностики второго посттрансплантационного рецидива; оценка вероятности РТПХ после ТЛД и ее клинические характеристики; анализ влияния РТПХ на результаты адоптивной иммунотерапии; сопоставление эффективности адоптивной иммунотерапии и частоты РТПХ при переливании различных доз лимфоцитов донора, а также анализ изменения содержания субпопуляций Т-лимфоцитов периферической крови у больных гемобластогами на фоне ТЛД по поводу посттрансплантационного рецидива гемобластога или убывающего смешанного химеризма.

Достижение ремиссии с восстановлением полного донорского химеризма в результате адоптивной иммунотерапии оценивалось по показателям гемограммы,

миелограммы, а также по результатам молекулярного и цитогенетического исследования гемопоэтического химеризма.

Адоптивная иммунотерапия расценивалась нами как эффективная только в тех случаях, когда кроветворение реципиента было полностью замещено донорским, т.е. был достигнут полный донорский химеризм.

Следует отметить, что в работе описаны этапы развития и совершенствования методики адоптивной иммунотерапии ТЛД. Переливания лимфоцитов донора как способ индукции иммунного ответа против опухолевых клеток при рецидиве лейкоза после алло-ТГСК в нашей клинике применяется с 1993 года и впервые в Российской Федерации были получены успешные результаты [130].

Первоначально переливания лимфоцитов донора при посттрансплантационном гематологическом рецидиве осуществлялись в виде монотерапии и выполнялись на развернутой картины лейкоза. Лейкоконцентрат, полученный из периферической крови донора, вводился большими дозами клеток еженедельно до достижения полной ремиссии или развития РТПХ.

В последующем с целью уменьшения опухолевой массы при гематологическом рецидиве гемобластоза перед трансфузией лимфоцитов донора вводились химиотерапевтические препараты, а переливание лимфоцитов донора выполнялось после достижения ремиссии.

К 2003 году была разработана и внедрена в клиническую практику новая методика адоптивной иммунотерапии посттрансплантационных рецидивов, основанная на применении лимфоцитов донора в период миелотоксического агранулоцитоза после курса ХТ, причем после каждой процедуры ТЛД осуществлялось введение ИЛ-2 в дозе 6 млн.МЕ. Предполагалось, что именно в период миелотоксического агранулоцитоза опухоль максимально угнетена и для восстановления донорского кроветворения созданы наилучшие условия. Введение ИЛ-2 предложено в расчете на его активизирующее влияние на донорские иммунокомпетентные клетки. Кроме того, указанная методика лечения

посттрансплантационного рецидива предполагала поддерживающую терапию ИЛ-2 в течение нескольких лет, с целью контроля над минимальной резидуальной болезнью [8].

Именно данная схема адоптивной иммунотерапии сопровождалась наилучшими результатами лечения посттрансплантационного рецидива гемобластоза, однако в данной группе больных была зафиксирована весьма высокая частота РТПХ.

С целью снижения риска РТПХ при ТЛД в 2011г была модифицирована предыдущая схема адоптивной иммунотерапии. Новый алгоритм терапии заключался в конкретизации начальной дозы переливаемых  $CD3^+$  клеток на уровне  $1 \times 10^7$  клеток/кг с последующей эскалацией дозы  $CD3^+$  клеток при каждом переливании на  $5 \times 10^7$  клеток/кг [18].

В результате проведенного нами исследования показано, что применение ТЛД по поводу посттрансплантационного рецидива гемобластоза обеспечивает достижение ремиссии с восстановлением полного донорского химеризма у 57% больных. Аналогичные результаты представлены в публикациях других отечественных и зарубежных исследователей указавших, что частота повторных ремиссий после адоптивной иммунотерапии может составлять 47% - 63% [22, 46, 85].

Сопоставив результаты проводившейся нами адоптивной иммунотерапии у больных с различными вариантами гемобластоза, пришли к заключению, что наилучшие показатели достижения ремиссии и восстановления полного донорского химеризма были получены у больных ОМЛ и ХМЛ. Именно при лечении посттрансплантационного рецидива ОМЛ удалось получить ремиссию с полным донорским химеризмом у 64% больных, при этом пятилетняя общая выживаемость составила не менее 20%.

Аналогичная частота ремиссии после адоптивной иммунотерапии отмечена нами при лечении гематологического рецидива ХМЛ. В 63% случаев была



документирована ремиссия с восстановлением полного донорского химеризма, при этом у 38% больных имелся шанс прожить 10 лет.

В публикациях С. Schmid и соавт. и S.J. Choi и соавт. указывалось, что у 15% - 45% больных с посттрансплантационным гематологическим рецидивом ОМЛ возможно достижение полной ремиссии после проведения адоптивной иммунотерапии. При этом двухлетняя общая выживаемость может равняться 15% и 56%, соответственно [46, 134].

Применение адоптивной иммунотерапии у больных с рецидивом МДС после алло-ТГСК ассоциировано с невысокой эффективностью. Так по данным нескольких исследований частота достижения повторной ремиссии колеблется от 15% до 22% [50, 89, 115].

Лечение посттрансплантационного рецидива МДС, проводившееся в нашей клинике с помощью адоптивной иммунотерапии, позволило получить полную ремиссию у 1 из 4 больных, при этом однолетняя общая выживаемость реципиентов не превысила 25%.

Эффективность адоптивной иммунотерапии при посттрансплантационных рецидивах ОЛЛ оказалась такой же низкой. Так, по нашим данным, ремиссия с полным донорским химеризмом была индуцирована у 25% больных, двухлетняя общая выживаемость также составила 25%. Согласно данным, опубликованным Kolb H. и соавт., частота ответов после иммунотерапии рецидива ОЛЛ не превышала 20%, при этом двухлетняя общая выживаемость также была низкой и равнялась 15% [81].

Таким образом, наши исследования подтвердили, что эффективность адоптивной иммунотерапии существенно отличается в зависимости от нозологической формы заболевания.

Поскольку оценка эффективности лечения включала в себя не только частоту достижения ремиссии и восстановления полного донорского химеризма, но и возможность длительного сохранения этого результата, нами проведен анализ общей выживаемости больных с различными нозологическими формами

после адоптивной иммунотерапии посттрансплантационного рецидива. Так, в течение первых пяти лет после окончания адоптивной иммунотерапии общая выживаемость больных с посттрансплантационным рецидивом ОМЛ и ХМЛ может составлять 25% и 40%, соответственно. Десятилетняя общая выживаемость больных ХМЛ остается на уровне 40%, а для больных ОМЛ составляет менее 20%.

У больных ХМЛ кривая общей выживаемости выходит на «плато» 40 % через два года после адоптивной иммунотерапии. Для больных ОМЛ частота повторных рецидивов постепенно снижается к пятому году наблюдения, после чего кривая общей выживаемости выходит на «плато» на уровне 15%.

У больных ОЛЛ и МДС проводимая адоптивная иммунотерапия не сопровождалась длительным противоопухолевым эффектом. Общая выживаемость не превысила 1,5 лет у больных МДС и 3-х лет у больных ОЛЛ.

Так как наиболее многочисленную группу составили больные, которым лимфоциты донора переливали по поводу посттрансплантационного рецидива гемобластоза в период миелотоксического агранулоцитоза, нами проведено исследование некоторых прогностических факторов с целью определения их возможного влияния на результаты адоптивной иммунотерапии посттрансплантационного рецидива.

Именно в этой группе больных были получены наилучшие результаты. Так, частота полная ремиссия со 100% донорским химеризмом была документирована у 74%. Десятилетняя общая выживаемость больных составила 25%, а кривая общей выживаемости вышла на «плато» после двух лет наблюдения.

На результаты лечения посттрансплантационного рецидива оказали влияние факторы, характеризовавшие течение ОМЛ на этапе индукции и раннего посттрансплантационного периода. Если алло-ТГСК выполнена на фоне первой ремиссии ОМЛ, а рецидив после трансплантации развился более чем через 10 месяцев, то в этом случае вероятность достижения ремиссии с восстановлением полного донорского химеризма может достигать 86%.

При анализе результатов трансфузий лимфоцитов донора в период миелотоксического агранулоцитоза в зависимости от интенсивности курса противорецидивной химиотерапии были обнаружены некоторые закономерности, свидетельствующие о целесообразности применения интенсивных курсов, являющихся традиционными для лечения рецидивов лейкоза. Применение этой схемы способствовало повышению частоты повторных ремиссий до 80%.

Переливание лимфоцитов донора на фоне ремиссии, индуцированной предшествующей химиотерапией, позволяло сохранять достигнутый эффект в течение 5 лет в 50% случаях. При этом наиболее продолжительный эффект после адоптивной иммунотерапии наблюдался у больных с поздним посттрансплантационным рецидивом ОМЛ и после переливания высоких доз CD3<sup>+</sup> клеток.

Следует отметить, что включение в схемы адоптивной иммунотерапии химиотерапевтических препаратов статистически достоверно повышало эффективность лечебных мероприятий. Так, если монотерапия лимфоцитами донора обеспечивала достижение ремиссии с восстановлением полного донорского кроветворения у 33% больных, то предварительный курс химиотерапии позволил увеличить частоту полного ответа до 69% ( $p=0,03$ ).

Противоопухолевый эффект применения ТЛД в монорежиме может быть объяснен прямым воздействием лимфоцитов донора (цитотоксических лимфоцитов, НК-клеток) на опухолевые клетки, однако формирование эффекта «трансплантат против лейкоза» после ТЛД происходит в течение нескольких недель. Поэтому данная схема эффективна при медленно протекающих рецидивах гемобластозов (хронический миелолейкоз, множественная миелома, лимфопролиферативные заболевания) [81, 99, 102, 132].

Эффективность ТЛД в монорежиме при ОМЛ по данным Collins R. и соавт. и Kolb H. и соавт. может составлять 15% и 29%, соответственно [48, 81].

По результатам нашего исследования, лечение посттрансплантационного рецидива с помощью трансфузий лимфоцитов донора в монорежиме оказалось

эффективным у больных ХМЛ (в 60% случаев была достигнута ремиссия с восстановлением полного донорского химеризма). Достигнутый эффект сохранялся от 8 до 162 месяцев.

При посттрансплантационном рецидиве ОМЛ эффективность трансфузий лимфоцитов донора в качестве единственного терапевтического агента была значительно ниже (16,7%), чем у больных ХМЛ. Однако продолжительность этой ремиссии многократно превышала таковую после алло-ТГСК (30 месяцев против 4 месяцев).

Кроме того нами отмечено, что результаты адоптивной иммунотерапии посттрансплантационного рецидива в значительной степени зависят от эффективности проведенной химиотерапии. Применение ТЛД после неэффективного химиотерапевтического воздействия не обеспечивало достаточного эффекта. Восстановление полного донорского химеризма получить не удалось, несмотря на большое количество перелитых CD3<sup>+</sup> клеток.

В результате проведенного нами анализа удалось заключить, что для достижения максимального эффекта, лимфоциты донора необходимо переливать после проведения курса химиотерапии, индуцирующего ремиссию гемобластоза.

При быстро прогрессирующем гемобластоze, к которым относится ОМЛ, прогрессия заболевания опережает формирование реакции «трансплантат против лейкоза», в этих случаях ТЛД на фоне развернутого рецидива в подавляющем большинстве случаев неэффективны.

Далее нами был проведен анализ результатов адоптивной иммунотерапии посттрансплантационного рецидива гемобластоза в зависимости от фазы заболевания на момент выполнения алломиелотрансплантации.

Оказалось, что у пациентов, которым алло-ТГСК была выполнена на фоне ремиссии гемобластоза, полный эффект после адоптивной иммунотерапии посттрансплантационного рецидива был достигнут в 76% случаях. Если алломиелотрансплантация была выполнена вне ремиссии заболевания, то адоптивная иммунотерапия была эффективна только в 20% случаев. Таким

образом, частота достижения ремиссии с полным донорским химеризмом была достоверно лучше у больных, трансплантированных в ремиссии гемобластоза ( $p=0,002$ ).

В 4-х из 8 случаев ХМЛ алло-ТГСК была осуществлена в хронической фазе заболевания. Адоптивная иммунотерапия посттрансплантационного рецидива обеспечила ремиссию с восстановлением полного донорского химеризма у всех этих больных. Среди 4-х пациентов с ХМЛ, которым алло-ТГСК была проведена в фазе акселерации или бластного криза, только у одного (25%) больного удалось получить ремиссию с восстановлением донорского химеризма после ТЛД по поводу посттрансплантационного рецидива.

При сопоставлении длительности ответа после адоптивной иммунотерапии нами выявлены достоверно лучшие показатели ( $p = 0,04$ ) общей выживаемости у больных, развивших рецидив после алломиелотрансплантации, выполненной в период хронической фазы ХМЛ и первой ремиссии гемобластоза. Так, пятилетняя и десятилетняя общая выживаемость у больных ХМЛ, трансплантированных в хронической фазе, и леченных трансфузиями лимфоцитов донора по поводу посттрансплантационного рецидива, составляет 50%. Если алло-ТГСК была выполнена в первой ремиссии ОЛ, то пятилетняя общая выживаемость после успешной адоптивной иммунотерапии посттрансплантационного рецидива равняется 25%.

Для определения влияния сроков развития посттрансплантационного рецидива на результаты адоптивной иммунотерапии, нами была проанализирована частота и продолжительность ответа на лечение у больных с гематологическим рецидивом гемобластоза, развившимся в течение первых 6 месяцев и позднее 6 месяцев после алло-ТГСК.

В тех случаях, когда рецидив развивался в течение первых 6 месяцев после алло-ТГСК, частота достижения ремиссии с полным донорским химеризмом после ТЛД составила 45%. В случае переливания лимфоцитов донора при более позднем рецидиве, частота достижения повторной ремиссии равнялась 68%.

Пятилетняя общая выживаемость у больных, которым выполнена адоптивная иммунотерапия через 6 и более месяцев от алло-ТГСГК составила 35%, что в 2 раза превышает показатели общей выживаемости больных с рецидивом в первые 6 месяцев после алло-ТГСГК (15%).

Таким образом, наше исследование показало, что частота достижения полного ответа и его продолжительность у пациентов с гематологическим рецидивом после алло-ТГСГК зависит от нозологической формы заболевания, схемы адоптивной иммунотерапии (применение химиотерапевтических препаратов перед переливаем лимфоцитов донора) и длительности ремиссии после алло-ТГСГК (более 6 месяцев).

В публикациях последних лет встречаются сведения о том, что профилактическое (и/или превентивное) применение трансфузий лимфоцитов донора в ранние сроки после алломиелотрансплантации позволяет в 50-70% случаев предотвратить развитие гематологического рецидива [22, 118, 135]. В нашем исследовании 8 больным гемобластозами в связи с убывающим смешанным химеризмом после алло-ТГСГК были выполнены ТЛД. У 57% больных ОМЛ в результате переливаний лимфоцитов донора с последующим введением ИЛ-2 было отмечено постепенное увеличение показателей донорского химеризма вплоть до полной замены хозяйского кроветворения на донорское. Пятилетняя общая выживаемость в этой группе больных составила 65%. У больной ХМЛ, которой проводились переливания лимфоцитов донора по поводу убывающего смешанного химеризма, адоптивная иммунотерапия оказалась неэффективной.

Следующей задачей нашего исследования являлось изучение возможности повторного применения адоптивной иммунотерапии в случае диагностики второго посттрансплантационного рецидива ОМЛ. Несмотря на то, что больные со вторым посттрансплантационным рецидивом относятся к группе с крайне неблагоприятным прогнозом, повторные ТЛД с предшествующей ХТ обеспечивали достижение ремиссии у 83% больных. Следует отметить, что в двух

случаях продолжительность ремиссии после второго эпизода ТЛД превышала продолжительность (в 8 и 63 раза) эффекта первого эпизода иммунотерапии.

Реакция «трансплантат против хозяина» является одним из основных осложнений адоптивной иммунотерапии. По результатам нашего исследования острая РТПХ была диагностирована у 38% больных, получивших ТЛД. Наличие острой РТПХ было ассоциировано с достижением ремиссии и восстановлением полного донорского химеризма в 90% случаев. Показатели пятилетней общей выживаемости у больных с острой РТПХ после адоптивной иммунотерапии оказались более высокими, чем у больных без острой РТПХ (35% против 20%, соответственно). Данная зависимость не является статистически достоверной ( $p = 0,2$ ), хотя десятилетнее наблюдение за этими пациентами свидетельствует о сохраняющейся разнице общей выживаемости в пользу наличия острой РТПХ.

Хроническая форма РТПХ после ТЛД была диагностирована у 31% больных. При этом в 88% случаев хроническая РТПХ трансформировалась из острой формы.

При сравнении продолжительности эффекта после проведения адоптивной иммунотерапии у больных с РТПХ оказалось, что длительность ремиссии с сохраняющимся полным донорским химеризмом при наличии хронической РТПХ в 1,6 раза (13 против 8 месяцев) превышает таковую у больных с острой РТПХ.

Общая выживаемость больных, в зависимости от наличия или отсутствия хронической РТПХ после трансфузий лимфоцитов донора демонстрирует достоверно лучшие показатели пятилетней общей выживаемости пациентов, у которых в результате адоптивной иммунотерапии имела место хроническая РТПХ. Так, вероятность прожить 5 лет после адоптивной иммунотерапии, проводившейся по поводу посттрансплантационного рецидива или убывающего смешанного химеризма, в случае присоединения хронической РТПХ составила 45%, а в случае отсутствия хронической РТПХ - лишь 18% ( $p = 0,02$ ). Полученные результаты свидетельствуют о важной роли хронической РТПХ в поддержании

стабильного донорского химеризма, и прямой связи её с реакцией «трансплантат против лейкоза».

У 32 больных после адоптивной иммунотерапии не было отмечено клиники РТПХ, в этой группе больных ремиссия с восстановлением полного донорского химеризма была достигнута всего лишь у 34%. Продолжительность полученного эффекта в среднем равнялась 8 месяцам, что соответствовало таковому у больных с острой РТПХ.

Особое внимание нами было уделено группе больных, у которых после трансфузий лимфоцитов донора присоединилась острая РТПХ, но была успешно излечена иммуносупрессивной терапией. При сравнении результатов адоптивной иммунотерапии в зависимости от наличия РТПХ было отмечено, что частота восстановления полного донорского химеризма у больных с РТПХ (острой и хронической), а также в случае излечения острой РТПХ, была практически одинаковой (83-94%) и значительно отличалась от таковой у больных без РТПХ (34%). Время, потребовавшееся на полноценное восстановление донорского кроветворения, было одинаковым во всех 4-х группах больных. В то же время продолжительность сохранения ремиссии и донорского химеризма существенно отличалась в пользу больных с хронической РТПХ (13 месяцев при наличии хронической РТПХ против 8 месяцев при отсутствии хронической формы у больных с острой РТПХ). Если же острую РТПХ удавалось полностью купировать в ближайшие сроки после её возникновения, то продолжительность ремиссии и общая выживаемость у этих больных были самыми пессимистичными (2 и 4 месяца, соответственно).

Как было отмечено ранее, введение химиотерапевтических препаратов до трансфузий лимфоцитов донора статистически достоверно увеличивало частоту ремиссий и улучшало показатели общей выживаемости. Далее нами было оценено влияние предшествующей трансфузиям лимфоцитов донора химиотерапии на частоту развития РТПХ.



В 20% случаев после ТЛД в виде монотерапии была диагностирована острая и хроническая формы РТПХ. Частота РТПХ в группе больных, которым трансфузии лимфоцитов донора выполнялись после предшествовавшей химиотерапии, оказалась значительно выше. Так острая РТПХ была диагностирована у 45% больных, а хроническая РТПХ – у 34% больных.

Наиболее часто острая (52%) и хроническая (39%) РТПХ отмечалась у больных, ТЛД которым осуществлялись в период миелотоксического агранулоцитоза. В тоже время следует отметить, что предварительное проведение химиотерапии способствовало вдвое более частому достижению ремиссии и полному восстановлению донорского кроветворения (69% против 33%).

Проведение интенсивной химиотерапии до ТЛД увеличивало частоту острой РТПХ до 53% и хронической формы до 47%. В тоже время ни одного случая острой и хронической РТПХ не было диагностировано в группе больных, у которых трансфузиям лимфоцитов предшествовало проведение менее интенсивной схемы химиотерапии.

Далее, нами было рассмотрено, зависит ли частота РТПХ, возникающей после ТЛД, от интенсивности предтрансплантационного режима кондиционирования. В нашем исследовании показано, что проведение миелоаблативного режима кондиционирования сопровождалось более высоким риском развития острой (41% против 33%) и хронической (38% против 17%) РТПХ после адоптивной иммунотерапии, хотя следует учитывать, что эти различия оказались статистически недостоверными. При этом, частота достижения ремиссии с полным донорским химеризмом в результате лечения посттрансплантационного рецидива статистически достоверно была выше у больных, которым был проведен миелоаблативный режим кондиционирования (68% против 33%,  $p = 0,02$ ).

При изучении влияния острой или хронической РТПХ, возникающей после алло-ТГСК, на вероятность развития РТПХ после адоптивной иммунотерапии была выявлена некоторая зависимость. Среди больных с хронической РТПХ

после алло-ТГСК, частота этого осложнения после переливаний лимфоцитов донора не превысила 11% (для острой) и 22% (для хронической) формы. А среди 43 больных, переживших посттрансплантационный период без хронической РТПХ, после адоптивной иммунотерапии частота острой (44%) и хронической (33%) РТПХ была весьма высока, хотя выявленные различия оказались статистически недостоверными ( $p = 0,1$ ).

Тем не менее, по отношению к пациентам, у которых после алло-ТГСК отсутствовала хроническая РТПХ, должна быть повышенная настороженность в плане высокого риска развития этого осложнения после адоптивной иммунотерапии. Возможно, именно этим пациентам необходим более тщательный подбор начальной дозы  $CD3^+$  клеток и последующей ее эскалации при проведении адоптивной иммунотерапии. Хотя необходимо учитывать, что наличие именно хронической РТПХ после ТЛД сопряжено с максимальным эффектом «трансплантат против лейкоза».

Одним из факторов, определяющих эффективность адоптивной терапии и частоту РТПХ, является количество перелитых лимфоцитов донора, а также режим их введения. Несмотря на большое количество исследований, направленных на определение оптимальной дозы переливаемых лимфоцитов донора, до сих пор нет единого мнения о дозе  $CD3^+$  клеток, которая индуцировала бы РТПЛ при минимальном риске развития острой РТПХ [22, 51, 81, 92].

В задачи нашего исследования входило изучение эффективности ТЛД, а также частоты иммунологических осложнений в зависимости от интенсивности адоптивной иммунотерапии.

Так как первоначально переливания лимфоцитов донора выполнялись без конкретизации начальной и последующих доз  $CD3^+$  клеток, провести достоверный анализ эффективности и влияния количества перелитых лимфоцитов донора за одну процедуру на частоту РТПХ не удалось.

Хотя было отмечено, что наибольшая эффективность адоптивной иммунотерапии наблюдалась при переливании  $CD3^+$  клеток в суммарной дозе от

25 до  $50 \times 10^7$  клеток/кг и более  $50 \times 10^7$  клеток/кг. После переливания таких доз лимфоцитов ремиссия с полным донорским химеризмом была получена в 67% и 57%, соответственно. Медиана продолжительности полного ответа больных этих групп составила 6 и 19 месяцев, соответственно.

В тоже время частота острой РТПХ после переливания  $CD3^+$  клеток в суммарной дозе от 25 до  $50 \times 10^7$  клеток/кг была наибольшей (47%). Хроническая форма РТПХ была диагностирована примерно у трети больных.

Таким образом, наилучшие показатели достижения и сохранения полного ответа были получены у больных, которым выполнены трансфузии лимфоцитов донора в суммарной дозе от 25 до  $50 \times 10^7 CD3^+$  клеток/кг. Однако в данной группе больных была отмечена самая высокая частота острой РТПХ.

Далее нами было изучено, влияет ли суммарное количество лимфоцитов донора, перелитых за весь период адаптивной иммунотерапии, на тяжесть клинических проявлений РТПХ. Оказалось, что тяжесть клинического течения острой РТПХ достоверно зависит от суммарной дозы перелитых  $CD3^+$  клеток. Так, если больным за весь период адаптивной иммунотерапии переливали  $11,5 \pm 11,9 \times 10^7 CD3^+$  клеток/кг, то клинические признаки острой РТПХ не превышали I-II степени тяжести. Если же суммарная доза  $CD3^+$  клеток достигала  $26,7 \pm 15,1 \times 10^7 CD3^+$  клеток/кг, то клинические признаки острой РТПХ соответствовали III-IV степени.

Клиническое течение хронической РТПХ аналогично коррелировало с величиной дозы перелитых  $CD3^+$  клеток: чем больше доза  $CD3^+$  клеток, тем большее число органов-мишеней вовлекалось в иммунологический конфликт, характеризующийся и более тяжелыми клиническими проявлениями.

Различия, касающиеся взаимосвязи хронической РТПХ и дозы перелитых лимфоцитов, статистически не достоверны. Возможно это обусловлено недостаточным числом наблюдений. Тем не менее, весьма показательным оказалось практически двукратное увеличение продолжительности ремиссии (22 месяца против 12 месяцев) у больных, у которых в результате переливания

большой суммарной дозы  $CD3^+$  клеток развивалась экстенсивная форма хронической РТПХ.

Кроме того нами было рассмотрено, возможно ли снизить частоту РТПХ, изменив алгоритм трансфузий лимфоцитов донора. А именно, какова частота РТПХ у больных, лимфоциты донора которым переливали в начальной дозе  $1 \times 10^7 CD3^+$  клеток/кг с последующей эскалацией дозы клеток.

В анализ включены больные, лимфоциты донора которым переливали по поводу посттрансплантационного рецидива в период миелотоксического агранулоцитоза. 15 больным трансфузии лимфоцитов донора были выполнены без конкретизации начальной дозы и без последующей её эскалации. При этом во время первой трансфузии содержание лимфоцитов донора колебалось от 2 до  $16 \times 10^7 CD3^+$  клеток/кг. 8 больным переливания лимфоцитов донора выполнены согласно новому алгоритму, а именно, в начальной дозе, соответствовавшей  $1 \times 10^7 CD3^+$  клеток/кг.

В результате было отмечено, что применение нового алгоритма трансфузий лимфоцитов донора, основанного на конкретизации начальной дозы  $CD3^+$  клеток, позволило достоверно снизить частоту острой РТПХ: с 73% до 12% ( $p = 0,01$ ). Частота хронической РТПХ также была снижена почти в двое (с 47% до 25%), однако эти различия статистически не достоверны ( $p = 0,3$ ).

Четко оценить влияние эскалации дозы  $CD3^+$  клеток на частоту РТПХ не представилось возможным, так как запланированное увеличение дозы лимфоцитов донора согласно новому алгоритму выполнено всего двум из 8 больных. В обоих случаях после адоптивной иммунотерапии была достигнута ремиссия с полным донорским химеризмом. У одного из этих больных была диагностирована острая РТПХ, которая в последующем трансформировалась в хроническую форму. Остальным 6 больным лимфоциты донора переливали однократно, поскольку у 2-х из них уже после первой трансфузии была диагностирована ремиссия с восстановлением полного донорского кроветворения, а у 4-х больных после первого переливания лимфоцитов была констатирована

прогрессия заболевания.

Из представленных данных можно сделать вывод о том, что уменьшение начальной дозы переливаемых лимфоцитов донора до  $1 \times 10^7 \text{CD3}^+$  клеток/кг позволило достоверно снизить частоту острой РТПХ. Несмотря на отсутствие явных преимуществ нового алгоритма ТЛД в отношении частоты достижения полного ответа, длительность сохранения ремиссии и полного донорского химеризма у больных этой группы вдвое превышает таковую у больных, которым лимфоциты донора переливали без конкретизации начальной дозы.

Выполнение аллогенной миелотрансплантации всегда сопровождается проведением длительной и интенсивной иммуносупрессивной терапии, вызывающей глубокое угнетение всех звеньев иммунного ответа, продолжительность которого зависит от целого ряда факторов. Полноценность восстановления Т-лимфоцитов периферической крови после алло-ТГСК играет важную роль в развитии противоопухолевого иммунитета, контролирующего рецидив гемобластоза.

Нами было проведено иммунофенотипическое исследование субпопуляций Т-лимфоцитов (Т-хелперы, цитотоксические Т-лимфоциты, Т-регуляторные клетки, НК-клетки) периферической крови больных гемобластозами на фоне трансфузий лимфоцитов донора по поводу посттрансплантационного рецидива гемобластоза или убывающем смешанном химеризме. Динамическое исследование проводилось для выявления возможных закономерностей в субпопуляционном составе Т-лимфоцитов периферической крови во время констатации рецидива или убывающего смешанного химеризма, а также в течение 10 недель после первой ТЛД.

По результатам динамического исследования субпопуляций Т-лимфоцитов периферической крови больных гемобластозами на фоне трансфузий лимфоцитов донора удалось показать, что развернутая картина рецидива гемобластоза сопровождалась снижением абсолютного количества Т-клеток в половине случаев, при этом количество клеток Т-хелперов было снижено у подавляющего

большинства (90%) пациентов, а одновременное снижение двух, трех и четырех субпопуляций выявлялось у 40% больных. Через 2 недели после первой ТЛД отмечался еще более глубокий дефицит практически всех субпопуляций Т-лимфоцитов. Однако уже через 4-6 недели после первой ТЛД у пациентов, достигших ремиссии и полного восстановления донорского кроветворения, наблюдалась постепенная нормализация содержания Т-клеточных субпопуляций (за исключением клеток Т-хелперов). Напротив, в тех случаях, когда проведенная терапия не обеспечила достижения противоопухолевого ответа к 4-й и 6-й неделе после начала ТЛД, абсолютное количество практически всех субпопуляций Т-лимфоцитов оставалось значительно сниженным.

Наиболее выраженные изменения были выявлены при исследовании абсолютного количества  $CD3^+$  клеток и Т-хелперов у больных с гематологическим рецидивом после алло-ТГСК. Так, у больных, достигших в результате адоптивной иммунотерапии ремиссии с восстановлением полного донорского химеризма, абсолютное количество  $CD3^+$  клеток и Т-хелперов было достоверно выше ( $p < 0,05$ ) чем у пациентов, у которых проведенное лечение не оказало достаточного противоопухолевого эффекта и была констатирована прогрессия гемобластоза.

В случаях убывающего смешанного химеризма, но при сохраняющейся ремиссии ОЛ, трансфузии лимфоцитов донора не сопровождалась снижением содержания субпопуляций Т-лимфоцитов за исключением клеток Т-хелперов. Причем средние показатели абсолютного содержания этих клеток сохранялись на одном и том же уровне.

Таким образом, результаты качественной и количественной оценки субпопуляций Т-лимфоцитов позволили охарактеризовать изменения содержания количества Т-хелперов, цитотоксических клеток, Т-регуляторных клеток и НК-клеток в зависимости от фазы заболевания и степени ответа на проводимую адоптивную иммунотерапию.

Небольшое количество наблюдений не позволило сделать окончательное

заклучение. Однако выявленные тенденции к восстановлению цитотоксических лимфоцитов и натуральных киллеров у пациентов, достигших ремиссии в результате ТЛД, могут рассматриваться в качестве предикторов клинического эффекта. Возможно, продолжение исследований субпопуляций Т-лимфоцитов позволят в будущем выявить более значимые изменения, характеризующие иммунологический и противоопухолевый эффекты ТЛД.

Итак, результаты проведенного исследования подтвердили наличие тесной взаимосвязи таких феноменов, как РТПХ и реакция «трансплантат против лейкоза», а также – противоопухолевой эффективности лимфоцитов донора и полного донорского химеризма. Поскольку противоопухолевая эффективность трансплантации аллогенного костного мозга кроме мощного предтрансплантационного кондиционирования обеспечивается еще и присутствием эффекта «трансплантата против лейкоза», в решении проблемы посттрансплантационных рецидивов могут быть использованы возможности этого эффекта.

Дальнейшее изучение биологического воздействия переливаний лимфоцитов донора на опухолевые клетки реципиента должно быть направлено прежде всего на возможность управлять этим эффектом, отделить его от реакции «трансплантат против хозяина». Использование высоко чувствительных молекулярно-биологических и молекулярно-цитогенетических методов мониторинга гемопоезического химеризма и минимальной остаточной болезни после трансплантации аллогенного костного мозга позволяет выявлять убывающий донорский химеризм и/или начинающийся рецидив на самых ранних этапах. А своевременное адекватное проведение адаптивной иммунотерапии трансфузиями лимфоцитов донора как с лечебной, так и превентивной целью, будет способствовать осуществлению иммунного контроля над лейкозом.

## ВЫВОДЫ

1. Адоптивная иммунотерапия посттрансплантационного рецидива, включающая трансфузии лимфоцитов донора (+ ИЛ-2), обеспечивала достижение ремиссии с восстановлением полного донорского химеризма у 64% больных ОМЛ, 63% больных ХМЛ, 25% больных ОЛЛ и 25% больных МДС. 10-летняя общая выживаемость больных ОМЛ и ХМЛ составила 20% и 40%. 1,5-летняя общая выживаемость больных ОЛЛ и МДС не превысила 35% и 25%. Трансфузии лимфоцитов донора при убывающем донорском химеризме после алло-ТГСК способствовали его стойкому восстановлению у 50% больных гемобластозами. При этом 5-летняя общая выживаемость больных была равна 65%.

2. Переливание лимфоцитов донора в период миелотоксического агранулоцитоза, индуцированного предшествовавшей химиотерапией, позволило повысить частоту полных ремиссий ОМЛ до 74% с вероятностью 10-летней общей выживаемости больных 25%.

3. Результаты адоптивной иммунотерапии рецидива ОМЛ зависят от фазы заболевания в момент выполнения алло-ТГСК и сроков развития посттрансплантационного рецидива. Ремиссия с полным донорским химеризмом в результате трансфузий лимфоцитов донора может быть достигнута у 86% реципиентов, если алломиелотрансплантация выполнялась в период I ремиссии, а рецидив заболевания развился более, чем через 10 месяцев после алло-ТГСК.

4. Повторное применение адоптивной иммунотерапии трансфузиями лимфоцитов того же донора при лечении второго посттрансплантационного рецидива сопровождается достижением очередной ремиссии с восстановлением полного донорского химеризма в 83% случаев. Продолжительность этой ремиссии может многократно превышать таковую после алло-ТГСК и после предыдущего эпизода трансфузий лимфоцитов донора.



5. Подтверждена роль РТПХ в достижении противоопухолевого эффекта адоптивной иммунотерапии трансфузиями лимфоцитов донора. Частота ремиссий со 100% донорским химеризмом составляла 83% - 94% у больных с острой и хронической РТПХ, и 34% у больных без РТПХ. При этом длительность ремиссии на фоне хронической РТПХ в 1,5 раза превышала таковую у больных без РТПХ. В случае купирования острой РТПХ в ближайшие сроки после её возникновения общая выживаемость больных не превышала 4 месяцев.

6. Переливание больших доз  $CD3^+$  клеток (суммарно более  $16 \times 10^7$  кл/кг) на фоне миелотоксического агранулоцитоза сопровождается высокой частотой острой (73%) и хронической (47%) РТПХ. Уменьшение начальной дозы  $CD3^+$  клеток до  $1 \times 10^7$  кл/кг позволяет достоверно снизить риск острой РТПХ до 13% ( $p = 0,01$ ) и хронической РТПХ до 25% ( $p = 0,3$ ).

7. Достижение ремиссии и полного восстановления донорского кроветворения в результате адоптивной иммунотерапии сопровождалось нормализацией в течение 4-6 недель содержания абсолютного числа клеток субпопуляций Т-лимфоцитов (за исключением Т-хелперов) в периферической крови больных гемобластозами.

## **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

Трансфузии лимфоцитов донора выполненные при гематологическом рецидиве и убывающем донорском химеризме улучшают показатели общей выживаемости больных после алло-ТГСК. Наиболее эффективно лечение посттрансплантационного рецидива у больных гемобластозами, если переливанию лимфоцитов донора предшествует введение химиотерапевтических препаратов.

Разработан и внедрен в клиническую практику ФГБУ ГНЦ Минздрава России алгоритм адоптивной иммунотерапии гематологического рецидива, а также предупреждения рецидива при убывающем донорском химеризме после алло-ТГСК.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- Алло–ТГСК – аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток
- ГСК – гемопоэтические стволовые клетки
- Г–КСФ – гранулоцитарный колониестимулирующий фактор
- ГМ–КСФ – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор
- ИЛ – Интерлейкин
- ИФН–альфа - интерферон альфа
- ИФН–гамма – интерферон гамма
- МРБ – минимальная резидуальная болезнь
- ММ – множественная миелома
- мкАТ – моноклональные антитела
- ОЛ – острый лейкоз
- ОЛЛ – острый лимфобластный лейкоз
- ОМЛ – острый миелобластный лейкоз
- ПЦР – полимеразная цепная реакция
- РТПЛ – реакция «трансплантат против лейкоза»
- РТПХ – реакция «трансплантат против хозяина»
- ТЛД – трансфузия лимфоцитов донора
- ФНО–альфа – фактор некроза опухоли–альфа
- ХМЛ – хронический миелоидный лейкоз
- HLA – human leukocyte antigen, лейкоцитарный антиген человека
- FasL – Fas ligand, лиганд рецептора смерти
- FISH – флюоресцентная *in situ* гибридизация
- IBMTR – International Bone Marrow Transplant Registry, Международный регистр трансплантации костного мозга
- KIR – killer immunoglobulin–like receptors, иммуноглобулиноподобные рецепторы естественных киллеров

MHC – major histocompatibility complex, главный комплекс гистосовместимости

NK – natural killers, клетки натуральные киллеры

STR - short tandem repeat, короткие tandemные повторы

VNTR - variable number tandem repeats, варьирующие числом tandemные повторы

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Афанасьев, Б.В. Роль трансплантации гемопоэтических стволовых клеток в терапии взрослых больных острыми лейкозами / Б.В. Афанасьев, Л.С. Зубаровская // Онкогематология. – 2006. - № 1-2. – С. 70-86.
2. Блау, О.В. Химеризм после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток // Клиническая онкогематология. – 2013. - № 1. – С. 34-44.
3. Богданов, Р.Ф. Трансфузии лимфоцитов донора в аплазии после химиотерапии при рецидиве лейкоза после трансплантации аллогенного костного мозга / Р.Ф. Богданов, Л.П. Менделеева, Л.С. Любимова, И.В. Гальцева, Л.А. Кузьмина, Е.И. Желнова и соавт. // Гематология и трансфузиология. – 2012. – Т.5. - № 73. – С. 31
4. Виноградова, О.А. Изучение динамики смешанного химеризма методом флюоресцентной гибридизации *in situ* у больных хроническим миелолейкозом после аллогенной трансплантации костного мозга / О.А. Виноградова, В.Г. Савченко, А.Л. Неверова, Л.В. Дяченко, Е.В. Домрачева, Л.С. Любимова и др. // Терапевтический архив. - 2001. – Т. 7. - № 73. - С. 26-34.
5. Вавилов, В.Н. Восстановление лимфоцитов периферической крови у пациентов с гематологическими заболеваниями после аллогенной неродственной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.00.29 / Вавилов Владимир Николаевич - СПб. - 2006. - 27 с.
6. Ганапиев, А.А. Опыт применения неродственной аллогенной трансплантации стволовых гемопоэтических клеток в клинике трансплантации костного мозга СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова / А.А. Ганапиев, Б.В. Афанасьев, Л.С. Зубаровская, Е.В. Семенова, Н.Е. Иванова, А.Л. Алянский, Е.В. Морозова и др. // Терапевтический архив. – 2007. - Т. 79. - № 7. – С. 36-43.
7. Демидова, И. А. Аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток в режимах пониженной интенсивности у больных

гемобластозами / И.А. Демидова, Е.Н. Паровичникова, Р.М. Кутьина, Л.Н. Порешина, А.П. Шпакова, Ю.В. Ольшанская, А.В. Мисюрин, В.Г. Савченко // Терапевтический архив. – 2007. - Т. 79. - № 7. - С. 48-52.

8. Желнова, Е. И. Эффективность терапии лимфоцитами донора и интерлейкином-2 у пациента с двумя посттрансплантационными рецидивами острого миелоидного лейкоза / Е.И.Желнова, Л.П.Менделеева, Л.С.Любимова и др. // Терапевтический архив. - 2007. – Т. 79. - №8. - С. 67-69.

9. Желнова, Е.И. Линейно-специфический химеризм у больных гемобластозами после трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.00.29 / Желнова Евгения Ивановна – М., 2008. – 27 с.

10. Зубаровская, Л.С. Клиническая онкогематология: Руководство для врачей / Л.С. Зубаровская, Л.М. Фрегатова, Б.В. Афанасьев; под общ. ред. М.А. Волковой – М.: Медицина, 2007. – С. 956-958

11. Иоффе, Ю.Г. Современное состояние неродственного донорства гемопоэтических стволовых клеток в Российской Федерации (по материалам отчета Всемирной ассоциации доноров костного мозга за 2008г) / Ю.Г. Иоффе // Клиническая онкогематология. - 2009. - Т. 2. - № 3. – С. 257-259.

12. Козлов, В.К. Иммуноterapia рекомбинантными цитокинами в лечении онкологических больных / В.К. Козлов, О.Е. Молчанов, Г.М. Жаринов // СПб Успехи клинической иммунологии и аллергологии. - 2002. – № 3. – С. 263-279.

13. Кузьмина, Л.А. Экстрamedулярные рецидивы после трансплантации аллогенных гемопоэтических клеток и трансфузий лимфоцитов донора / Л.А. Кузьмина, Л.С. Любимова, Л.П. Менделеева, Е.И. Желнова, Н.А. Петинати, Р.Ф. Богданов и др. // Клиническая онкогематология. – 2011. –Т. 4. - № 3.- С.191–195.

14. Любимова, Л.С. Трансплантации аллогенных и аутологичных гемопоэтических стволовых клеток при острых лейкозах (итоги 20-летнего опыта) / Л.С. Любимова, Л.П. Менделеева, В.Г. Савченко, Е.Н. Паровичникова, И.А.

Демидова, Г.А. Клясова, Е.О. Грибанова, И.В. Гальцева, Л.А. Кузьмина, К.С. Момотюк и др. // Терапевтический архив. - 2007. – № 7. - С. 30-35.

15. Любимова, Л.С. HLA –идентичная трансплантация костного мозга в первой хронической фазе хронического миелолейкоза в ранние сроки заболевания или длительная терапия ингибиторами тирозинкиназ? / Л.С. Любимова, Л.А. Кузьмина, Е.С. Урнова, Е.И. Желнова, М.В. Анухина, Л.П. Менделеева, Т.В. Гапонова, И.В. Гальцева, О.С. Покровская, Р.М. Кутьина и др. // Гематология и трансфузиология. - 2012. – Т. 57. - № 3. - С. 6 – 10.

16. Масчан, М.А. Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток при ювенильном миеломоноцитарном лейкозе: анализ опыта одного центра и обзор литературы / М.А. Масчан, Л.А. Хачатрян, Ю.В. Скворцова, Е.Е. Курникова, Д.А. Шашелева, В.О. Бобрынина и др.// Онкогематология. - 2011. - № 1. - С. 45-55.

17. Менделеева, Л.П. Трансплантация гемопоэтических клеток в Российской Федерации (отчет Межрегионального регистра за 1996—2006 гг.) / Л.П. Менделеева, В.Г. Савченко, Л.С. Любимова, И.А. Демидова, Б.В. Афанасьев // Гематология и трансфузиология. - 2007. – № 6. - С. 31 – 35.

18. Менделеева, Л.П. Субпопуляции Т-лимфоцитов периферической крови больных гемобластозами на фоне трансфузий лимфоцитов донора после трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток / Л.П. Менделеева, Р.Ф. Богданов, И.В. Гальцева, Л.А. Кузьмина, Т.В. Гапонова, Э.Г. Гемджян, Т.Н. Обухова, Н.В. Рисинская, Н.Н. Калинин, Е.Н. Паровичникова, В.Г. Савченко // Гематология и трансфузиология. – 2013 - №4. – С. 5-13.

19. Молчанов, О.Е. Современные тенденции применения препаратов рекомбинантного интерлейкина-2 в онкологии./ О.Е. Молчанов, М.И. Карелин, Г.М. Жаринов // СПб. Цитокины и воспаление. - 2002. – Т.1. - №3. – С. 38-47.

20. Савченко, В.Г. Новые стратегии в трансплантации стволовых гемопоэтических клеток / В.Г. Савченко // Russian-Norwegian Conference in Hematology: Тез. докл. науч. конф. - СПб. - 2003. - С. 10-11.

21. Семенова, Е.В. Аллогенная трансплантация гемопоэтических клеток с режимами кондиционирования со сниженной интенсивностью доз у детей и подростков с прогностически неблагоприятными формами острого лимфобластного лейкоза / Е.В. Семенова, Н.В. Станчева, А.Л. Алянский, Е.В. Бабенко, В.Н. Вавилов, Е.В. Морозова, С.Н. Бондаренко и др. // Онкогематология. – 2011. - №4. – С. 19-27.

22. Слесарчук, О.А. Эффективность инфузий донорских лимфоцитов у пациентов после различных видов аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток / О.А. Слесарчук, Е.В. Бабенко, Е.В. Семенова, С.Н. Бондаренко, М.А. Эстрина, Е.В. Морозова, В.Н. Вавилов, Б.И. Смирнов, Л.С. Зубаровская, Б.В. Афанасьев // Терапевтический архив.- 2013. - №7 – С. 26-33.

23. Чухловин, А.Б. Принципы молекулярно-генетической оценки гемопоэтического химеризма и области его применения в гематологии / А.Б. Чухловин, Б. Фезе, М.И. Зарайский и др. // Вопр. гематол., онкологии и иммунопатол. в педиатрии. – 2003. – Т.1. - № 1. – С. 70-74.

24. Хайдуков, С.В. Основные и малые популяции лимфоцитов периферической крови человека и их нормальные значения (методом многоцветного цитометрического анализа) / С.В. Хайдуков, А.В. Зурочка, В.А. Черешнев, А.А. Тотолян // Медицинская иммунология. – 2009. - Т. 2. - №3. - С. 227-238.

25. Щеголеватая, О.О. Развитие острого миелоидного лейкоза из донорских клеток после аллогенной трансплантации периферических стволовых кроветворных клеток у больной острым монобластным лейкозом / О.О. Щеголеватая, Е.Н. Паровичникова, И.А. Демидова, В.Г. Исаев, А.Н. Соколов, Е.И. Желнова // Терапевтический архив. - 2011. - Т. 83. - № 3. - С. 57-61.

26. Alatrash, G. Interleukin. Cancer chemother and biother -- principles and practice / G.Alatrash, R.M.Bukowski, C.S.Tannenbaum et al. // Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins. - 2006; P. 767—808.



27. Antin, J.H. Establishment of complete and mixed donor chimerism after allogeneic lymphohematopoietic transplantation: recommendations from a workshop at the 2001 Tandem Meetings of the International Bone Marrow Transplant Registry and the American Society of Blood and Marrow Transplantation./ J.H. Antin, R. Childs, A.H. Filipovich, S. Giralt, S. Mackinnon, T. Spitzer et al.// Biol. Blood Marrow Transplant. – 2001. – Vol. 7. - № 9. - P. 473-85.
28. Aversa, F. Full haplotype mismatched hematopoietic stem cell transplants / F.Aversa // Haematologica. – 2002. – Vol.87.- N 8. – P. 9-12.
29. Bacigalupo, A. Results of hematopoietic stem cell transplantation for hematologic malignancies. Hematology: Basic Principles and Practice. 4th edn. / A.Bacigalupo // In Hoffman R, Benz Jr EJ, Shattil SJ et al (eds.). - Edinburgh: Churchill Livingstone. - 2004. - P. 1713-1725.
30. Balkwill, F.R. Cytokine Cell Biology: A Practical Approach / F.R.Balkwill // Oxford University Press. 3rd edition. - 2001 – P. 253-256.
31. Bar, M. Donor Lymphocyte Infusion for Relapsed Hematological Malignancies After Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation: Prognostic Relevance of the Initial CD3+ T Cell Dose / M.Bar, B.M.Sandmaier, Y.Inamoto, B.Bruno, P. Hari, T.Chauncey, P.J.Martin et al. // Biol Blood Marrow Transplant. – 2013.– Vol. 19. -№6. - P. 949-957.
32. Barnes, D.W. Treatment of murine leukemia with x-rays and homologous bone marrow / D.W.Barnes, J.F.Loutit // Br. J. Haematol. – 1957. - Vol. 3. - №3. – P. 241 -252.
33. Barrett, A.J. Translational mini-review series on vaccines: peptide vaccines for myeloid leukaemias / A.J.Barrett, K.Rezvani // Clin Exp Immunol. - 2007; 148(2): P. 189–198.
34. Barrett, A.J. Immunotherapy: Can we include vaccines with stem-cell transplantation? / A.J.Barrett, K.Rezvani // Nat Rev Clin Oncol. - 2009 Sep; 6(9): P. 503-505.
35. Barrett, A.J. Relapse after allogeneic stem cell transplantation /

A.J.Barrett, M.Battiwalla // *Expert Rev. Hematol.* - 2010– Vol. 3. -№4. -P. 429-441.

36. Bartelink, I.H. Immune reconstitution kinetics as an early predictor for mortality using various hematopoietic stem cell sources in children / I.H.Bartelink, S.V.Belitser, C.A.Knibbe, M.Danhof, A.J.de Pagter, T.C.Egberts, J.J.Boelens // *Biol Blood Marrow Transplant.* - 2013– Vol. 19.-№ 2.- P. 305-313.

37. Bhatia, M. AC133 expression in human stem cells / M.Bhatia // *Leukemia.* – 2001. – Vol. 15. -№11. - P. 1685-1688.

38. Bishop, M.R. Clinical evidence of a graft-versus-lymphoma effect against relapsed diffuse large B-cell lymphoma after allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation / M.R.Bishop, R.M.Dean, S.M.Steinberg, J.Odom, S.Z.Pavletic, C.Chow et al. // *Ann Oncol.* - 2008– Vol. 19.-№11.- P. 1935–1940.

39. Bloor, A.J. High response rate to donor lymphocyte infusion after allogeneic stem cell transplantation for indolent non-Hodgkin lymphoma / A.J.Bloor, K.Thomson, N.Chowdhry, S.Verfuether, S.J.Ings, R.Chakraverty et al. // *Biol Blood Marrow Transplant.* - 2008– Vol. 14.-№ 1.- P. 50–58.

40. Borchers, S. Genetically modified donor leukocyte transfusion and graft-versus-leukemia effect after allogeneic stem cell transplantation / S.Borchers, E.Provasi, A.Silvani, M.Radrizzani, C.Benati et al. // *Hum Gene Ther.* – 2011 - Vol. 22.-№7. - P. 829-841.

41. Bornhäuser, M. Prophylactic transfer of BCR-ABL-, PR1-, and WT1-reactive donor T cells after T cell-depleted allogeneic hematopoietic cell transplantation in patients with chronic myeloid leukemia / M.Bornhäuser, C.Thiede, U.Platzbecker, A.Kiani et al. // *Blood.* - 2011– Vol. 117. -№26. -P. 7174-7184.

42. Bosch, M. Immune reconstitution after hematopoietic cell transplantation / M.Bosch, F.M.Khan, J.Storek // *Curr Opin Hematol.* - 2012– Vol. 19. -№4. - P. 324-335.

43. Brehm, C. IL-2 stimulated but not unstimulated NK cells induce selective disappearance of peripheral blood cells: concomitant results to a phase I/II study / C.Brehm, S.Huenecke, A.Quaiser // *PLoS One.* 2011– Vol. 6.- №11. - P. 273-278.

44. Candoni, A. Quantitative assessment of WT1 gene expression after allogeneic stem cell transplantation is a useful tool for monitoring minimal residual disease in acute myeloid leukemia / A.Candoni, M.Tiribelli, E.Toffoletti et al. // *Eur. J. Haematol.* – 2009. – Vol. 82. - № 1. – P. 61-68.

45. Choi, S.J. Treatment of relapsed acute myeloid leukemia after allogeneic bone marrow transplantation with chemotherapy followed by G-CSF-primed donor leukocyte infusion: a high incidence of isolated extramedullary relapse/ S.J.Choi, J.H.Lee, S.Kim et al. // *Leukemia.* – 2004. – Vol. 18. - №11. - P. 1789–1797.

46. Choi, S.J. Treatment of relapsed acute lymphoblastic leukemia after allogeneic bone marrow transplantation with chemotherapy followed by G-CSF-primed donor leukocyte infusion : a prospective study / S.J.Choi, J.H.Lee, J.H.Lee et al. // *Bone Marrow Transplant.* – 2005. – Vol. 36. – P. 163-169.

47. Clark, W.B. Extramedullary relapses after allogeneic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome / W.B.Clark, S.A.Strickland, A.J.Barrett, B.N.Savani // *Haematologica.* – 2010. - Vol. 95. - №6. - P. 860-863.

48. Collins, R. Donor leukocyte infusions in 140 patients with relapsed malignancy after allogeneic bone marrow transplantation / R.Collins, O.Shpilberg, W.Drobyski, D.Porter, S.Giralt, R.Champlin et al. // *J Clin Oncol.* - 1997– Vol. 15. - P.433–444.

49. Cornely, O.A. Evidence-based assessment of primary antifungal prophylaxis in patients with hematologic malignancies / O.A.Cornely, J.Ullmann, M.Karthus // *Blood.* – 2003 – Vol. 101. -№9 – P. 3365-3372.

50. Czibere, A. 5-Azacytidine for the treatment of patients with acute myeloid leukemia or myelodysplastic syndrome who relapse after allo-SCT: a retrospective analysis / A.Czibere, I.Bruns, N.Kroger et al. // *Bone Marrow Transplant.* – 2010. – Vol. 45. – P. 872–876.

51. Dazzi, F. Comparison of single-dose and escalating-dose regimens of donor lymphocyte infusion for relapse after allografting for chronic myeloid leukemia /

F.Dazzi, R.M.Szydlo, C.Craddock, N.C.Cross, J.Kaeda // *Blood*. - 2000; 95(1): P. 67-71.

52. Dazzi, F. Disease relapse after haematopoietic stem cell transplantation: Risk factors and treatment/ F.Dazzi, C.Fozza // *Best Practice and Research Clinical Haematology*. - 2007. - Vol. 20. - №2. – P. 311-327.

53. Deol, A. Role of donor lymphocyte infusions in relapsed hematological malignancies after stem cell transplantation revisited / A.Deol, L.G.Lum // *Cancer Treat. Rev.* – 2010. – Vol. 36. - №7. – P. 528-38.

54. Dermime, S. Immune escape from a graft versus leukemia effect may play a role in the relapse of myeloid leukemia / S.Dermime S., D.A.Mavroudis, Y.Z.Jiang et al. // *Bone Marrow Transplant.* - 1997– Vol. 19. - №10. - P. 989 - 999.

55. Duval, M. Hematopoietic stem-cell transplantation for acute leukemia in relapse or primary induction failure / M.Duval, J.P.Klein, H.Wensheng, J.Y.Cahn, M.Cairo, B.M.Camitta et al. // *J. Clin. Oncol.* - 2010. – Vol. 23.- №10. - P. 3730-3735.

56. Eefting, M. Intentional donor lymphocyte induced limited acute graft versus host disease is essential for long-term survival of relapsed acute myeloid leukemia after allogeneic stem cell transplantation / M.Eefting, P.A.Von dem Borne, L.C.DeWreede, C.J.Halkes, S.Kersting, E.W.Marijt, H.Veelken, J.H.Falkenburg // *Haematologica*. - 2013. - №15. - P. 568-573.

57. El-Cheikh, J. Long-Term Outcome of Second Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation as Salvage Therapy for Young Patients after Relapse or Graft Failure: Experience at a Single Institution / J.El-Cheikh, R.Crocchiolo, A.Vazquez, P.Ladaique, J.M.Boher, S.Furst, L.Castagna et al. // *J Transplant Technol. Res.* – 2012. – Vol. 2. - P. 1-5.

58. Farag, S.S. Natural killer cell receptors: new biology and insights into the graft-versus-leukemia effect/ S.S.Farag, T.A.Fehniger, L.Ruggeri, A.Velardi, M.A.Caligiuri // *Blood*. – 2002. – Vol. 100.- №6.- P. 1935-1947.

59. Ferrara, J.L. Pathophysiologic mechanisms of acute graft-vs.-host disease/ J.L.Ferrara, R.Levy, N.J.Chao // *Biol Blood Marrow Transplant.* – 1999. - Vol. 5. - P. 347-356.

60. Ford, C. Cytological identification of radiation-chimeras / C.Ford, J.Hamerton, D.Barnes, J.Loutit // *Nature*. – 1956. – Vol. 177. - P. 452-454.
61. Formankova, R. Adoptive immunotherapy, chemotherapy, and second allogeneic transplant in the treatment of post-transplant relapse of acute leukemia in children: a single center experience/ R.Formankova, P.Sedlacek, P.Keslova et al. // *Leuk. Lymphoma*. – 2010. - Vol. 51. - №10. – P. 1936–1940.
62. Garland, P. Dasatinib may not suppress the GVL effect of donor lymphocyte infusions for CML / P.Garland, F.Dazzi, D.Marin // *Bone Marrow Transplant*. – 2010. – Vol. 45. – P. 395–396.
63. George, P. M. Pharmacology and therapeutic potential of interferons / P.M.George, R.Badiger, W.Alazawi, G.R.Foster, J.A.Mitchell // *Pharmacology & Therapeutics*. - 2012; 135 (1): P. 44–53.
64. Giebel, S. Survival advantage with KIR ligand incompatibility in hematopoietic stem cell transplantation from unrelated donors / S.Giebel, F.Locatelli, T.Lamparelli, A.Velardi, S.Davies, G.Frumento, R.Maccario, F.Bonetti, J.Wojnar, M.Martinetti, F.Frassoni, G.Giorgiani, A.Bacigalupo, J.Holowiecki // *Blood*. - 2003. - №102.- P. 814–819.
65. Guillaume, T. Escalated lymphodepletion followed by donor lymphocyte infusion can induce a graft-versus-host response without overwhelming toxicity/ T.Guillaume, B.Gaugler, P.Chevallier, J.Delaunay, S.Ayari, A.Clavert et al. // *Bone Marrow Transplant*. - 2012– Vol. 47.- №8. - P. 1112-1117.
66. Giralt, S.A. Recurrence of the underlying malignant disease. *Clinical Bone Marrow and Blood Stem Cell Transplantation*. 2nd edn. / S.A.Giralt, R.E.Champlin, In Atkinson K (ed.). // Cambridge: Cambridge University Press, 2000. - P. 878-888.
67. Glucksberg, H. Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors / H.Glucksberg, R.Storb, A.Fefer, C.D.Buckner, P.E.Neiman, R.A.Clift, K.G.Lerner, E.D.Thomas // *Transplantation*. – 1974. – Vol. 4. - № 18. – P. 295-304.
68. Goker, H. Acute graft-vs-host disease: pathobiology and management/

H.Goker, I.C.Haznedaroglu, N.J.Chao // *Exp Hematol.* – 2001 - Vol. 29, P.259-277. 15

69. Gorin, N.C. Retrospective evaluation of autologous bone marrow transplantation vs allogeneic bone marrow transplantation from an HLA identical related donor in acute myelocytic leukemia. A study of the European Cooperative Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT) / N.C. Gorin, M. Labopin, L. Fouillard, G. Meloni, F. Frassoni, A. Iriondo, S. Brunet Mauri, A.H. Goldstone, J.L. Harousseau, J. Reiffers, H. Esperou-Bourdeau, E. Gluckman // *Bone Marrow Transplant.* - 1996. – Vol. 18. -№1.- P. 111-117.

70. Goldman, J.M. Bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia in chronic phase. Increased risk for relapse associated with T-cell depletion/ J.M.Goldman, R.P.Gale, M.M.Horowitz et al. // *Annals of Internal Medicine.* – 1988. – Vol. 108. – P. 806-814.

71. Gratwohl, A. Cause of death after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation (HSCT) in early leukaemias: an EBMT analysis of lethal infectious complications and changes over calendar time / A.Gratwohl, R.Brand, F.Frassoni, V.Rocha, D.Niederwieser, P.Reusser, H.Einsele, C.Cordonnier // *Bone Marrow Transplant.* – 2005. – №36. - P. 757-769.

72. Gratwohl, A. History of hematopoietic stem cell transplantation: evolution and perspectives / A. Gratwohl, D. Niederwieser // *Curr. Probl. Dermatol.* – 2012. – Vol. 43. – P. 81-90.

73. Hoffmann, P. Donor-type CD4(+)CD25(+) regulatory T cells suppress lethal acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation / P. Hoffmann, J. Ermann, M. Edinger, C.G. Fathman, S. Strober // *J Exp Med.* – 2002. – Vol. 196. - № 3. - P. 389-99.

74. Horowitz, M. Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation/ M.Horowitz, R.P.Gale, P.M.Sondel, M.J.Goldman, J.Kersey, H.J.Barreb et al. // *Blood.* – 1990. – Vol. 75. - № 3. - P. 555- 562.

75. Huang, X.J. Administration of short-term immunosuppressive agents after DLI reduces the incidence of DLI-associated acute GVHD without influencing the GVL

effect / X.J.Huang, Y.Wang, D.H.Liu et al. // *Bone Marrow Transplant.* – 2009. – Vol. 44. - P. 309-316.

76. Inamoto, Y. A Phase I/II Study of Chemotherapy Followed by Donor Lymphocyte Infusion plus Interleukin-2 for Relapsed Acute Leukemia after Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation / Y. Inamoto, A.Fefer, B.M.Sandmaier et al. // *Biol. Blood Marrow Transplant.* – 2011. – Vol. 17. – P. 1308-1315.

77. Jakóbsiak, M. Genetic modification of T cells improves the effectiveness of adoptive tumor immunotherapy / M.Jakóbsiak, J.Gołąb et al. // *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* - 2010. – Vol.58 - №5. - P. 347-354.

78. Joshi, S.S. Immunological and clinical effects of post-transplant G-CSF versus placebo in T-cell replete allogeneic blood transplant patients: results from a randomized double-blind study / S.S.Joshi, M.R.Bishop, J.C.Lynch, S.R.Tarantolo, S.Abhyankar, P.J.Bierman, J.M.Vose, R.B.Geller, J.McGuirk, J.Foran, R.G.Bociek, A.Hadi, S.D.Day, J.O.Armitage, A.Kessinger, Z.S.Pavletic // *Cytherapy.* – 2003. – Vol. 5. - №6. - P. 542-552.

79. Klyuchnikov, E. Purification of CD4+ T cells for adoptive immunotherapy after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation / E.Klyuchnikov, A.Sputtek, O.Slesarchuk et al. // *Biol. Blood Marrow Transplant.* – 2011. – Vol. 17. - №3. – P. 374-383.

80. Kolb, H.J. Donor leukocyte transfusions for treatment of recurrent chronic myelogenous leukemia in marrow transplant patients / H.J.Kolb, J.Mittermuller, C.Clemm, E.Holler, G.Ledderose, G.Brehm et al. // *Blood.* – 1990. – Vol. 76. - №12. - P. 2462-2465.

81. Kolb, H. Graft-versus-leukemia effect of donor lymphocyte transfusions in marrow grafted patients / H.Kolb, A.Schattenberg, J.Goldman, B.Hertenstein, N.Jacobsen, W.Arcese et al. // *Blood.* - 1995. - Vol. 86. - P. 2041–2050.

82. Kolb, H.J. Graft-versus-leukemia effects of transplantation and donor lymphocytes / H.J.Kolb // *Blood.* – 2008. – Vol. 112. - №12. – P. 4371-4383.

83. Koreth, J. Current and future approaches for control of graft-versus-host

disease / J.Koreth, J.H.Antin // *Expert Rev Hematol.* – 2008. - Vol. 1.- № 1. - P.111.

84. Kroger, N. Approaches to relapse after allogeneic stem cell transplantation / N. Kroger // *Current Opinion in Oncology.* – 2011. – Vol. 23. – P. 203–208.

85. Levine, J. Prospective trial of chemotherapy and donor leukocyte infusions for relapse of advanced myeloid malignancies after allogeneic stem cell transplantation / J.Levine, T.Braun, S.Penza, P.Beatty, K.Cornetta, R.Martino et al. // *J Clin Oncol.* – 2002. – Vol. 20. - P. 405–412.

86. Li, Q. Decrease of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells and TGF-beta at early immune reconstitution is associated to the onset and severity of graft-versus-host disease following allogeneic haematogenesis stem cell transplantation / Q. Li , Z. Zhai, X. Xu , Y. Shen , A. Zhang , Z. Sun et al. // *Leuk Res.* – 2010. - Vol. 34. - № 9. P. 1158-68.

87. Loren, A.W. Donor leukocyte infusions for the treatment of relapsed acute leukemia after allogeneic stem cell transplantation / A.W.Loren, D.L.Porter // *Bone Marrow Transplantation.* – 2008. – Vol. 41.- №5. - P. 483–493.

88. Lowy I. Between bench and bedside: science, healing, interleukin -2 in a cancer ward / I.Lowy // *Library of Congress,US.* - 1996, - P. 360-365.

89. Lubbert, M. Efficacy of a 3-day, low-dose treatment with 5-azacytidine followed by donor lymphocyte infusions in older patients with acute myeloid leukemia or chronic myelomonocytic leukemia relapsed after allografting / M.Lubbert, H.Bertz, R.Wasch // *Bone Marrow Transplant.* – 2010. – Vol. 45. – P. 627–632.

90. Lutz, C. A pilot study of prophylactic donor lymphocyte infusions to prevent relapse in adult acute lymphoblastic leukemias after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation / C.Lutz, G.Massenkeil, M.Nagy, S.Neuburger, I.Tamm, O. Rosen et al. // *Bone Marrow Transplant.* – 2008. – Vol. 41. -№9. - P. 805-812.

91. Mackall, C.L. Enhancing immune reconstitution after stem cell transplants with cytokines / C.L.Mackall // *Cytotherapy.* – 2002. - Vol. 4. - №5. - P. 427-428.

92. Mackinnon, S. Adoptive immunotherapy evaluating escalating doses of donor leukocytes for relapse of chronic myeloid leukemia after bone marrow



transplantation: separation of graft-versus-leukemia responses from graft-versus-host disease / S.Mackinnon, E.B.Papadopoulos, M.H.Carabasi, L.Reich, N.H.Collins, F.Boulad et al. // *Blood*. – 1995.– Vol. 86. -№4.- P. 1261–1268.

93. Mackinnon, S. Donor leukocytes infusions / S.Mackinnon // *Baillieres Clinical Haematology*. – 1997. - Vol. 10. - P. 357–367.

94. Madrigal, J.A. Immunogenetic factors in donors and patients that affect the outcome of hematopoietic stem cell transplantation / J.A.Madrigal, B.E.Shaw // *Blood Cell Mol. Dis*. – 2008. – Vol. 40. - № 1. – P. 40-43.

95. Mandigers, C.M. Graft-versus-lymphoma effect of donor lymphocyte infusion in indolent lymphomas relapsed after allogeneic stem cell transplantation / C.M.Mandigers, L.F.Verdonck, J.P.Meijerink, A.W.Dekker, A.V.Schattenberg, J.M.Raemaekers // *Bone Marrow Transplant*. – 2003. – Vol. 32. - №12. - P. 1159–1163.

96. Mendeleeva, L. Effect of donor lymphocyte infusion in aplasia after reinduction chemotherapy for leukaemia relapse after allo-SCT / L.Mendeleeva, R.Bogdanov, L.Lubimova, L.Kuzmina, E.Zhelnova, E.Parovichnicova et al. // *Bone marrow transplantation*. – 2011.– Vol. 46. № 1. - P. 675.

97. Mendeleeva, L. Donor lymphocyte infusions in aplasia after reinduction chemotherapy for acute leukaemia relapse after allogeneic stem cell transplantation / L.Mendeleeva, L.Lubimova, I.Demidova, E.Zhelnova, Y.Olshanskaja, E.Parovichnikova, V.Savchenko // *Bone Marrow Transpl*. - 2008; Vol. 39. - P.174, abstr P.647.

98. Miller, J.S. Lymphodepletion followed by donor lymphocyte infusion (DLI) causes significantly more acute graft-versus-host disease than DLI alone / J.S.Miller, D.J.Weisdorf, L.J.Burns, A.Slungaard, J.E.Wagner, M.R.Verneris et al. // *Blood*. – 2007.– Vol. 110. - №7. - P. 2761-2763.

99. Moravcova, J. Molecular monitoring of responses to DLI and DLI + IFN treatment of post-SCT relapses in patients with CML / J.Moravcova, S.Nadvornikova, V.Zmekova et al. // *Leukemia Research*. – 2003. – Vol. 27. – P. 719–729.

100. Morris, E. Outcomes after alemtuzumab-containing reduced-intensity

allogeneic transplantation regimen for relapsed and refractory non-Hodgkin lymphoma / E.Morris, K.Thomson, C.Craddock et al. // *Blood*. – 2004. – Vol. 104. - №13. – P. 3865–3871.

101. Murata, M. Donor cell leukemia after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation: a case report and literature review / M.Murata, Y.Ishikawa, H.Ohashi et al. // *Int J Hematol*. - 2008– Vol. 88. - №1. - P. 111–115.

102. Montefusco, V. Bortezomib Plus Dexamethasone Followed by Escalating Donor Lymphocyte Infusions for Patients with Multiple Myeloma Relapsing or Progressing after Allogeneic Stem Cell Transplantation/ V.Montefusco, F.Spina, F.Patriarca et al. // *Biol Blood Marrow Transplant*. – 2013. – Vol. 19.- №3. - P. 424-428.

103. Nadal, E. Adjuvant interleukin-2 therapy for patients refractory to donor lymphocyte infusions / E.Nadal, A.Fowler, E.Kanfer, J.Apperley, J.Goldman, F.Dazzi // *Exp. Hematol*. - 2004. – Vol. 32. - №2.- P. 218-223.

104. Naparstek, E. T-cell-depleted allogeneic bone marrow transplantation for acute leukaemia using Campath-1 anti- bodies and post-transplant administration of donor's peripheral blood lymphocytes for prevention of relapse/ E.Naparstek, R.Or, A.Nagler, G.Cividalli, D.Engelhard, M.Aker et al. // *Br J Haematol*. – 1995. – Vol. 89. - №3. - P. 506-515.

105. Neave, E.L. Lymphodepletion chemotherapy followed by donor leukocytes for post-transplantation relapse of myelofibrosis after previous donor leukocyte infusion failure / E.L.Neave, H.Schwarb, A.Shlebak, D.M.Layton, J.F.Apperley, J.Pavlu // *Eur. J. Haematol*. – 2013. – Vol. 90. -№1. - P. 76-78.

106. Nguyen, S. Infusion of allogeneic natural killer cells in a patient with acute myeloid leukemia in relapse after haploidentical hematopoietic stem cell transplantation / S.Nguyen, V.Béziat, F.Norol // *Transfusion*. - 2011. – Vol. 51. -№8. - P. 1769-1778

107. Orti, G. Phase I study of high-stringency CD8-depletion of donor leukocyte infusions after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation / G.Orti, M.Lowdell, A.Fielding et al. // *Transplantation*. - 2009. – Vol. 88. - №11. -P. 1312-1318.

108. Palmer, J.M. Clinical relevance of natural killer cells following hematopoietic stem cell transplantation / J.M.Palmer, K.Rajasekaran, M.S.Thakar, S.Malarkannan // *J Cancer*. – 2013. – Vol. 4. - №1. - P. 25-35.

109. Parkman, R. Immunological reconstitution following haematopoietic stem cell transplantation / K. Weinberg, E.D. Thomas, K. Blume, S. Forman // *Haemotopoietic cell transplantation*. – 1999. – Vol. 60. - P. 704-711

110. Pasquini, M.C. Current use and outcome of hematopoietic stem cell transplantation: CIBMTR Summary Slides / M.C.Pasquini, Z.Wang // *Newsletter (serial online)*. - 2012. – Vol. 15. - №1. - P. 18.

111. Passweg, J.R. The EBMT activity survey: 1990—2010 / J.R.Passweg, H. Baldomero, A.Gratwoh, M.Bregni, S.Cesaro, P.Dreger et al. // *Bone Marrow Transplantation*. – 2012. - Vol. 47. - №7. – P. 906-923.

112. Pavletic, Z.S. Lymphocyte reconstitution after allogeneic blood stem cell transplantation for hematologic malignancies / Z.S.Pavletic, S.S.Joshi, S.J.Pirruccello, S.R.Tarantolo, J.Kollath, E.C.Reed, P.J.Bierman, J.M.Vose, P.I.Warkentin, T.G.Gross, K.Nasrati, J.O.Armitage, A.Kessinger, M.R.Bishop // *Bone Marrow Transplant*. – 1998. – Vol. 21. -№1. - P. 33-41.

113. Pavletic, S.Z. NCI first international workshop on the biology, prevention, and treatment of relapse after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: report from the Committee on the epidemiology and natural history of relapse following allogeneic cell transplantation / S.Z.Pavletic, S.Kumar, M.Mohty et al. // *Biol. Bllood Marrow Transplant*. – 2010. – Vol. 16. – P. 871-890.

114. Peggs, K.S. Reduced-intensity conditioning for allogeneic haematopoietic stem cell transplantation in relapsed and refractory Hodgkin lymphoma: impact of alemtuzumab and donor lymphocyte infusions on long-term outcomes/ K.S.Peggs, A.Sureda, W.Qian, D.Caballero, A.Hunter, A.Urbano-Ispizua et al. // *Br J Haematol*. - 2007– Vol. 139. - №1. - P. 70–80.

115. Pollyea, D.A. Outcomes of patients with AML and MDS who relapse or progress after reduced intensity allogeneic hematopoietic cell transplantation /

D.A.Pollyea, A.S.Artz, W.Stock, C.Daugherty, L.Godley, O.M.Odenike et al. // Bone Marrow Transplant. - 2007– Vol. 40. -№11. - P. 1027-1032.

116. Porter, D.L. Induction of graft-versus-host disease as immunotherapy for relapsed chronic myeloid leukemia/ D.L.Porter, M.S.Roth, C.McGarigle et al. // N. Engl. J. Med. – 1994. – Vol. 330. – P. 100-106.

117. Posthuma, E.F.  $\alpha$ -Interferon with Very-Low-Dose Donor Lymphocyte Infusion for Hematologic or Cytogenetic Relapse of Chronic Myeloid Leukemia Induces Rapid and Durable Complete Remissions and Is Associated with Acceptable Graft-versus-Host Disease / E.F.Posthuma, E.W.Marijt, R.M.Barge et al. // Biology of Blood and Marrow Transplantation. – 2004. – Vol. 10. – P. 204-212.

118. Powles, R. Identification of patients who may benefit from prophylactic immunotherapy after bone marrow transplantation for acute myeloid leukemia on the basis of lymphocyte recovery early after transplantation / R.Powles, S.Singhal, J.Treleaven, S.Kulkarni, C.Horton, J.Mehta. // Blood. - 1998– Vol. 91. -№9. - P. 3481-3486.

119. Pulsipher, M.A. Successful treatment of JMML relapsed after unrelated allogeneic transplant with cytoreduction followed by DLI and interferon-alpha: evidence for a graft-versus-leukemia effect in non-monosomy-7 JMML / M.A.Pulsipher, R.H.Adams, J.Asch et al. // Bone Marrow Transplant. – 2004. – Vol. 33. – P. 113–115.

120. Raiola, A.M. Factors predicting response and graft-versus-host disease after donor lymphocyte infusions: a study on 593 infusions / A.M.Raiola, M.T.Van Lint, M.Valbonesi, T.Lamparelli, F.Gualandi, D.Occhini et al. // Bone Marrow Transplantation. - 2003– Vol. 31. -№8. - P. 687-693.

121. Rettinger, E. Preemptive immunotherapy in childhood acute myeloid leukemia for patients showing evidence of mixed chimerism after allogeneic stem cell transplantation / E.Rettinger, A.M.Willasch, H.Kreyenberg et al. // Blood. – 2011. – Vol. 118. - №20. – P. 5681-5688.

122. Rezvani, K. Characterizing and optimizing immune responses to leukemia

antigens after allogeneic stem cell transplantation / K.Rezvani, A.J.Barrett // *Best Pract Res ClinHaematol.* – 2008.– Vol.21. -№3. - P. 437–453.

123. Rezvani, K. Posttransplantation vaccination: concepts today and on the horizon / K.Rezvani // *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* - 2011– Vol. 11.- P. 299-304.

124. Riddell, S.R. Minor histocompatibility antigens-targets of graft versus leukemia responses / S.R.Riddell, M.Murata, S.Bryant, E.H.Warren // *Int J Hematol.* - 2002 – Vol.76. -№ 2. - P. 155-161.

125. Rossi, G. Minimal residual disease after allogeneic stem cell transplant: a comparison among multiparametric flow cytometry, Wilms tumor 1 expression and chimerism status (Complete chimerism versus Low Level Mixed Chimerism) in acute leukemia / G.Rossi, A.M.Carella, M.M.Minervini, L.Savino, A.Fontana, F.Pellegrini, M.M.Greco, E.Merla, G.Quarta, G.Loseto, S.Capalbo, G.Palumbo, N.Cascavilla // *Leukemia s Lymphoma.* – 2013. – Vol. 54. -№12.- P. 2660-2666.

126. Rubnitz, J.E. NKAML: a pilot study to determine the safety and feasibility of haploidentical natural killer cell transplantation in childhood acute myeloid leukemia / J.E.Rubnitz, H.Inaba, R.C.Ribeiro et al. // *J Clin Oncol.* – 2010.– Vol. 28.- №6. - P. 955-959.

127. Ruiz-Arguelles, G.J. Donor cell leukemia: a critical review / G.J.Ruiz-Arguelles, A.Ruiz-Arguelles, J.Garces-Eisele // *Leuk Lymphoma.* - 2007.– Vol. 48. - №1. - P. 25–38.

128. Sangiolo, D. Cytokine induced killer cells as adoptive immunotherapy strategy to augment graft versus tumor after hematopoietic cell transplantation / D.Sangiolo, G.Mesiano, F.Carnevale-Schianca, W.Piacibello, M.Aglietta, A.Cignetti // *Expert Opin Biol Ther.* – 2009.– Vol.9.- №7.- P. 831-840.

129. Sanna, M. Daunorubicin, cytarabine, and cladribine regimen plus radiotherapy and donor lymphocyte infusion for extramedullary relapse of acute myeloid leukemia after hematopoietic stem cell transplantation / M.Sanna, G.Caocci, A.Vacca, E.Piras, F.Orrù, G.La Nasa // *Case Rep Hematol.* – 2013 - Vol. 21.- P. 261-

270.

130. Savani, B.N. Management of relapse after allo-SCT for AML and the role of second transplantation / B.N. Savani, S. Mielke, N. Reddy, S. Goodman, M. Jagasia, K. Rezvani // *Bone Marrow Transplantation*. - 2009– Vol. 44. - №12. - P. 769-777.

131. Savchenko, V.G. Donor leukocyte infusion (DLI) in the treatment of AML patients relapsed after allogeneic bone marrow transplantation / V.G. Savchenko, L.P. Mendeleeva, L.S. Lubimova, E.N. Parovichnikova. // *Acute Leukemias V*. - 1996– Vol. 6.- P. 383-385.

132. Schlaak, M. Donor lymphocyte infusions combined with systemic PUVA/bexarotene as an effective bimodal immunologic approach in a patient with relapsed cutaneous T cell lymphoma after allogeneic stem cell transplantation / M.Schlaak, P.Kurschat, A.Shimabukuro-Vornhagen et al. // *Transpl. Immunol.* – 2011. - Vol. 25. – P. 163-166.

133. Schmid, C. Donor lymphocyte infusion in the treatment of first hematological relapse after allogeneic stem-cell transplantation in adults with acute myeloid leukemia: a retrospective risk factors analysis and comparison with other strategies by the EBMT Acute Leukemia Working Party / C.Schmid , M.Labopin, A.Nagler et al. // *J. Clin. Oncol.* – 2007. – Vol. 25. – P. 4938–4945.

134. Schmid, C. Low-dose ARAC, donor cells, and GM-CSF for treatment of recurrent acute myeloid leukemia after allogeneic stem cell transplantation / C.Schmid, M.Schleuning, J.Aschan, O.Ringdén, J.Hahn, E.Holler et al. // *Leukemia*. - 2004– Vol. 18. - №8.- P. 1430–1433.

135. Schmid, C. Sequential regimen of chemotherapy, reduced-intensity conditioning for allogeneic stem-cell transplantation, and prophylactic donor lymphocyte transfusion in high-risk acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome / C.Schmid, M.Schleuning, G.Ledderose et al. // *J. Clin. Oncol.* – 2005. – Vol. 23. - № 24. – P. 5675–5687.

136. Schmid, C. Long term survival in refractory acute myeloid leukemia after sequential treatment with chemotherapy and reduced intensity conditioning for

allogeneic stem cell transplantation / C.Schmid, M.Schleuning, R.Schwerdtfeger et al. // *Blood*. – 2006. – Vol. 108. – P. 1092-1099.

137. Schwartz, J. Novel targeted and immunotherapeutic strategies in chronic myeloid leukemia / J.Schwartz, R.R.Pinilla-Ibarz, D.A.Scheinberg // *Semin. Hematol.* – 2003. – Vol. 40. – P. 87-96.

138. Shaw, B.E. Outcome of second allogeneic transplants using reduced intensity conditioning following relapse of haematological malignancy after an initial allogeneic transplant / B.E.Shaw, G.J.Mufti, S.Mackinnon et al. // *Bone Marrow Transplant.* - 2008– Vol. 42. -№12. - P. 783–789.

139. Shaw, B.E. Treatment options for the management of acute leukaemia relapsing following an allogeneic transplant / B.E.Shaw, N.H.Russell // *Bone Marrow Transplantation* – 2008. - Vol. 41. - P. 495–503.

140. Sica, S. Aggressive chemotherapy for acute leukemia relapsed after transplantation / S.Sica, P.Salutari, A.Di-Mario, G.D'onofrio, B.Etuk, G.Leone // *Leuk. Lymphoma.* - 1994– Vol.15. -№2. - P. 131-134.

141. Simula, M.P. Response to donor lymphocyte infusions for chronic myeloid leukemia is dose-dependent: the importance of escalating the cell dose to maximize therapeutic efficacy/ M.P.Simula, S.Marketel, C.Fozza et al. // *Leukemia.* - 2007. – Vol. 21. – P. 943–948.

142. Slavin, S. Current problems and future goals in clinical bone marrow transplantation / S.Slavin, E.Kedar // *Blood Rev* – 1988. – Vol.2. - №4. – P. 259-269.

143. Slavin, S. Cellular mediated immunotherapy of leukemia in conjunction with autologous and allogeneic bone marrow transplantation in experimental animals and man / S.Slavin, R.Or, E.Naparstek, A.Ackerstein, L.Weiss // *Blood.* - 1988. – Vol. 72 (suppl. 1). – P. 407a.

144. Slavin, S. Allogeneic cell therapy with donor peripheral blood cells and recombinant human interleukin-2 to treat leukemia relapse post allogeneic bone marrow transplantation / S.Slavin, E.Naparstek, A.Nagler et al. // *Blood.* – 1996. – Vol. 87. – P. 2195-2204.

145. Slavin, S. Donor lymphocyte infusion: The use alloreactive and tumor-reactive lymphocytes for immunotherapy of malignant and nonmalignant diseases in conjunction with allogeneic stem cell transplantation / S.Slavin, S.Morecki, L.Weiss et al. // *J. Hematother. Stem Cell Res.* – 2002. – Vol. 11. – P. 265–276.

146. Slavin, S. Treatment of leukemia by alloreactive lymphocytes and nonmyeloablative stem cell transplantation / S.Slavin, A.Nagler, M.Y.Shapira et al. // *J. Clin. Immunol.* – 2002. – Vol. 2. – P. 64–69.

147. Spinelli, O. Clearance of minimal residual disease after allogeneic stem cell transplantation and the prediction of the clinical outcome of adult patients with high-risk acute lymphoblastic leukemia / O. Spinelli, B. Peruta, M. Tosi, V. Guerini, A. Salvi, M.C. Zanotti, E. Oldani, A. Grassi, T. Intermesoli, C. Micò, G. Rossi, P. Fabris, G. Lambertenghi-Deliliers, E. Angelucci, T. Barbui, R. Bassan, A. Rambaldi // *Haematologica.* - 2007. – Vol. 92 – №5. – P. 612-618.

148. Spirydonidis, A. A long road of T-cells to cure cancer: from adoptive immunotherapy with unspecific cellular products to donor lymphocyte infusions and transfer of engineered tumor-specific T-cells / A. Spirydonidis, M. Liga // *N. Engl. J. Med.* – 2009. – №19. – P. 768–773.

149. Symons, H.J. Hematopoietic SCT from partially HLA-mismatched (HLA-haploidentical) related donors / H.J. Symons, E.J. Fuchs // *Bone Marrow Transplant.* – 2008. – Vol. 42. - P. 365-377.

150. Tiribelli, M. Nilotinib and donor lymphocyte infusion in the treatment of Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia (Ph+ ALL) relapsing after allogeneic stem cell transplantation and resistant to imatinib / M. Tiribelli, A. Sperotto, A. Candoni et al. // *Leukemia Research.* – 2009. – Vol. 33. – P. 174–177.

151. Tomblyn, M. Donor lymphocyte infusions. The long and winding road: how should it be traveled? / M. Tomblyn, H.M. Lazarus // *Bone Marrow Transplant.* – 2008. – Vol. 42. – P. 569-579.

152. Wrzesinski, C. Increased intensity lymphodepletion enhances tumor treatment efficacy of adoptively transferred tumor-specific T cells / C. Wrzesinski,



C.M. Paulos, A. Kaiser, P.Muranski, D.C. Palmer, L. Gattinoni, Z. Yu, S.A. Rosenberg, N.P. Restifo // *J Immunother.* - 2010. –Vol. 33. – №1. – P. 1-7.

153. Van de Donk, N.W. Prognostic factors for donor lymphocyte infusions following non-myeloablative allogeneic stem cell transplantation in multiple myeloma / N.W. Van de Donk, N. Kroger, U. Hegenbart, P. Corradini, J.F. San Miguel, H. Goldschmidt et al. // *Bone Marrow Transplant.* – 2006. – Vol. 37. - № 12. – P. 1135–1141.

154. Vago, L. Loss of Mismatched HLA in Leukemia after Stem-Cell Transplantation / L. Vago et al. // *N Engl J Med.* – 2009. – Vol. 361. – P. 478- 488

155. Vestal, D.J. Pharmacology of interferons: Induced proteins, cell activation and antitumor activity. *Cancer chemother. and biother* / D.J.Vestal, T.Yi, C.Borden // Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. - 2001, P. 752-778.

156. Warren, E.H. Dissecting graft-versus-leukemia from graft-versus-host-disease using novel strategies / E.H.Warren, H.J.Deeg // *Tissue Antigens.* – 2013. – Vol. 81. – № 4. – P. 183-193.

157. Weiden, P.L. Antileukemic effect of graft-versus-host disease in human recipients of allogeneic marrow grafts / P.L.Weiden, N.Flournoy, E.D.Thomas et al. // *N. Engl. J. Med.* – 1979. – Vol. 300. - №19. – P. 1068–1073.

158. Withrow, S.J. *Small animal clinic oncology* / S.J.Withrow, E.G.MacEwen // Saunders Elsevier, Us, - 2007. – P. 846.

159. Xia, G. Graft-versus-leukemia and graft-versus-host reactions after donor lymphocyte infusion are initiated by host-type antigen-presenting cells and regulated by regulatory T cells in early and long-term chimeras / G.Xia, R.L.Trutt, B.D.Johnson // *Biol Blood Marrow Transplant.* - 2006. - Vol. 12. – № 4. – P. 397-407.

160. Yegin, Z.A. Donor lymphocyte infusion for leukemia relapse after hematopoietic stem cell transplantation / Z.A.Yegin, Z.N.Ozkurt, S.Z.Aki, G.T.Sucak // *Transfusion and Apheresis Science.* – 2010. – Vol.42 – № 3 – P. 239-45.

161. Yoshimitsu, M. Case of a patient with Philadelphia-chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia relapsed after myeloablative allogeneic hematopoietic

stem cell transplantation treated successfully with imatinib and sequential donor lymphocyte infusions / M.Yoshimitsu, H.Fujiwara, A.Ozaki et al. // *Int. J. Hematol.* – 2008. – Vol. 88. – P. 331–335.

162. Yan, C.H. Risk stratification-directed donor lymphocyte infusion could reduce relapse of standard-risk acute leukemia patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation / C.H.Yan, D.H.Liu, K.Y.Liu et al. // *Blood.* – 2012. – Vol. 19. - № 14. – P. 3256-3262.

163. Zorn, E, Combined CD4+ donor lymphocyte infusion and low-dose recombinant IL-2 expand FOXP3+ regulatory T cells following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation / E. Zorn, M. Mohseni, H. Kim, F. Porcheray, A. Lynch, R. Bellucci, C. Canning, E.P. Alyea, R.J. Soiffer, J. Ritz // *Biol Blood Marrow Transplant.* – 2009. – Vol. 15. – № 3. – P. 382-388.

## Приложение 1

**Таблица 19. Схемы и эффективность адоптивной иммунотерапии первого и второго посттрансплантационного рецидива ОМЛ**

N боль ного	Адоптивная иммунотерапия посттрансплантационных рецидивов					
	Первый эпизод		Повторный эпизод			
	Схема адоптивной иммунотерапии	Продолжительность эффекта, месяцы	Схема адоптивной иммунотерапии	Количество CD3 <sup>+</sup> клеток, x10 <sup>7</sup> клеток/кг		Достижение ремиссии с полным донорским химеризмом
За одну ТЛД				Суммарная доза		
1	ТЛД на фоне рецидива без предшествующей ХТ	30	ТЛД на фоне ремиссии после предшествующей ХТ	9	18	Да, через 3 месяца очередной рецидив
2	ТЛД на фоне рецидива без предшествующей ХТ	2		10	38	Да, через 26 месяцев очередной рецидив
3	ТЛД на фоне ремиссии после предшествующей ХТ	4		11	41	Без эффекта, прогрессия
4	ТЛД на фоне ремиссии после предшествующей ХТ	2	ТЛД в период миелотоксического агранулоцитоза после ХТ	9,5	38	Да, жив в полной ремиссии 127 месяцев
5	ТЛД в период миелотоксического агранулоцитоза после ХТ	10		5	16	Да, жив в полной ремиссии 3 месяца
6	ТЛД в период миелотоксического агранулоцитоза после ХТ	14		1	1	Да, жив в полной ремиссии 2 месяца

**Таблица 29. Частота РТПХ в зависимости от включения химиотерапии в схему адоптивной иммунотерапии при посттрансплантационном рецидиве гемобластоза**

Схема адоптивной иммунотерапии		Число больных	Частота достижения ремиссии с полным донорским химеризмом	Длительность эффекта, месяцы	Частота РТПХ						
					Острая РТПХ		Хроническая РТПХ				
Монотерапия ТЛД (+/- ИЛ-2)		15	5 (33%)*	30 (2 -162)	3 (20%)		3 (20%)				
ТЛД после курса ХТ (+ИЛ-2)	ТЛД после неэффективной ХТ	2	20 (69%)*	Нет эффекта	13 (45%)	Нет эффекта		10 (34%)	Нет эффекта		
	ТЛД в ремиссии после ХТ	4		4 (100%)		3,5 (2 – 52)	1 (25%)			1 (25%)	
	ТЛД в период миелотоксического агранулоцитоза	23		16 (70 %)		7 (2-76)	12 (52%)			9 (39%)	
<b>Всего</b>		<b>44</b>	<b>25 (57%)</b>	<b>8 (2-162)</b>	<b>16 (36%)</b>		<b>13 (30%)</b>				

\* - p = 0,03