

## ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2013

УДК 616.41-006-085.38.015.2:615.361.4-013.3]-07

### 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

ФГБУ Гематологический научный центр Минздрава России, Москва

**Резюме.** Цель работы — оценка эффективности трансфузий лимфоцитов донора (ТЛД) после трансплантации аллогенных гемопоэтических клеток (алло-ТГСК), а также исследование субпопуляции Т-лимфоцитов в периферической крови у больных гемобластозами после алло-ТГСК на фоне ТЛД. В исследование включены 15 больных гемобластозами после алло-ТГСК. Показаниями для ТЛД были посттрансплантационный рецидив или несостоятельность миелотрансплантата. Лимфоциты донора (в дозе  $1 \cdot 10^7$  CD3<sup>+</sup>-клеток/кг с последующей эскалацией) переливали 1—5 раз, каждая ТЛД сопровождалась введением интерлейкина-2. Исследование субпопуляций Т-лимфоцитов периферической крови осуществляли методом иммунофенотипирования с проточной цитофлуориметрией. Ремиссия со 100% донорским химеризмом достигнута у 56% больных. Частота острой и хронической реакции трансплантат против хозяина (РТПХ) составила 31%. Наличие хронической РТПХ ассоциировалось с длительным полным ответом на лечение. Результаты оценки субпопуляций Т-лимфоцитов позволили охарактеризовать изменения их содержания в зависимости от фазы заболевания и степени ответа на проводимую адаптивную иммунотерапию.

**Ключевые слова:** трансплантация аллогенных гемопоэтических стволовых клеток; трансфузии лимфоцитов донора; интерлейкин-2; субпопуляции Т-лимфоцитов; выживаемость.

### PERIPHERAL BLOOD T-LYMPHOCYTE SUBPOPULATIONS IN PATIENTS WITH HEMATOLOGICAL MALIGNANCIES TREATED WITH DONOR LYMPHOCYTE INFUSIONS AFTER TRANSPLANTATION OF ALLOGENIC HEMOPOIETIC STEM CELLS

L.P.Mendeleva, R.F.Bogdanov, I.V.Galtseva, L.A.Kuzmina, T.V.Gaponova, E.G.Gemdzhyan, T.N.Obukhova, N.V.Risinskaya,  
N.N.Kalinin, E.N.Parovichnikova, V.G.Savchenko

Hematological Center, Moscow, Russia

**Summary.** The efficiency of donor lymphocyte infusions (DLI) after allogenic hemopoietic stem cells transplantation (allo-HSCT) was evaluated and peripheral blood T-lymphocyte subpopulations were studied in patients with hematological malignancies receiving DLI after allo-HSCT. The study was carried out in 15 patients with hematological malignancies after allo-HSCT. Indications for DLI were posttransplantation relapses or the transplant incompetence. Donor lymphocytes ( $1 \times 10^7$  CD3<sup>+</sup> cells/kg with subsequent escalation) were transfused 1 to 5 times, each DLI was accompanied by injection of interleukin-2. Peripheral blood T-lymphocyte subpopulations were studied by immunophenotyping with flow cytometry. Remission with 100% donor chimerism was achieved in 56% patients. The incidence of acute and chronic Graft Versus Host (GVH) reaction was 31%. Chronic GVH reaction was associated with long-term complete response to treatment. Evaluations of T-lymphocyte subpopulation demonstrated changes, depending on the disease phase and response to adoptive immunotherapy.

**Key words:** allogenic hemopoietic stem cell transplantation, donor lymphocyte infusion, interleukin-2, T-lymphocyte subpopulations, survival

Трансплантацию аллогенных гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК) используют для лечения многих гематологических, некоторых онкологических и наследственных заболеваний. Ежегодно в мире проводят более 25 000 алло-ТГСК от гистосовместимого родственного или неродственного, а также гаплоидентичного доноров [1—3]. Эффективность данного метода при гемобластозах обусловлена не только противоопухолевым воздействием предтрансплантационного химиолучевого кондиционирования, но и наличием феномена трансплантат против лейкоза (РТПЛ) [4—7].

Рецидив гемобластоза после алло-ТГСК является основной причиной неудач данного метода терапии. Рецидив раз-

вивается примерно у 49% реципиентов после алло-ТГСК от HLA-идентичного родственного донора и у 37% реципиентов после алло-ТГСК от неродственного донора [8]. Частота рецидивов ниже (менее 20%) в случае выполнения алло-ТГСК во время первой ремиссии острого лейкоза (ОЛ) или хронической фазы хронического миелолейкоза (ХМЛ). Если алло-ТГСК выполнена во второй и последующих ремиссиях ОЛ, резистентном течении гемобластоза, бластном кризе ХМЛ, доля рецидивов составляет 40—70% [9—11].

Среди факторов риска развития посттрансплантационного рецидива рассматриваются такие, как возраст больного, фаза заболевания на момент трансплантации, режим кондиционирования, источник гемопоэтических клеток, а также удаление из миелотрансплантата Т-лимфоцитов [12].

Лечение посттрансплантационных рецидивов, особенно в ранние сроки после алло-ТГСК, всегда затруднено. По данным А. Logen и соавт. [13], однолетняя общая выживаемость больных острым миелобластным лейкозом (ОМЛ), рецидив у которых развился более чем через 6 мес после алло-ТГСК,

#### Для корреспонденции:

Богданов Рашид Фаргатович, аспирант отдела химиотерапии гемобластозов, депрессий кроветворения и трансплантации костного мозга ФГБУ Гематологический научный центр Минздрава России. Адрес: 125167, Москва, Новый Зыковский проезд, д. 4а. Телефон: +7(495) 614-90-42. E-mail: rashit85@mail.ru

составила 44% по сравнению с 10% для больных, рецидив у которых был диагностирован в первые 6 мес после алло-ТГСК.

В качестве терапии рецидива гемобласта после алло-ТГСК в различное время предлагали следующие методики: химиотерапию (ХТ), вторую алло-миелотрансплантацию, цитокиновую терапию и клеточную иммунотерапию.

Эффективность ХТ как единственного метода лечения посттрансплантационного рецидива гемобласта была невысокой и напрямую зависела от сроков развития рецидива [14]. Результаты исследования S. Sica и соавт. [15] свидетельствовали о том, что при позднем посттрансплантационном рецидиве (более 9 мес после алло-ТГСК) количество больных ОЛ, достигших повторной ремиссии после курсов высокодозной ХТ, могло быть весьма значительным (71%). Однако продолжительность этих ремиссий была короткой (14 мес). ХТ ранних посттрансплантационных рецидивов ОЛ неэффективна, повторных ремиссий получать не удавалось.

Вторая алло-ТГСК также может рассматриваться в качестве эффективного метода терапии посттрансплантационного рецидива. Однако выполняется вторая алло-ТГСК только у 2—20% реципиентов [16]. Это обусловлено высокой летальностью, связанной с трансплантацией (36—50%), и весьма скромными показателями 2-летней общей выживаемости (27%) [17].

Противоопухолевая активность цитокинов, таких как интерферон- $\gamma$  (ИФН- $\gamma$ ) и интерлейкин-2 (ИЛ-2), была показана в серии клинических испытаний. ИФН- $\gamma$  является членом плейотропного семейства белков, обладающих антивирусным, иммуномодулирующим и антипролиферативным свойствами [18]. Основное иммуномодулирующее свойство ИЛ-2 состоит в активации цитотоксических Т-лимфоцитов при взаимодействии со специфическими рецепторами на их мембране [19].

Впервые результаты успешного применения ИЛ-2 в сочетании с трансфузией лимфоцитов донора при рецидиве гемобласта после алло-ТГСК были опубликованы S. Slavin и соавт. в 1996 г. [20]. Больному с посттрансплантационным рецидивом острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ) были перелиты лимфоциты донора после предварительной инкубации их с ИЛ-2. В результате у больного была достигнута полная длительная ремиссия заболевания.

Адоптивная иммунотерапия с использованием лимфоцитов донора костного мозга является наиболее эффективным методом лечения посттрансплантационных рецидивов гемобластов. Впервые трансфузии лимфоцитов донора (ТЛД) с целью терапии посттрансплантационного рецидива ОЛЛ применены в 1986 г. в Израиле [20], а через несколько лет опубликованы результаты успешного применения переливания донорских лимфоцитов в Германии [21].

Последующие исследования в этой области показали, что эффективность ТЛД зависит от величины опухолевой массы на момент начала применения трансфузий. У больных с молекулярным или цитогенетическим посттрансплантационным рецидивом ХМЛ частота достижения повторной ремиссии в результате применения ТЛД достигает 80%, при гематологическом рецидиве составляет 60—70%, а при рецидиве в виде бластного криза — всего лишь 15—35% [22].

При других нозологических формах результаты терапии посттрансплантационного рецидива весьма различны. При ОМЛ применение ТЛД позволяет достичь ремиссии у 35—65% больных [13], а при ОЛЛ — у 15—30% [22]. У больных лимфолиферативными заболеваниями ТЛД обеспечивают весьма оптимистичные результаты: при множественной миеломе (ММ) — у 40—65% больных [23], при лимфогранулематозе (лимфоме Ходжкина) — у 45—55% больных [24], при фолликулярной лимфоме — у 75—85% больных [25, 26], при диффузной В-крупноклеточной лимфоме — у 60% [27].

Существенные отличия частоты достижения повторной ремиссии в ответ на терапию лимфоцитами донора у больных с разными заболеваниями обусловлены несколькими причинами: различной кинетикой опухолевых клеток при определенных формах гемобластов, 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 FAS-лиганда, предотвращающего апоптоз клетки, и наличием специфических опухолевых антигенов на злокачественных клетках, позволяющих избежать контакта с донорскими цитотоксическими Т-лимфоцитами [5, 28].

Другим объяснением более низкой эффективности ТЛД при ОЛ является высокая скорость пролиферации лейкомиического клона во время рецидива и относительно медленное формирование эффекта РТПЛ [28]. В этом случае для эрадикации опухолевых клеток и индукции повторной ремиссии необходима ХТ.

В исследовании S. Mackinnon и соавт. [29] у больных с рецидивом ХМЛ после алло-ТГСК была определена оптимальная доза CD3<sup>+</sup>-клеток для индукции РТПЛ, которая составила  $1 \cdot 10^7$  CD3<sup>+</sup>-клеток на 1 кг массы тела больного.

В более поздних работах рассматривалась противоопухолевая эффективность и вероятность развития РТПХ при применении более высоких доз CD3<sup>+</sup>-клеток. Оказалось, что переливание лимфоцитов донора, содержащих более  $10 \cdot 10^7$  CD3<sup>+</sup>-клеток/кг, не обеспечивает улучшение показателей общей выживаемости, но сопровождается более высокой частотой развития РТПХ. Наиболее важным прогностическим фактором, влияющим на показатели выживаемости после терапии лимфоцитами донора, оказалось время от алло-ТГСК до констатации рецидива ОЛ [30].

В случае гематологического рецидива лейкоза 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 не существует единого мнения о степени интенсивности проводимой ХТ: курсы FLAG-Ida, «7 + 3-Ida» или малые дозы цитарабина [15, 31—33]. Не определены четкие сроки выполнения первой ТЛД после курса ХТ: в период аплазии или после восстановления кроветворения [34]. Не уточнено необходимое количество переливаемых CD3<sup>+</sup>-клеток. Основными причинами летальности являются прогрессия ОЛ (костно-мозговые и/или экстрамедуллярные рецидивы), а также присоединение тяжелой формы РТПХ [35, 36].

В отделении трансплантации костного мозга ФГБУ Гематологический научный центр (ГНЦ) Минздрава России (Москва) для лечения посттрансплантационного рецидива гемобласта ТЛД используют более 20 лет [37, 38]. К 2007 г. был разработан протокол лечения посттрансплантационных рецидивов, основанный на применении ТЛД в период аплазии кроветворения после курса ХТ, причем каждая процедура ТЛД сопровождалась введением ИЛ-2 в дозе 6 млн МЕ [39]. 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, в протоколе лечения посттрансплантационного рецидива предполагалось проведение поддерживающей терапии ИЛ-2 в течение нескольких лет с целью контроля за минимальной остаточной болезнью [40, 41].

В ряде случаев применение адоптивной иммунотерапии может быть целесообразным во время «начинающегося» рецидива (убывающий донорский химеризм, появление признаков минимальной резидуальной болезни). Трансфузии лимфоцитов донора могут быть использованы и с профилактической целью при высоком риске рецидива гемобласта после алло-ТГСК. Первое сообщение о профилактическом назначении иммунотерапии было опубликовано E. Naparstek и соавт. в 1995 г. [42]. Данное направление адоптивной иммунотерапии в настоящее время активно развивается, что обусловлено увеличением количества алло-ТГСК, выполняемых с использованием режима кондиционирования пониженной

интенсивности или с применением миелотрансплантата с удаленными Т-лимфоцитами [43, 44].

В исследованиях, проведенных М. Bosch и соавт. [45], рассмотрен еще один фактор, от которого может зависеть вероятность развития рецидива, — время и полноценность реконституции Т-клеточного звена лимфоцитов после проведения алло-ТГСК.

Одним из основных осложнений терапии лимфоцитами донора является РТПХ, частота которой может составлять 10—50% [46]. С целью снижения частоты РТПХ S. Mackinnon и соавт. [29] предложили новую тактику переливания лимфоцитов донора реципиентам с посттрансплантационным рецидивом ХМЛ: несколько последовательных трансфузий через определенные интервалы времени, начиная с низких доз с последующей эскалацией дозы клеток. Авторы показали, что при использовании небольших доз клеток возможна индукция РТПЛ без развития РТПХ. В дальнейшем эффективность данной схемы терапии изучали и другие исследователи [22, 47].

Среди иммунологических признаков РТПХ определены такие, как экспансия CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов донора и повышенная продукция ИНФ- $\gamma$  цитотоксическими CD8<sup>+</sup> и CD4<sup>+</sup> Т-клетками донора. Предполагают [5], что острая РТПХ развивается в результате воздействия цитотоксических CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов донора на клетки реципиента, что сопровождается элиминацией лимфоцитов реципиента и тяжелым иммунодефицитом.

Регуляторные клетки (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>) могут блокировать активацию донорских CD8<sup>+</sup> Т-клеток и, следовательно, препятствовать этой субпопуляции Т-лимфоцитов индуцировать острую РТПХ. Клетки с высокой экспрессией антигена CD25 (CD25<sup>high</sup>), Foxp3<sup>+</sup> обладают наибольшей иммуносупрессивной активностью [48]. Показано [5, 49], что эти клетки способны пролиферировать в ответ на стимулирующие антигены только в присутствии ИЛ-2 и при активации подавляют пролиферацию как наивных CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> Т-клеток, так и регуляторных Т-клеток CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>, цитотоксических CD8<sup>+</sup> Т-клеток памяти, а также клеток натуральных киллеров (НК-клетки) и В-лимфоцитов через контактзависимый механизм.

Количество Т-регуляторных клеток снижается при РТПХ [50]. У реципиентов с нормальным или высоким числом CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>-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.

НК-клетки мигрируют в зону локализации опухолевых клеток под воздействием ИНФ- $\gamma$ , продуцируемого Т-хелперами типа I. НК-клетки способны сразу оказать цитотоксическое воздействие, обнаружив злокачественную клетку [51].

Несмотря на большое количество исследований, посвященных изучению эффектов РТПХ и РТПЛ, индуцированных ТЛД, опубликованные данные об изменениях количественного и качественного состава популяций Т-лимфоцитов при рецидиве гемобластоза после алло-ТГСК немногочисленны [5, 52].

Все это свидетельствует об актуальности исследования особенностей Т-клеточного звена иммунной системы при рецидиве гемобластоза после алло-ТГСК и на фоне терапии ТЛД с последующим внутривенным введением ИЛ-2.

Цель настоящей работы — изучение эффективности ТЛД после алло-ТГСК, а также исследование субпопуляций Т-лимфоцитов (Т-хелперов, цитотоксических Т-лимфоцитов, Т-регуляторных клеток, НК-клеток) периферической крови больных гемобластозами на фоне трансфузий лимфоцитов донора по поводу посттрансплантационного рецидива гемобластоза или несостоятельности трансплантата.

## Материалы и методы

В исследование включены 15 больных гемобластозами (13 больных ОМЛ, 1 — ОЛЛ, 1 — миелодиспластическим

синдромом, из них 10 мужчин и 5 женщин), которым проводили ТЛД с последующим внутривенным введением ИЛ-2 по поводу посттрансплантационного гематологического рецидива или несостоятельности миелотрансплантата (уменьшения содержания донорских клеток в костном мозге). 12 больных были реципиентами аллогенного костного мозга от HLA-совместимого родственного донора и 3 больных — реципиентами стволовых клеток крови (СКК) от гистосовместимого неродственного донора. Медиана возраста больных составила 37 (19—57) лет.

Предтрансплантационное кондиционирование проводили по миелоаблативной программе 7 больным и в режиме пониженной интенсивности 8 больным. Количество трансплантированных миелокариоцитов варьировало от 2,5 до 5,4 · 10<sup>8</sup> (медиана 3,8 · 10<sup>8</sup>) клеток/кг, медиана количества перелитых СКК составила 7,4 · 10<sup>6</sup> CD34<sup>+</sup>-клеток/кг (разброс от 5,3 до 8,1 · 10<sup>6</sup> CD34<sup>+</sup>-клеток/кг).

Профилактику РТПХ осуществляли по схеме метотрексат + циклоспорин А у 7 больных с миелоаблативным предтрансплантационным кондиционированием. У 8 больных с предтрансплантационным кондиционированием пониженной интенсивности дополнительно назначали мофетила микофенолат ( $n = 7$ ) или применяли только циклофосфамид ( $n = 1$ ).

В посттрансплантационном периоде у 2 из 15 больных была диагностирована острая РТПХ: I—II стадия — у 1 (7%), III стадии — у 1 (7%) больного. Медиана времени до развития острой РТПХ составила 1 мес (разброс 0,5—1,5 мес). Хроническая РТПХ в виде локальной формы была диагностирована у 4 больных, при этом у 1 больного трансформировалась из острой формы.

Исследование костно-мозгового химеризма проводили методами флюоресцентной *in situ* гибридизации (FISH) с исследованием ДНК-зонда к центромерным участкам X/Y-хромосом в случае различия донора и реципиента по полу и полимеразной цепной реакции — ПЦР (амплификация гипервариабельных участков ДНК, содержащих тандемные повторы STR/NVTR) у всех больных.

Гематологический рецидив ОЛ после алло-ТГСК диагностирован у 9 реципиентов на основании обнаружения в костном мозге более 5% бластных клеток, цитохимического и иммунофенотипического исследований (при наличии более 20% бластных клеток). Медиана интервала времени от алло-ТГСК до рецидива составила 8 (2—51) мес. Количество бластных клеток в костном мозге при этом составляло от 7,5 до 85%. Наблюдавшаяся ранее клиническая картина РТПХ к моменту рецидива была купирована у всех больных.

С целью уменьшения опухолевой массы больным назначали курс ХТ (табл. 1). Затем, через 7—14 сут после завершения ХТ, в период миелотоксического агранулоцитоза (при количестве гранулоцитов менее 0,5 · 10<sup>9</sup>/л), выполняли первую ТЛД. Одному больному ХТ не назначали, поскольку рецидив ОМЛ сопровождался глубокой цитопенией. В связи с повторным гематологическим рецидивом ОМЛ 1 больному ХТ с последующими трансфузиями лимфоцитов донора выполняли дважды. Таким образом, в анализ включено 10 случаев применения лимфоцитов донора костного мозга при гематологическом рецидиве ОЛ после алло-ТГСК.

Несостоятельность миелотрансплантата наблюдалась у 6 больных и подтверждалась снижением содержания донорской ДНК на 5% и более в 2 исследованиях костного мозга реципиента с интервалом 2—3 нед.

Медиана времени от алло-ТГСК до начала трансфузий лимфоцитов донора равнялась 5 (3—36) мес. К этому моменту у всех больных были отменены иммуносупрессивные препараты, применявшиеся с целью профилактики РТПХ. Поскольку у этих реципиентов сохранялась гематологическая ремиссия, ХТ им не проводили, лимфоциты донора костного мозга переливали на фоне удовлетворительных показателей гемограммы.

Концентрат донорских лимфоцитов получали из периферической крови родственных доноров методом автоматиче-

Таблица 1

**Химиотерапия больных с гематологическим рецидивом после алло-ТГСК**

Диагноз	Курс ХТ	Препарат	Количество больных
ОМЛ	«7 + 3» (идарубицин)	Цитарабин 100 мг/м <sup>2</sup> 2 раза в сутки с 1-го по 7-й день курса Идарубицин 12 мг/м <sup>2</sup> 1 раз в сутки с 1-го по 3-й день курса	5
	«7 + 3» (митоксантрон)	Цитарабин 100 мг/м <sup>2</sup> 2 раза в сутки с 1-го по 7-й день курса Митоксантрон 10 мг/м <sup>2</sup> 1 раз в сутки с 1-го по 3-й день курса	1
	Малые дозы цитарабина + ГМ-КСФ [32]	Цитарабин 10 мг/м <sup>2</sup> 2 раза в сутки с 1-го по 28-й день курса, подкожно ГМ-КСФ 2 мкг/кг в 1 с подкожно, с 1-го по 7-й день после трансфузии лимфоцитов донора	1
	Децитабин	Децитабин 20 мг/м <sup>2</sup> 1 раз в сутки с 1-го по 5-й день курса	1
ОЛЛ	Предфаза, I фаза индукции по протоколу ОЛЛ-2009 [53]	Дексаметазон 10 мг/м <sup>2</sup> 1 раз в сутки с 1-го по 28-й день курса Даунорубицин 45 мг/м <sup>2</sup> 1 раз в сутки в 8, 15, 22-й день курса Винкристин 2 мг/м <sup>2</sup> 1 раз в сутки в 8, 15, 22-й день курса	1

Примечание. ГМ-КСФ — гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор.

ского лейкоцитафереза на сепараторах клеток крови (MCS+, COBE-Spectra, Amicus). Программа сбора лимфоцитов соответствовала программе стандартного лейкоцитафереза или программе сбора стволовых клеток крови. Перерыв между процедурами составлял 4 нед. Объем обработанной крови за один сеанс лейкоцитафереза был равен 1,5—2 объемам циркулирующей крови.

При алло-ТГСК от неродственного донора осуществляли криоконсервирование определенного объема трансплантата для последующего использования в качестве источника донорских лимфоцитов.

Доза перелитых CD3<sup>+</sup>-клеток при первой трансфузии составляла 1·10<sup>7</sup> на 1 кг массы тела больного. При условии неполного восстановления донорского кроветворения и отсутствии признаков РТПХ через 2—4 нед осуществляли вторую ТЛД. Дозу лимфоцитов донора увеличивали до 5·10<sup>7</sup> CD3<sup>+</sup>-клеток/кг. При отсутствии эффекта после второй ТЛД проводили третью ТЛД с тем же интервалом, дозу CD3<sup>+</sup>-клеток увеличивали до 10·10<sup>7</sup> клеток/кг. Во всех случаях через 1—2 ч после ТЛД больному внутривенно вводили ИЛ-2 (ронколейкин) в дозе 6 млн МЕ.

Полным ответом на терапию считали достижение стойкого восстановления 100% донорского химеризма, обеспечивающего длительную ремиссию гемобластоза.

При восстановлении полного донорского химеризма и отсутствии РТПХ проводили поддерживающую терапию ИЛ-2 в дозе 2 млн МЕ в день в течение 5 дней, с интервалом

**Абсолютные значения субпопуляций Т-лимфоцитов в периферической крови условно здоровых людей**

Статистический параметр	Субпопуляции Т-лимфоцитов					
	CD3 <sup>+</sup>	CD3 <sup>+</sup> /CD4 <sup>+</sup>	CD3 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup> /CD25 <sup>high</sup>	CD3 <sup>+</sup> /CD56 <sup>+</sup>	CD3 <sup>+</sup> /CD56 <sup>+</sup>
Абсолютное количество клеток, · 10 <sup>9</sup> /л	0,9—2	0,6—1,3	0,37—0,9	0,009—0,08	0,01—0,16	0,12—0,4

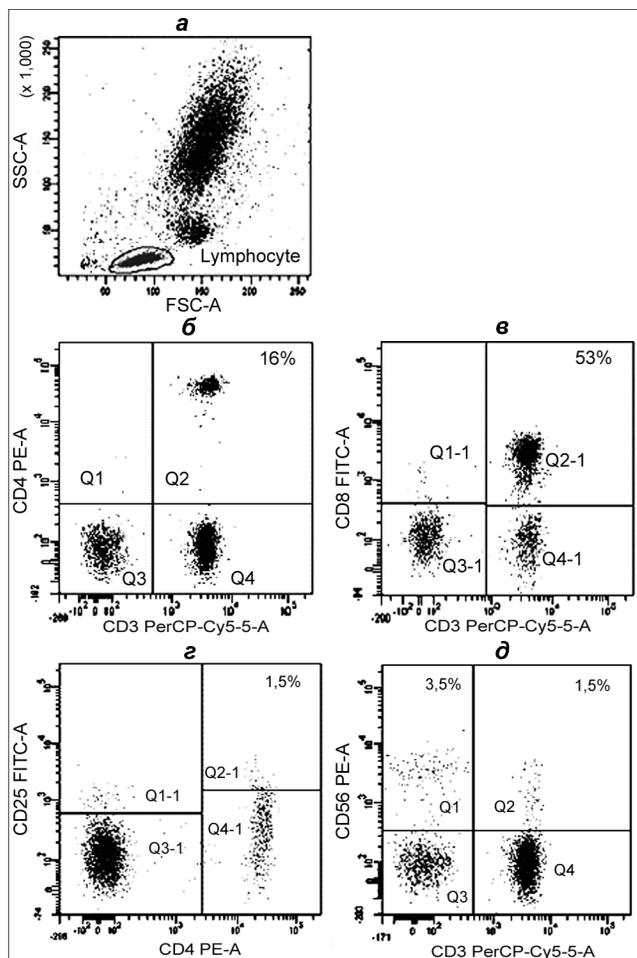


Рис. 1. Результаты иммунофенотипирования периферической крови больного С. через 2 нед после первого ТЛД.

а — выделение лимфоцитарного гайта по прямому (FSC) и боковому светорассеянию (SSC); б — CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>-клетки; в — CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>; г — CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>; д — CD3<sup>+</sup>/CD56<sup>+</sup> и CD3<sup>+</sup>/CD56<sup>+</sup>-клетки.

4—5 нед. При развитии острой или хронической РТПХ поддерживающую терапию не проводили.

На момент анализа результатов среди больных с гематологическим рецидивом в 7 случаях была выполнена одна ТЛД, в 2 случаях — по две ТЛД, в 1 случае — три ТЛД. На фоне убывающего донорского химеризма 2 больным ТЛД сделаны однократно, 2 больным — трижды, 1 больному — пять раз.

Интервал между трансфузиями колебался от 2 до 10 (медиана 2) нед. Суммарная доза перелитых CD3<sup>+</sup>-клеток у каждого больного составила от 1 до 19·10<sup>7</sup>/кг (медиана 1,0·10<sup>7</sup> CD3<sup>+</sup>-клеток/кг).

Оценку субпопуляций Т-лимфоцитов периферической крови у больных на фоне ТЛД проводили методом иммунофенотипирования с моноклональными антителами к антигенам CD3 (PerCP), CD4 (PE), CD8 (FITC), CD25 (FITC), CD56 (FITC) ("Becton Dickinson", США) с проточной цитофлуориметрией (FACS Canto II, "Becton Dickinson", США). Материалом исследования служила венозная кровь, стабилизированная К<sub>2</sub>-ЭДТА.

Обработку данных осуществляли с помощью программного обеспечения BD FACS Diva 6.1.3. Анализируемую область (лимфоцитарный гайт) выбирали на основании характеристик прямого светорассеяния FSC и бокового светорассеяния SSC.

Для анализа использовали комбинации антител, характеризующие иммунофено-

Таблица 2

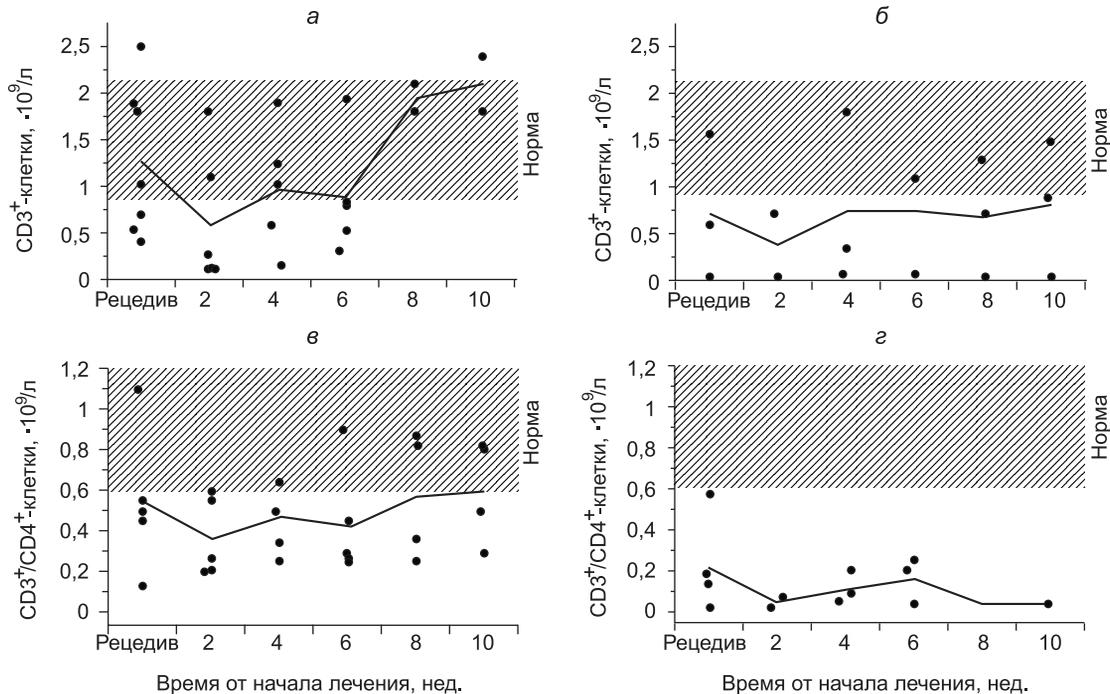


Рис. 2. Изменение содержания Т-лимфоцитов (CD3<sup>+</sup>-клеток) и Т-хелперов (CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>-клеток) на фоне ТЛД у больных с посттрансплантационным рецидивом ОЛ: достигших полного восстановления донорского химеризма (а, в) и без эффекта после ТЛД (б, г).

тип следующих субпопуляций Т-лимфоцитов: Т-лимфоциты (CD3<sup>+</sup>); Т-хелперные клетки (CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>); цитотоксические Т-клетки (CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>); Т-регуляторные клетки (CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>high</sup>); NK-клетки (CD3<sup>+</sup>/CD56<sup>+</sup>); Т-клетки натуральные киллеры — Т-NK (CD3<sup>+</sup>/CD56<sup>+</sup>).

На рис. 1 представлены точечные графики иммунофенотипирования клеток периферической крови больного с несостоятельностью миелотрансплантата (85% донорского кровотока при FISH-исследовании по X/Y-хромосоме), демонстрирующие содержание субпопуляций Т-лимфоцитов через 2 нед после первой ТЛД.

Подсчет абсолютного количества клеток каждой субпопуляции Т-лимфоцитов выполняли с учетом данных гемограммы, полученных на автоматическом гематологическом анализаторе КХ-21N («Sysmex», Япония).

Результаты подсчета абсолютного количества Т-лимфоцитов у больных на фоне ТЛД представлены в виде среднего значения и стандартного отклонения. В качестве нормальных значений были использованы результаты иммунофенотипирования периферической крови здоровых людей, которые указаны в табл. 2 [54].

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 нед после первой ТЛД. При статистическом анализе данных использовали статистический пакет SAS 9.3.

### Результаты и обсуждение

Для оценки клинического эффекта, а также качественно и количественно составов субпопуляций Т-лимфоцитов периферической крови на фоне применения ТЛД больных ОЛ разделили на 2 группы. В 1-ю группу вошли 10 больных с посттрансплантационным гематологическим рецидивом, которым ТЛД и инфузии ИЛ-2 выполняли после химиотерапевтического воздействия на фоне миелотоксического агранулоцитоза, во 2-ю группу — 6 больных, которым ТЛД с последующим введением ИЛ-2 выполняли на фоне гематологической ремиссии, но при прогрессирующем снижении содержания в костном мозге донорских клеток, что

указывало на несостоятельность (или отторжение) миелотрансплантата.

В результате комплексной терапии посттрансплантационного гематологического рецидива у 5 из 10 больных была достигнута гематологическая ремиссия с полным восстановлением донорского кровотока. Применение адоптивной иммунотерапии на фоне несостоятельности миелотрансплантата также обеспечило восстановление 100% донорского химеризма у 4 из 6 больных. Таким образом, общий клинический эффект среди всех наблюдавшихся нами больных составил 56% при медиане наблюдения от начала ТЛД 14 (2—29) мес. Медиана продолжительности ремиссии равнялась 6 (1—20) мес. Поддерживающую терапию ИЛ-2 после ТЛД выполняли 5 больным, число курсов при этом составило от 1 до 13 (медиана 5).

Острая форма РТПХ на фоне адоптивной иммунотерапии лимфоцитами донора была диагностирована в 5 (31%) из 16 случаев: I—II степень — в 3 (19%) случаях, III—IV степень — в 2 (12%) случаях. Медиана времени от первой ТЛД до манифестации острой РТПХ составила 2 мес (от 1 нед до 3 мес). В 4 случаях острая РТПХ в последующем трансформировалась в хроническую РТПХ (локальную форму у 2 и экстенсивную у 2 больных). Еще у 1 больного локальная форма хронической РТПХ диагностирована через 8 мес на фоне поддерживающей терапии ИЛ-2.

У 4 (80%) больных с хронической РТПХ отмечался наиболее длительный полный ответ от 10 до 28 (медиана 16) мес, что подтверждалось ремиссией ОЛ и констатацией 100% донорского кровотока. Наличие острой РТПХ не ассоциировалось со значимым противоопухолевым ответом, поскольку у 1 больного манифестация острой РТПХ и прогрессия лейкоза наблюдались практически одновременно.

При сопоставлении эпизодов РТПХ, отмечавшихся после алло-ТГСК и после ТЛД, не удалось выявить какую-либо взаимосвязь. У 2 больных клинические проявления РТПХ наблюдались как после алло-ТГСК, так и после ТЛД. У 3 больных РТПХ впервые манифестировала после ТЛД, у 3 — РТПХ присоединялась после алло-ТГСК, в то время как на фоне ТЛД проявлений данного осложнения не наблюдалось.

У 5 из 10 больных 1-й группы в момент констатации гематологического рецидива результаты иммунофенотипирова-

ния лимфоцитов периферической крови свидетельствовали о снижении содержания  $CD3^+$ -клеток в среднем до  $0,46 \pm 0,25 \cdot 10^9/\text{л}$ . Абсолютное количество Т-хелперов ( $CD3^+/CD4^+$ ) было снижено у 9 (90%) больных в среднем до  $0,21 \pm 0,17 \cdot 10^9/\text{л}$ . Содержание цитотоксических клеток ( $CD3^+/CD8^+$ ) было ниже нормальных значений (от  $0,01$  до  $0,1 \cdot 10^9/\text{л}$ ) у 3 (30%) больных. Сниженное содержание Т-регуляторных ( $CD4^+/CD25^{\text{high}}$ ), так же как и НК-клеток ( $CD3^+/CD56^+$ ;  $CD3^+/CD56^+$ ), 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 НК-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 исследованных субпопуляций было нормальным.

Через 2 нед после первой ТЛД среди больных 1-й группы нормальные показатели  $CD3^+$ -клеток в крови выявлялись всего лишь у 2 больных. У остальных больных отмечено более глубокое, чем перед началом химиотерапии, снижение абсолютного количества Т-лимфоцитов. Их содержание составляло в среднем  $0,26 \pm 0,24 \cdot 10^9/\text{л}$ . Более глубокий дефицит наблюдался у 8 больных при подсчете Т-хелперов ( $0,18 \pm 0,16 \cdot 10^9/\text{л}$ ) и у 6 больных при подсчете цитотоксических клеток (в среднем  $0,07 \pm 0,05 \cdot 10^9/\text{л}$ ). Сниженное количество Т-НК-клеток и НК-клеток отмечено у 4 и 6 больных, при этом минимальное количество указанных клеток составляло в среднем  $0,004 \pm 0,003 \cdot 10^9/\text{л}$  и  $0,03 \pm 0,02 \cdot 10^9/\text{л}$  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.

При исследовании лимфоцитов крови через 4 ( $n = 8$ ) и 6 нед ( $n = 7$ ) после первой ТЛД можно было проследить четкое разделение показателей, отражавших содержание субпопуляций Т-клеток, в зависимости от достигнутого эффекта. В случаях полного восстановления донорского кровотока (у 5 больных) отмечена постепенная нормализация показателей исследуемых субпопуляций Т-лимфоцитов, за исключением сохранявшегося умеренного снижения Т-хелперов (от  $0,3$  до  $0,4 \cdot 10^9/\text{л}$ ) у 3 больных. В тех случаях, когда проведенная терапия не обеспечила достижения ремиссии со 100% донорским химеризмом к 4-й и 6-й неделе от начала ТЛД ( $n = 3$ ), абсолютное количество практически всех субпопуляций Т-лимфоцитов оставалось значительно сниженным. Количество Т-лимфоцитов составляло от  $0,06$  до  $0,6 \cdot 10^9/\text{л}$ , Т-хелперов от  $0,02$  до  $0,25 \cdot 10^9/\text{л}$ , цитотоксических Т-лимфоцитов — от  $0,02$  до  $0,1 \cdot 10^9/\text{л}$ , Т-регуляторных клеток — от  $0,005$  до  $0,006 \cdot 10^9/\text{л}$ , Т-НК-клеток — от  $0,002$  до  $0,004 \cdot 10^9/\text{л}$ .

К 8-й и 10-й неделе после первой ТЛД у 4 больных, достигших повторной ремиссии со 100% донорским химеризмом, абсолютное количество клеток исследуемых субпопуляций было нормальным, лишь у 2 больных наблюдалось сниженное количество Т-хелперов ( $0,25$  и  $0,37 \cdot 10^9/\text{л}$ ). Оценить результаты иммунофенотипирования лимфоцитов крови в эти сроки у больных, у которых не удалось получить противоопухолевый ответ, не представлялось возможным, так как всем больным уже проводили ХТ в связи с прогрессией гемобластоза (рис. 2).

Среди 6 больных 2-й группы с сохраняющейся ремиссией перед началом ТЛД у 4 (67%) содержание  $CD3^+$ -клеток в периферической крови было нормальным, у 2 (33%) оказалось сниженным до  $0,4$  и  $0,74 \cdot 10^9/\text{л}$ . При этом абсолютное коли-

чество Т-хелперов ( $CD3^+/CD4^+$ ) было ниже нормальных значений у 4 больных (в среднем  $0,28 \pm 0,17 \cdot 10^9/\text{л}$ ). У 1 больного выявлено снижение цитотоксических клеток ( $CD3^+/CD8^+$ ) до  $0,25 \cdot 10^9/\text{л}$ . У 3 больных отмечено снижение содержания лишь одной субпопуляции, у 1 больного — одновременно двух субпопуляций Т-лимфоцитов. Все остальные показатели, характеризующие количественное содержание исследованных клеток, оказались нормальными.

Через 2 нед после первой ТЛД в этой группе больных не выявлено каких-либо существенных изменений со стороны количественных показателей исследованных субпопуляций Т-лимфоцитов. Абсолютное количество  $CD3^+$ -клеток оставалось нормальным у 5 из 6 больных. Только субпопуляция Т-хелперов оставалась на сниженных абсолютных значениях, причем средний показатель содержания  $CD3^+/CD4^+$ -клеток практически не отличался от исходного ( $0,24 \pm 0,11 \cdot 10^9/\text{л}$ ). При иммунофенотипировании лимфоцитов крови через 4, 6, 8 и 10 нед установлено стабильное снижение 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  $CD3^+$ -клеток.

У 1 больной уже после первой ТЛД наблюдалось снижение содержания всех исследованных субпопуляций Т-лимфоцитов. В течение последующих 10 нед наблюдения у нее сохранялся глубокий дефицит как  $CD3^+$ -клеток, так и Т-хелперов, цитотоксических, Т-регуляторных и НК-клеток. Именно у этой больной на фоне ТЛД продолжалось отторжение донорского миелотрансплантата.

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 нед после ХТ и одной ТЛД отмечался еще более глубокий дефицит практически всех субпопуляций Т-лимфоцитов. Однако уже через 4—6 нед после первой ТЛД у больных, достигших ремиссии и полного восстановления донорского кровотока, 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 неделям после начала ТЛД, абсолютное количество практически всех субпопуляций Т-лимфоцитов оставалось значительно сниженным.

В случаях несостоятельности миелотрансплантата, 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, анализ клинических результатов адоптивной иммунотерапии лимфоцитами донора с последующим назначением ИЛ-2 у больных ОЛ, выполнявшейся по поводу посттрансплантационного рецидива или несостоятельности миелотрансплантата, показал возможность достижения повторной ремиссии и восстановления полного донорского кровотока у 56% больных при медиане продолжительности наблюдения 14 мес. Переливание лимфоцитов донора в первоначальной дозе  $1 \cdot 10^7 CD3^+$ -клеток/кг с последующей эскалацией дозы сопровождалось присоединением острой и хронической РТПХ с частотой 31%. При этом именно у больных с хронической РТПХ отмечался наиболее длительный полный ответ на лечение в течение 10—28 (медиана 16) мес, что подтверждалось полной ремиссией и констатацией 100% донорского химеризма.

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 заключение. Однако выявленные тенденции к восстановлению цитотоксических лимфоцитов и НК-клеток у больных, достигших ремиссии в результате ТЛД, могут рассматриваться в качестве предикторов клинического эффекта, а продолжающееся снижение абсолютного количества всех субпопуляций Т-лимфоцитов — к несостоятельности миелотрансплантата с последующим развитием рецидива. Возможно, продолжение исследований субпопуляций Т-лимфоцитов позволит в будущем выявить более значимые изменения, характеризующие иммунологический и противоопухолевый эффекты ТЛД.

#### REFERENCES [ЛИТЕРАТУРА]

1. Passweg J.R., Baldomero H., Gratwohl A., Bregni M., Cesaro S., Dreger P., et al. The EBMT activity survey: 1990—2010. *Bone Marrow Transplant.* 2012; 47(7): 906—23.
2. Lubimova L.S., Mendeleeva L.P., Savchenko V.G., Parovichnikova E.N., Demidova I.A., Klyasova G.A., et al. Transplantation of allogeneic and autologous hematopoietic stem cells in acute leukemia (results of 20 years of experience). *Therapeutic Archive. (Transplantacii allogennyh i autologichnyh gemopojeticheskikh stvolovyh kletok pri ostryh lejkozah (itogi 20-letnego opyta). Terapevticheskij arhiv.* 2007; 7: 30—5. (in Russian) [Любимова Л.С., Менделеева Л.П., Савченко В.Г., Паровичникова Е.Н., Демидова И.А., Клясова Г.А. и др. Трансплантации аллогенных и аутологичных гемопоэтических стволовых клеток при острых лейкозах (итоги 20-летнего опыта). *Терапевтический архив.* 2007; 7: 30—5].
3. Afanasyev B.V., Zubarovskaya L.S., Semenova E.V., Ivanovo N.E., Alyansky A.L., Morozova E.V., et al. The experience in non-relative allogeneic transplantation of stem hemopoietic cells in the clinic of bone marrow transplantation at I.P. Pavlov St-Petersburg Medical Academy. *Therapeutic Archive (Opyt primeneniya nerodstvennoj allogennoj transplantacii stvolovyh gemopojeticheskikh kletok v klinike transplantacii kostnogo mozga Sankt-Peterburgskoj gosudarstvennoj akademii imeni akademika I.P. Pavlova. Terapevticheskij arhiv.* 2007; 7: 36—43. (in Russian) [Афанасьев Б.В., Зубаровская Л.С., Семенова Е.В., Иванова Н.Е., Алянский А.Л., Морозова Е.В. и др. Опыт применения неродственной аллогенной трансплантации стволовых гемопоэтических клеток в клинике трансплантации костного мозга СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова. *Терапевтический архив.* 2007; 7: 36—43].
4. Barnes D.W., Loutit J.F. Treatment of murine leukaemia with x-rays and homologous bone marrow. *Br. J. Haematol.* 1957; 3(3): 241—52.
5. Kolb H.J. Graft-versus-leukemia effects of transplantation and donor lymphocytes. *Blood.* 2008; 112(12): 4371—83.
6. Horowitz M., Gale R.P., Sondel P.M., Goldman M.J., Kersey J., Kolb H.J., et al. Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood.* 1990; 75(3): 555—62.
7. Demidova I.A., Savchenko V.G., Olshanskaya Yu.V., Poreshina L.P., Kutyin R.M., Surin V.L., et al. Allogeneic bone marrow transplantation after a reduced-intensity conditioning regimens in the treatment of patients with hematological malignancies. *Therapeutic Archive (Allogennaja transplantacija kostnogo mozga posle rezhimov kondicionirovaniya ponizhennoj intensivnosti v terapii bol'nyh gemoblastozami. Terapevticheskij arhiv.* 2003; 7: 15—21. (in Russian) [Демидова И.А., Савченко В.Г., Ольшанская Ю.В., Порешина Л.П., Кутьина Р.М., Сурин В.Л. и др. Аллогенная трансплантация костного мозга после режимов кондиционирования пониженной интенсивности в терапии больных гемобластозами. *Терапевтический архив.* 2003; 7: 15—21].
8. Pasquini M.C., Wang Z. Current use and outcome of hematopoietic stem cell transplantation: CIBMTR Summary Slides, Newsletter (serial online). 2012; 15(1): 18. <http://www.cibmtr.org/ReferenceCenter/SlidesReports/SummarySlides/pages/index.aspx>
9. Pavletic S.Z., Kumar S., Mohty M., de Lima M., Foran J.M., Pasquini M.C., et al. 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. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2010; 16(7): 871—90. doi: 10.1016/j.bbmt.2010.04.004.
10. Barrett A.J., Battiwalla M. Relapse after allogeneic stem cell transplantation. *Expert Rev. Hematol.* 2010; 3(4): 429—41.
11. Duval M., Klein J.P., Wensheng H., Cahn J.Y., Cairo M., Camitta B.M., et al. Hematopoietic stem-cell transplantation for acute leukemia in relapse or primary induction failure. *J. Clin. Oncol.* 2010; 23(10): 3730—35.
12. Raiola A.M., Van Lint M.T., Valbonesi M., Lamparelli T., Gualandi F., Occhini D., et al. Factors predicting response and graft-versus-host disease after donor lymphocyte infusions: a study on 593 infusions. *Bone Marrow Transplant.* 2003; 31(8): 687—93.
13. Loren A.W., Porter D.L. Donor leukocyte infusions for the treatment of relapsed acute leukemia after allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2008; 41(5): 483—93.
14. Neave E.L., Schwarb H., Shlebak A., Layton D.M., Apperley J.F., Pavlu J. Lymphodepletion chemotherapy followed by donor leukocytes for post-transplantation relapse of myelofibrosis after previous donor leukocyte infusion failure. *Eur. J. Haematol.* 2013; 90(1): 76—8.
15. Sica S., Salutari P., Di-Mario A., D'onofrio G., Etuk B., Leone G. Aggressive chemotherapy for acute leukemia relapsed after transplantation. *Leuk. Lymphoma.* 1994; 15(2): 131—4.
16. Savani B.N., Mielke S., Reddy N., Goodman S., Jagasia M., Rezvani K. Management of relapse after allo-SCT for AML and the role of second transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2009; 44(12): 769—77.
17. El-Cheikh J., Crocchiolo R., Vazquez A., Ladaique P., Boher J. M., Furst S., Castagna L., et al. 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. Transplant. Technol. Res.* 2012; 2: 1—5.
18. George P.M., Badiger R., Alazawi W., Foster G.R., Mitchell J.A. Pharmacology and therapeutic potential of interferons. *Pharmacol. Ther.* 2012; 135(1): 44—53.
19. Alatrash G., Bukowski R.M., Tannenbaum C.S., Finke J. Interleukin. In: *Cancer chemotherapy and biotherapy: Principles and practice.* Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2006: 767—808.
20. Slavin S., Kedar E. Current problems and future goals in clinical bone marrow transplantation. *Blood Rev.* 1988; 2(4): 259—69.
21. Kolb H.J., Mittermuller J., Clemm C., Holler E., Ledderose G., Brehm G., et al. Donor leukocyte transfusions for treatment of recurrent chronic myelogenous leukemia in marrow transplant patients. *Blood.* 1990; 76(12): 2462—5.
22. Deol A., Lum L.G. Role of donor lymphocyte infusions in relapsed hematological malignancies after stem cell transplantation revisited. *Cancer Treat. Rev.* 2010; 36(7): 528—38.
23. Jvan de Donk N.W., Kroger N., Hegenbart U., Corradini P., San Miguel J. F., Goldschmidt H., et al. Prognostic factors for donor lymphocyte infusions following non-myeloablative allogeneic stem cell transplantation in multiple myeloma. *Bone Marrow Transplant.* 2006; 37(12): 1135—41.
24. Peggs K.S., Sureda A., Qian W., Caballero D., Hunter A., Urbano-Ispizua A., et al. Reduced-intensity conditioning for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in relapsed and refractory Hodgkin lymphoma: impact of alemtuzumab and donor lymphocyte infusions on long-term outcomes. *Br. J. Haematol.* 2007; 139(1): 70—80.
25. Mandigers C.M., Verdonck L.F., Meijerink J.P., Dekker A.W., Schattenberg A.V., Raemaekers J.M. Graft-versus-lymphoma effect of donor lymphocyte infusion in indolent lymphomas relapsed after allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2003; 32(12): 1159—63.
26. Bloor A.J., Thomson K., Chowdhry N., Verfuert S., Ings S.J., Chakraverty R., et al. High response rate to donor lymphocyte infusion after allogeneic stem cell transplantation for indolent non-Hodgkin lymphoma. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2008; 14(1): 50—8.
27. Bishop M.R., Dean R.M., Steinberg S.M., Odom J., Pavletic S.Z., Chow C., et al. Clinical evidence of a graft-versus-lymphoma effect against relapsed diffuse large B-cell lymphoma after allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation. *Ann. Oncol.* 2008; 19(11): 1935—40.
28. Rezvani K., Barrett A.J. Characterizing and optimizing immune responses to leukemia antigens after allogeneic stem cell transplantation. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* 2008; 21(3): 437—53.
29. Mackinnon S., Papadopoulos E.B., Carabasi M.H., Reich L., Collins N. H., Boulad F., et al. 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. *Blood*. 1995; 86(4): 1261—8.
30. Bar M., Sandmaier B. M., Inamoto Y., Bruno B., Hari P., Chauncey T., Martin P.J., et al. Donor lymphocyte infusion for relapsed hematological malignancies after allogeneic hematopoietic cell transplantation: prognostic relevance of the initial CD3+ T cell dose. *Biol. Blood Marrow Transplant*. 2013; 19(6): 949—57.
  31. Guillaume T., Gaugler B., Chevallier P., Delaunay J., Ayari S., Clavert A., et al. Escalated lymphodepletion followed by donor lymphocyte infusion can induce a graft-versus-host response without overwhelming toxicity. *Bone Marrow Transplant*. 2012; 47(8): 1112—7.
  32. Schmid C., Schleuning M., Aschan J., Ringden O., Hahn J., Holler E., et al. Low-dose ARAC, donor cells, and GM-CSF for treatment of recurrent acute myeloid leukemia after allogeneic stem cell transplantation. *Leukemia*. 2004; 18(8): 1430—33.
  33. Miller J.S., Weisdorf D.J., Burns L.J., Slungaard A., Wagner J.E., Verneris M.R., et al. Lymphodepletion followed by donor lymphocyte infusion (DLI) causes significantly more acute graft-versus-host disease than DLI alone. *Blood*. 2007; 110(7): 2761—3.
  34. Mendeleeva L., Lubimova L., Demidova I., Zhelnova E., Olshanskaja Y., Parovichnikova E., et al. Donor lymphocyte infusions in aplasia after reinduction chemotherapy for acute leukaemia relapse after allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2008; 41(1): 174.
  35. Pollyea D.A., Artz A.S., Stock W., Daugherty C., Godley L., Odenike O.M., et al. Outcomes of patients with AML and MDS who relapse or progress after reduced intensity allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2007; 40(11): 1027—32.
  36. Kuzmina L.A., Lubimova L.S., Mendeleeva L.P., Zhelnova E.I., Petinati N.A., Bogdanov R.F., et al. Extramedullary relapses after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation and donor lymphocyte transfusion. *Clinical Oncohaematology (Jekstramedulljarnyye recidivy posle transplantacii allogennyh gemopojeticheskikh kletok i transfuzij limfocitov donora. Klinicheskaja onkogematologija)*. 2011; 3: 191—5. (in Russian) [Кузьмина Л.А., Любимова Л.С., Менделеева Л.П., Желнова Е.И., Петинати Н.А., Богданов Р.Ф. и др. Экстрамедуллярные рецидивы после трансплантации аллогенных гемопоэтических клеток и трансфузий лимфоцитов донора. Клиническая онкогематология. 2011; 3: 191—5].
  37. Savchenko V.G., Mendeleeva L.P., Lubimova L.S., Parovichnikova E.N. Donor leukocyte infusion (DLI) in the treatment of AML patients relapsed after allogeneic bone marrow transplantation. *Acute Leuk.* 1996; 6: 383—5.
  38. Savchenko V.G. New strategies in transplantation of hematopoietic stem cells. In: Abstracts of the Norwegian-Russian Conference on Hematology. 4—7 September 2003, St. Petersburg. (Novyye strategii v transplantacii stvolovyh gemopojeticheskikh kletok. V knige: Tezisy dokladov Rossijsko-Norvezhskoj konferencii po problemam gematologii. 4—7 sentjabrja 2003, Sankt-Peterburg). 2003; 10—1. (in Russian) [Савченко В.Г. Новые стратегии в трансплантации стволовых гемопоэтических клеток. В кн.: Тезисы докладов Российско-Норвежской конференции по проблемам гематологии. 4—7 сентября 2003, Санкт-Петербург. 2003: 10—1].
  39. Zhelnova E.I., Mendeleeva L.P., Lubimova L.S., Demidova I.A., Parovichnikova E.N., et al. Efficiency of donor lymphocyte transfusions and prolonged use of interleukin-2 in patients with relapsed acute leukemia after allogeneic bone marrow transplantation. *Therapeutic Archive (Jeffektivnost' transfuzij limfocitov donora i dlitel'nogo primenenija interlejkina-2 u pacienta s recidivami ostrogo lejkoza posle transplantacii allogennogo kostnogo mozga. Terapevticheskij arhiv)*. 2007; 8: 67—9. (in Russian) [Желнова Е.И., Менделеева Л.П., Любимова Л.С., Демидова И.А., Паровичникова Е.Н., Порешина Л.П. и др. Эффективность трансфузий лимфоцитов донора и длительного применения интерлейкина-2 у пациента с рецидивами острого лейкоза после трансплантации аллогенного костного мозга. Терапевтический архив. 2007; 8: 67—9].
  40. Mendeleeva L., Bogdanov R., Lubimova L., Kuzmina L., Zhelnova E., Parovichnikova E., et al. Effect of donor lymphocyte infusion in aplasia after reinduction chemotherapy for leukaemia relapse after allo-SCT. *Bone Marrow Transplant*. 2011; 46(1): 675.
  41. Bogdanov R. F., Mendeleeva L.P., Lubimova L.S., Galtseva I.V., Kuzmina L.A., Zhelnova E.I., et al. Donor lymphocyte transfusions in an aplasia after chemotherapy in leukaemia relapse after allogeneic bone marrow transplantation. *Hematology and Transfusiology (Transfuzii limfocitov donora v aplazii posle himioterapii pri recidive lejkoza posle transplantacii allogennogo kostnogo mozga. Gematologija i transfuziologija)*. 2012; 3(Suppl.): 31. (in Russian) [Богданов Р.Ф., Менделеева Л.П., Любимова Л.С., Гальцева И.В., Кузьмина Л.А., Желнова Е.И. и др. Трансфузии лимфоцитов донора в аплазии после химиотерапии при рецидиве лейкоза после трансплантации аллогенного костного мозга. Гематология и трансфузиология. 2012; 3(приложение): 31].
  42. Naparstek E., Or R., Nagler A., Cividalli G., Engelhard D., Aker M., et al. T-cell-depleted allogeneic bone marrow transplantation for acute leukaemia using Campath-1 antibodies and post-transplant administration of donor's peripheral blood lymphocytes for prevention of relapse. *Br. J. Haematol.* 1995; 89(3): 506—15.
  43. Tomblyn M., Lazarus H.M. Donor lymphocyte infusions. The long and winding road: how should it be traveled? *Bone Marrow Transplant*. 2008; 42(9): 569—79.
  44. Lutz C., Massenkeil G., Nagy M., Neuburger S., Tamm I., Rosen O., et al. A pilot study of prophylactic donor lymphocyte infusions to prevent relapse in adult acute lymphoblastic leukemias after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2008; 41(9): 805—12.
  45. Bosch M., Khan F.M., Storek J. Immune reconstitution after hematopoietic cell transplantation. *Curr. Opin. Hematol.* 2012; 19(4): 324—35.
  46. Dazzi F., Szydlo R.M., Craddock C., Cross N.C., Kaeda J. Comparison of single-dose and escalating-dose regimens of donor lymphocyte infusion for relapse after allografting for chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2000; 95(1): 67—71.
  47. Miller J.S., Weisdorf D.J., Burns L.J., Slungaard A., Wagner J.E., Verneris M.R., et al. Lymphodepletion followed by donor lymphocyte infusion (DLI) causes significantly more acute graft-versus-host disease than DLI alone. *Blood*. 2007; 110(7): 2761—3.
  48. Koreth J., Antin J.H. Current and future approaches for control of graft-versus-host disease. *Expert Rev. Hematol.* 2008; 1(1): 111.
  49. Hoffmann P., Ermann J., Edinger M., Fathman C.G., Strober S. Donor-type CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells suppress lethal acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *J. Exp. Med.* 2002; 196(3): 389—99.
  50. Li Q., Zhai Z., Xu X., Shen Y., Zhang A., Sun Z., et al. Decrease of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells and TGF-β at early immune reconstitution is associated with the onset and severity of graft-versus-host disease following allogeneic haematogenesis stem cell transplantation. *Leuk. Res.* 2010; 34(9): 1158—68.
  51. Palmer J.M., Rajasekaran K., Thakar M.S., Malarkannan S. Clinical relevance of natural killer cells following hematopoietic stem cell transplantation. *J. Cancer*. 2013; 4(1): 25—35.
  52. Bellucci R., Edwin P., Weller E., Chillemi A., Hochberg E., Wu J., et al. Immunologic effects of prophylactic donor lymphocyte infusion after allogeneic marrow transplantation for multiple myeloma. *Blood*. 2002; 99(12): 4610—7.
  53. Parovichnikova E.N., Davidyan YU.R., Savchenko V.G. The protocol of treatment of adult patients with Ph-negative acute lymphoblastic leukemia ALL-2009. In: Savchenko V.G., ed. Program treatment of diseases of system of blood. Moscow: Practice (Protokol lechenija Ph-negativnyh ostryh limfoblastnyh lejkozov vzroslyh ALL-2009. V knige: Savchenko V.G., red. Programmnoe lechenie zabojevanij sistemy krovi. Moskva: Praktika). 2012: 287—342. (in Russian) [Паровичникова Е.Н., Давидян Ю.Р., Савченко В.Г. Протокол лечения Ph-негативных острых лимфобластных лейкозов взрослых ALL-2009. В кн.: Савченко В.Г., ред. Программное лечение заболеваний системы крови. М.: Практика; 2012: 287—342].
  54. Haidukov S.V., Zurochka A.V., Chereshev V.A., Totohyan A.A. Main and small peripheral blood lymphocyte populations human values and regulations (the method of multi-color flow cytometry analysis). *Medical Immunology. [Osnovnye i malye populjacji limfocitov perifericheskoi krovi cheloveka i ih normal'nye znachenija (metodom mnogocvetnogo citometricheskogo analiza). Medicinskaja immunologija]*. 2009; 3: 227—38. (in Russian) [Хайдуков С.В., Зурочка А.В., Черешнев В.А., Тотолян А.А. Основные и малые популяции лимфоцитов периферической крови человека и их нормальные значения (методом многоцветного цитометрического анализа). Медицинская иммунология. 2009; 3: 227—238].