

ФГБОУ ВО САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ АКАДЕМИКА И. П. ПАВЛОВА
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНО-КЛИНИЧЕСКИЙ ЦЕНТР ДЕТСКОЙ
ГЕМАТОЛОГИИ, ОНКОЛОГИИ И ИММУНОЛОГИИ ИМЕНИ ДМИТРИЯ
РОГАЧЕВА МИНИСТЕРСТВА РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

ПАИНА ОЛЕСЯ ВЛАДИМИРОВНА

**Аллогенная трансплантация стволовых гемопоэтических клеток
от гаплоидентичного донора в лечении первичной химиорезистентности и
рецидивов острых лейкозов
у детей и подростков**

14.01.21 – гематология и переливание крови

14.01.08 – педиатрия

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

Научные руководители:
доктор медицинских наук,
профессор Б. В. Афанасьев
доктор медицинских наук,
профессор А. Г. Румянцев

САНКТ-ПЕТЕРБУРГ - 2016

ОГЛАВЛЕНИЕ

Стр

Введение.....	2
Глава I АЛЛОГЕННАЯ ТРАНСПЛАНТАЦИЯ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ОТ ГАПЛОИДЕНТИЧНОГО ДОНОРА В ЛЕЧЕНИИ ПАЦИЕНТОВ С ОСТРЫМИ ЛЕЙКОЗАМИ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРНЫХ ДАННЫХ).....	10
Глава II МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ХАРАКТЕРИСТИКА ПАЦИЕНТОВ.....	45
Глава III РЕЗУЛЬТАТЫ ГАПЛО-ТГСК У ДЕТЕЙ И ПОДРОСТКОВ С ОСТРЫМ МИЕЛОБЛАСТНЫМ ЛЕЙКОЗОМ И ОСТРЫМ ЛИМФОБЛАСТНЫМ ЛЕЙКОЗОМ.....	58
Глава IV ОБЩИЕ ДАННЫЕ О РЕЗУЛЬТАТАХ ГАПЛО-ТГСК У ДЕТЕЙ И ПОДРОСТКОВ С РЕЗИСТЕНТНЫМИ ФОРМАМИ ОСТРЫХ ЛЕЙКОЗОВ.....	80
Глава V ОСЛОЖНЕНИЯ ПОСЛЕ АЛЛО-ТГСК ОТ ГАПЛОИДЕНТИЧНОГО ДОНОРА У ДЕТЕЙ И ПОДРОСТКОВ С РЕЗИСТЕНТНЫМИ ФОРМАМИ ОСТРЫХ ЛЕЙКОЗОВ.....	94
Глава VI ОБСУЖДЕНИЕ.....	104
ВЫВОДЫ.....	112
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	113
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	114
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	115

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток крови (алло-ТГСК) – один из основных методов лечения больных со злокачественными заболеваниями истемы крови у детей и взрослых, имеющих неблагоприятный прогноз течения (Афанасьев Б.В., 2011, Румянцев А.Г., Масчан А.А., 2009, 2015, Савченко В.Г., 2010; Finke J., Schmoor C., Bethge W.A., Ottinger H.D., Stelljes M., Zander A.R., et al. 2012). До последнего времени основными источниками трансплантата были гемопоэтические стволовые клетки (ГСК), полученные от совместимого по генам HLA-системы родственного или неродственного донора (костный мозг, периферические стволовые клетки крови, пуповинная кровь).

Результаты лечения с использованием алло-ТГСК зависят от стадии заболевания на момент трансплантации. Наибольшая эффективность алло-ТГСК показана в ремиссии заболевания, особенно в первой. Тем не менее, показания к проведению алло-ТГСК у детей в первой ремиссии острых лейкозов (ОЛ) ограничены вариантами, имеющими высокий риск рецидива на фоне проведения стандартных протоколов химиотерапии, основанными на анализе неблагоприятных факторов прогноза в момент постановки диагноза. Общая выживаемость после алло-ТГСК в 1-2-ой ремиссии составляет при ОЛЛ – 75%, ОМЛ – 53%, снижаясь в 3-ей и последующих ремиссиях до 20%. Однако, существует категория больных с резистентными рецидивами и первичной химиорезистентностью, где догоспичная выживаемость не превышает 10% (Peters C. et al. 2015, Locatelli F. 2008, Fuji S., 2015).

Развитие рецидива острого лейкоза (ОЛ) радикально изменяет характер течения заболевания, ускоряет принятие решения в пользу проведения одного из видов алло-ТГСК. При этом необходимо учитывать вероятность нестойкого характера и краткосрочность очередной ремиссии, либо невозможность достижения этого состояния. В этом случае увеличение доз цитостатических препаратов не способствует преодолению химиорезистентности, что может быть связано с процессом клональной эволюции ОЛ, наличием MDR-гена (Smith P.G.

2012), сопровождающемся повышенным риском органотоксических осложнений. Применение моноклональных антител (АТ), таких, как блинатумомаб (би-специфическое моноклональное АТ Т-клеток CD19/CD3) и клеточная терапия с использованием Т-клеток с химерным антигенным рецептором (CAR-T клеток) возможны лишь у части больных с В-линейным ОЛЛ (Ribera J.-M. 2015, Brentjens R. J. 2015). В этом случае применение алло-ТГСК, составляющими компонентами которой являются химиотерапия и иммунотерапия, не имеющая перекрёстной резистентности с химиопрепаратами, является наиболее перспективным вариантом лечения.

Известно, что только 15-20% больных имеют совместимого по генам HLA-системы родственного донора, только для 60-70% пациентов Российской Федерации существует вероятность нахождения совместимого неродственного донора из числа более 27,5 миллионов здоровых волонтеров в международной базе доноров костного мозга. Выбор образца пуповинной крови зачастую ограничен ввиду проблем, связанных с совместимостью по генам HLA-системы, качественными характеристиками (низким содержанием CD34+/кг веса реципиента), высоким риском первичного неприживания после алло-ТГСК (Rocha V., Gluckman E. 2006). Кроме того, поиск и активация неродственного донора и образцов пуповинной крови - дорогостоящая процедура, требующая затраты времени. В результате, до окончания поиска, подавляющая часть больных с резистентным рецидивом и первичной химиорезистентностью не доживают.

Алло-ТГСК от гаплоидентичного донора (гапло-ТГСК) имеет ряд важных преимуществ: доступность и высокая мотивированность донора (родители, гаплоидентичные сиблинги), возможность выбора донора с учётом НК-аллореактивности (KIR-системы), при необходимости быстрая заготовка ГСК для повторной гапло-ТГСК или иммуноадаптивной терапии (лимфоциты, НК-клетки). В настоящее время результаты гапло-ТГСК у детей в ремиссии ОЛ приближаются к данным, полученным при выполнении алло-ТГСК от родственного и неродственного доноров: 5-летняя общая выживаемость (ОВ) при ОМЛ – 70%, 60%, 55%, при ОЛЛ – 75%, 70%, 65%, соответственно (Aversa F. 2005, Locatelli F.

2008, Масчан М.А., 2015, Менткевич Г.Л., 2015). Использование миелоаблативных режимов кондиционирования (МАК) и режимов со сниженной интенсивностью доз (РИК) значительно не влияет на ОВ (Li G, 2015, Kongtim P., 2016). Однако достигнуть ремиссии заболевания больным с резистентным рецидивом и первичной химиорезистентностью перед алло-ТГСК от гаплоидентичного донора практически не возможно. Летальность в этой группе больных без алло-ТГСК от гаплоидентичного донора достигает 90-100%. Долгосрочная ОВ больных, трансплантированных в активной фазе лейкоза, не превышает 10-16% (Fuji S., 2015, Raiola A., 2014). В настоящее время лишь некоторые исследовательские группы пытаются улучшить показатели ОВ у этой категории больных (Huang X.J., 2006, 2014, Handgretinger R., 2011, 2014).

Несмотря на успехи, алло-ТГСК от гаплоидентичного донора остаётся одним из наиболее сложных методов лечения. Это сопряжено с необходимостью преодоления барьера гистосовместимости при несовместимости по генам HLA-системы, вероятностью неприживления и развитием тяжёлых осложнений – острой реакции «трансплантат против хозяина» (oРТПХ) (Chang Y-J., 2014), инфекционных осложнений (Park BG., 2015, Luo XH., 2014). Характер осложнений зависит от условий, обеспечивающих выраженность иммунологической толерантности между реципиентом и ГСК донора, что, в свою очередь, определяют варианты подготовки реципиента к гапло-ТГСК, способы заготовки ГСК, методы профилактики oРТПХ (Sun Y., 2015., Castagna L. 2015, Li G, 2015).

Изучение качественных характеристик трансплантата выявило ряд важных особенностей, связанных с методами «очистки» (деплегия Т-лимфоцитов), способами, направленными на изменение иммуномодулирующих свойств. Так, несмотря на то, что 3-летняя БРВ при ОЛ в ремиссии после гапло-ТГСК с деплецией CD3/CD19, $\alpha\beta$ -Т-лимфоцитов *ex vivo* достигает 46% (Reisner Y., 2014, Handgretinger R., 2008, 2011, Bader P., 2011, Maschan M., 2016), гапло-ТГСК с Т-клеточной деплецией ГСК *ex vivo*, как правило, сопровождается высоким риском инфекционных осложнений и увеличивает вероятность рецидива

основного заболевания (Aversa F., 2003). Другим вариантом является проведение Т-клеточной деплеции *in vivo*, что имеет ряд преимуществ. Среди них – простота выполнения, отсутствие манипулирования с трансплантатом *ex vivo*, что значительно уменьшает вероятность потерь CD34+клеток и контаминации. Т-клеточная деплеция *in vivo* осуществляется включением в режим кондиционирования антилимфоцитарного (тимоцитарного) иммуноглобулина (АЛГ/АТГ) (Luo Y., 2014), либо применением для профилактики оРТПХ циклофосфана в Д+3, Д+4 в дозе 50 мг/кг веса реципиента после гапло-ТГСК. В дополнение, качественный состав трансплантата может быть модулирован путём снижения активации цитотоксических лимфоцитов изменением поляризации в направлении от Th1 к Th2 при введении донору Г-КСФ в дозе 5 мкг/кг за 1-2 дня до миелоэкспузии (Franzke A., 2003, Luznik L., 2008, Wang Y., Huang X.J., 2012, Moiseev I.S., Afanasyev B.V., 2016).

Несмотря на многочисленные исследования, проводимые в последние годы, роль алло-ТГСК от гаплоидентичного донора у детей с ОЛ остаётся изучена недостаточно, особенно не оценены возможности терапии резистентных вариантов ОЛ, являющиеся зачастую состояниями, не имеющими положительных перспектив лечения. Отсутствуют данные об оптимальном выборе режима кондиционирования, источнике ГСК (ПСКК, КМ или КМ+ПСКК), профилактике оРТПХ, не установлены факторы, способствующие повышению эффективности гапло-ТГСК у этой категории пациентов, что определяет актуальность изучения этой проблемы.

Степень разработанности темы исследования.

В настоящее время, основной проблемой остается улучшение результатов ОВ у больных с первичной химиорезистентностью и резистентным течением рецидивов. Чрезвычайно мало данных о результатах алло-ТГСК от гаплоидентичного донора в активной фазе болезни. Практически отсутствуют исследования, способствующие улучшению ОВ у этой группы больных, в ранний посттрансплантационный период с целью достижения долгосрочной ОВ.

До настоящего времени в России выполнялись единичные исследования в области алло-ТГСК от гаплоидентичного донора у детей и подростков, находящихся в

ремиссии острых лимфобластного и миелобластного лейкозов с достижением 2-х или 3-х летней ОВ от 57% (Менткевич Г.Л., Долгополов И.С.) до 72% (Масчан М.А, 2016).

Цель работы. Изучить эффективность аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток от гаплоидентичного донора в терапии детей и подростков с рецидивом и резистентным течением острого лейкоза.

Задачи диссертационной работы:

1. Выявить факторы, влияющие на общую выживаемость после алло-ТГСК от гаплоидентичного донора у детей в рецидиве и резистентном течении ОМЛ и ОЛЛ.
2. Выявить влияние источника гапло-ГСК (праймированный костный мозг или комбинация праймированного костного мозга и манипулированных периферических стволовых клеток крови) на характер осложнений и общую выживаемость пациентов после трансплантации.
3. Определить структуру летальности, связанной с ранним и поздним периодами после алло-ТГСК от гаплоидентичного донора.
4. Выявить факторы, способствующие развитию оРТПХ после алло-ТГСК от гаплоидентичного донора.
5. Оценить эффективность применения посттрансплантационного циклофосфана на частоту развития оРТПХ.
6. Для проспективной оценки результатов лечения и выбора терапии после трансплантации, создать прогностическую модель при выполнении алло-ТГСК от гаплоидентичного донора у детей в рецидиве острого лейкоза.

Положения, выносимые на защиту:

1. Аллогенная трансплантации гемопоэтических стволовых клеток от гаплоидентичного донора приводит к долгосрочной ремиссии заболевания у 33% пациентов с рецидивом острого лейкоза.
2. Циторедуктивная химиотерапии до трансплантации при ОЛЛ и поддерживающая терапия после трансплантации при ОЛЛ и ОМЛ способствуют увеличению общей выживаемости после алло-ТГСК от гаплоидентичного донора

у детей с рецидивом острых лейкозов.

3. Характер осложнений и общая выживаемость после алло-ТГСК от гаплоидентичного донора достоверно не отличаются в зависимости от источника гапло-ГСК – праймированный костный мозг или комбинация праймированного костного мозга и манипулированных периферических стволовых клеток крови.

4. Общая выживаемость детей с резистентным течением острого лейкоза после алло-ТГСК от гаплоидентичного донора различна и зависит от следующих факторов: возраст до 9 лет, достижения приживления ГСК донора и восстановления лимфоцитов до уровня $0,3 \times 10^9/\text{л}$ к Д+30 в комбинации с применением одного из вариантов терапии после трансплантации.

5. Острая РТПХ после алло-ТГСК от гаплоидентичного донора развивается с частотой 71,7% и является основным осложнением раннего периода, вероятность возникновения не зависит от возраста, диагноза, режима кондиционирования, совместимости пары донор/реципиент по группе крови, однако увеличена при доноре-матери, возникает реже при применении циклофосфана в Д+3, Д+4 после трансплантации, что не является фактором, увеличивающим частоту рецидива.

6. Летальность раннего периода до 100 дней не связана с развитием острой РТПХ – 7,9%, инфекционными осложнениями – 10,5%, основной причиной летальности до и после 100 дней являлись рецидивы острого лейкоза – 35,7%, что требует своевременного назначения поддерживающей ХТ или иммуноадаптивной терапии.

Степень достоверности. Степень достоверности результатов проведенного исследования подтверждается достаточной выборкой пациентов, позволившей получить значимые различия в сравниваемых группах при проведении анализа с использованием современных статистических программ.

Научная новизна. Впервые проведено ретроспективное и проспективное исследование эффективности алло-ТГСК от гаплоидентичного донора у детей с рецидивом и резистентным течением ОЛ на основании комплексной оценки режимов кондиционирования различной интенсивности, источников ГСК

(праймированный КМ+ПСКК с позитивной селекцией CD34+клеток, праймированный КМ), профилактики оРТПХ с введением циклофосфана после гапло-ТГСК. Выявлены факторы, влияющие на эффективность гапло-ТГСК, и установлена взаимосвязь между ними в исследуемой группе больных. Произведена оценка общей выживаемости и построена прогностическая модель для данной группы пациентов.

Практическая значимость исследования. Выполнение гапло-ТГСК пациентам с резистентным течением ОЛ и рецидивом приводит к достижению полной ремиссии заболевания, сохраняющейся в течение длительного периода времени, что даёт возможность для продолжения терапии в комплексе с таргетными препаратами, иммунотерапией, химиотерапией.

Внедрение результатов исследования. Основные результаты работы внедрены в практическую и научно-исследовательскую деятельность НИИ ДОГиТ им. Р.М.Горбачевой, ФНКЦ детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева, отделения химиотерапии лейкозов ГУЗ «Детская городская больница №1» (СПб), ГУЗ «Городская клиническая больница №31» (СПб) отделение детской онкологии, гематологии и генетических болезней.

По теме диссертации опубликовано 40 печатных работ, из них 13 статей в журналах, рекомендованных ВАК. Научные положения диссертации используются в лекциях и практических занятиях с интернами, клиническими ординаторами, слушателями и аспирантами кафедры гематологии, трансфузиологии и трансплантологии ФПО ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им.акад. И.П.Павлова Минздрава России.

Апробация диссертации.

Основные положения диссертационной работы доложены на симпозиуме Европейской группы по трансплантации костного мозга (EBMT Annual Meeting) (Италия, г. Флоренция, 2008; Австрия, г. Вена 20010, Франция г. Париж, 2011, Швейцария, г. Женева 2012, Англия, г. Лондон 2013, Турция, г.Стамбул 2015), ежегодном Международном симпозиуме, посвященном памяти Р.М.Горбачевой «Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток» (Россия, г. Санкт-

Петербург 2008, 2009, 2010, 2011, Казахстан, г.Астана 2013, Россия, г.Сочи 2015).

Структура и объем диссертации

Материалы диссертации изложены в одном томе на 145 страницах компьютерного текста, содержат 14 таблиц, 38 рисунков и 1 схему. В библиографический указатель включено 237 литературных источника, в том числе отечественных авторов – 26, иностранных - 211. Работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, двух глав, посвященных результатам собственных исследований, их обсуждения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы.

Работа выполнена в Научно-Исследовательском Институте детской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р.М. Горбачевой ФГБОУ ВО СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова.

ГЛАВА 1

АЛЛОГЕННАЯ ТРАНСПЛАНТАЦИЯ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ОТ ГАПЛОИДЕНТИЧНОГО ДОНОРА В ЛЕЧЕНИИ ПАЦИЕНТОВ С ОСТРЫМИ ЛЕЙКОЗАМИ

Аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК) – один из наиболее эффективных методов лечения больных со злокачественными и незлокачественными заболеваниями системы крови, наследственными болезнями, дающий надежду на полное излечение (Афанасьев Б.В. 2002, 2015). Отсутствие совместимого донора остается главным лимитирующим фактором более широкого применения данного метода лечения. Приблизительно 70% пациентов, имеющих показания к алло-ТГСК, не имеют родственного совместимого по генам системы HLA донора. К альтернативным источникам относятся ГСК, полученные от неродственного донора, гаплоидентичного донора и пуповинной крови. Однако совместимый по генам HLA-системы неродственный донор может быть найден лишь для 70% нуждающихся в алло-ТГСК больных из числа здоровых волонтеров, зарегистрированных в Международной базе данных доноров костного мозга (Bone Marrow Donors Worldwide – BMDW), насчитывающей на данный момент 27,5 миллионов потенциальных доноров костного мозга. Возможность нахождения совместимого неродственного донора зависит от этнической и расовой принадлежности пациента, снижается в случае принадлежности к малым народностям (Zuckerman T., Rowe J. 2007). Другим фактором, лимитирующим проведение алло-ТГСК от неродственного донора, является длительность поиска, которая составляет в среднем 3-5 месяцев, что для многих пациентов является неприемлемым в связи с высоким риском развития рецидива или прогрессии заболевания. При использовании ГСК пуповинной крови значительно укорачивается временной промежуток необходимый для поиска подходящего по генам HLA-системы образца, при этом могут рассматриваться образцы с различной степенью совместимости – от 4 до 6 генов. Результаты трансплантации пуповинной крови определяются не только совместимостью, но и дозой ГСК, что создает

дополнительные ограничения для использования данного источника у взрослых пациентов. При наличии частичной совместимости трансплантация низких доз ГСК ассоциирована с высокой трансплантационной смертностью. (Gonza'lez-Vicent M., 2011, Chen J. 2014, Beatty P.G., 1985, Reisner Y. 1995).

Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток от частично HLA-совместимого (гаплоидентичного) родственного донора - быстрый и универсальный метод лечения, который имеет ряд преимуществ по сравнению с ГСК от совместимого неродственного донора и образцов пуповинной крови (Huang X. et al. 2008):

1) Быстрая активация донора, в большинстве случаев пациенты имеют гаплоидентичного донора, высокая мотивированность доноров (родители, сиблинги).

2) Возможность выбрать лучшего донора, базируясь на аллореактивности клеток натуральных киллеров (НК-аллореактивность).

3) Незамедлительная доступность донора при необходимости проведения повторной трансплантации, иммуноадоптивной терапии (превентивного и профилактического введения донорских лимфоцитов, НК-клеток).

В настоящее время алло-ТГСК от гаплоидентичного донора применяется при острых лейкозах (Gao L. И соавторы, 2015,), лимфомах (Railola A., 2013), наследственных заболеваниях, среди которых гемоглобинопатии (Gluckman E., 2013, Talino J., 2014, Anurathapan U., 2016), первичных иммунодефицитах (Lanfranchi A., 2000), болезнях накопления (остеопетроз, мукополисахаридоз VI типа) (Jester S., 2013), внедряется при апластической анемии (Im H., 2013, Zhang Y., 2016), обсуждается при пароксизмальной ночной гемоглобинурии (ПНГ) (Tian H., 2016), в качестве повторной трансплантации при развитии отторжения (Tischer J., 2014). При этом рядом исследователей показано преимущество гапло-ТГСК в достижении долгосрочной ОВ пациентов с прогностически неблагоприятными вариантами острых лейкозов, например, Ph(+) острым лейкозе (Gao L. et al., 2015)

Разработка гапло-ТГСК активно ведется в мире в течение последних 30 лет.

Основными недостатками гаплоидентичного донора является возможность развития тяжелой оРТПХ и иммунной реакции клеток реципиента, направленной против клеток донора, реакции «хозяин против трансплантата» (РХПТ), обусловленной аллореактивностью Т-клеток, которые распознают HLA-гены I и II класса большого комплекса гистосовместимости между донором и реципиентом (Beatty P. et al. 1985, Долгополов И.С. 2003, Масчан М.А. 2015, Субботина Н.Н. 2014), что приводит к высокой вероятности отторжения трансплантата. Поэтому, первые попытки использовать гаплоидентичного донора у больных с острыми лейкозами не увенчались успехом.

С 80-х годов прошлого столетия способы преодоления барьера гистосовместимости были направлены на интенсификацию режимов кондиционирования с целью достижения максимального миелоаблативного и, особенно, иммуноаблативного эффектов (Trigg M. et al. 1989; Vozdech M. et al. 1985). В дополнение к этому анализировались способы, направленные на деплецию Т-клеток трансплантата *in vivo* введением антитимоцитарного глобулина (АТГ), в том числе с вариантами доз препарат от 4,5 до 20 мг/кг (Luo Y., 2014, Aversa F., 1998), или *ex vivo* с применением антител T10B9 против фрагмента рецептора Т-клеток и лизиса связанных клеток в среде с комплементом (Henslee-Downey P. et al. 1996), в комбинации с терапией циклоспорином А и глюкокортикостероидами.

Разработка в последние десять лет режимов кондиционирования, манипуляции с трансплантатом и фармакологической профилактики РТПХ, существенно снизили риск развития оРТПХ и смертность после гапло-ТГСК (Symons H. and Fuchs E. 2008; Szydlo R. et al. 1997; Godder K. et al. 2000; Drobyski W. et al. 2002, Yesilipek M., 2015, Luo R., 2015).

Манипуляции с трансплантатом, Т-клеточная деплеция ex vivo.

Реактивация Т-лимфоцитов, содержащихся в трансплантате ГСК донора, играет основную роль в инициации оРТПХ. С целью уменьшения количества Т-

лимфоцитов, а также В-лимфоцитов донора в трансплантате могут использоваться методы позитивной и негативной селекции, историческими из которых являются:

1) фракционирование костного мозга на основании физических характеристик (в настоящее время не применяется).

2) прямая Т-клеточная деплеция с использованием лектин агглютинации «in vitro» или моноклональных антител (моно-АТ) «in vitro» и «in vivo» (Henslee-Downey P. et al. 1997) (не применяется).

Значительный прогресс в применении гапло-ТГСК произошел с разработкой метода позитивной селекция CD34⁺ клеток или CD133⁺ предшественников с использованием иммуномагнитных колонок «in vitro» (Lang P. et al. 2004; Peters C. et al. 1999; Schumm M. et al. 1999, Aversa F., 1998, Locatelli F., 2013)

Первое клиническое исследование базировалось на доклинических исследованиях на мышях, которые показали, что полное донорское приживление без признаков РТПХ может быть достигнуто при эскалации Т-деплетированного костного мозга у сублетально облученных мышей (Lapidot T. et al. 1989; Bachar-Lustig E. et al. 1995). В первое клиническое исследование данной технологии было включено 17 больных с острым лейкозом высокого риска. Миелоаблативный режим кондиционирования на основе тотального облучения в 8 Гр (однофракционно) содержал тиотепу, циклофосфан и АТГ. Респициентам трансплантировали ГСК костного мозга и мобилизованные Г-КСФ ПСКК, которые были деплетированы при помощи агглютинина соевых бобов и Е-розеточного способа. Приживление трансплантата отмечалось у 16 из 17 больных, оРТПХ наблюдалась в 18%, дальнейшая иммуносупрессивная терапия не проводилась (Aversa F. et al. 1994; Reisner Y. et al. 1995). Затем были введены следующие модификации: с целью уменьшения негематологической токсичности циклофосфан заменён на флюдарабин, также изменилась процедура обработки трансплантата.

Т-клеточную деплецию осуществляли позитивной иммуноселекцией CD34⁺ клеток (Aversa F. et al. 1998; Aversa F. et al. 2005), также было отменено

посттрансплантационное введение Г-КСФ, так как это ухудшает продукцию ИЛ-12 дендритическими клетками, что приводит к ненормальной антиген презентации и активации Т-клеток (Volpi I. et al. 2001). Медикаментозная профилактика оРТПХ после гапло-ТГСК не проводилась. Эти стратегические изменения позволили добиться приживления донорского трансплантата в 95% случаев у 255 больных с острым лейкозом с крайне низкой частотой возникновения оРТПХ и хрРТПХ (Aversa F., Reisner Y., Martelli M. 2008).

Быстрое приживление трансплантата, низкая частота развития оРТПХ и хрРТПХ, как у детей, подростков и молодых взрослых, так и у пациентов старше 50 лет является несомненным достоинством при данном виде гапло-ТГСК. По результатам исследований профессора F. Aversa и соавт., наиболее высокая общая выживаемость у взрослых больных наблюдалась при остром миелобластном лейкозе, в ремиссии (ОМЛ) около 55%, значительно хуже в ремиссии при остром лимфобластном лейкозе (ОЛЛ) – 28%; однако у детей общая выживаемость при остром лейкозе составила 47%, при врожденных и наследственных заболеваниях 87% (Aversa F. et al. 2004).

Частота возникновения рецидивов заболевания у больных при проведении гапло-ТГСК в ремиссии заболевания составила при ОМЛ 18%, ОЛЛ – 30%. Кумулятивная частота смертности, связанной с процедурой трансплантации, для 145 больных в любой из ремиссий заболевания на момент гапло-ТГСК составила 0,36 (с 95% интервалом достоверности 0,29-0,53) и 0,58 для 110 пациентов трансплантированных в рецидиве острого лейкоза (с 95% интервалом достоверности 0,40-0,65) (Aversa F., Reisner Y., Martelli M. 2008). Безрецидивная 17-летняя выживаемость больных, трансплантированных в статусе ремиссии заболевания, была равна для пациентов с ОМЛ 43%, с ОЛЛ 30%.

Необходимо отметить, что пациенты, трансплантированные в рецидиве заболевания ОМЛ, имели значительно ниже безрецидивную выживаемость, которая составила 18%. Однако, все выжившие больные имели хорошее качество жизни ввиду отсутствия признаков хрРТПХ (Aversa F. 2011).

При этом было показано значение мега-дозы CD34⁺ (в среднем более 10x10⁶

по $CD34^+$ /кг веса реципиента) не только для приживления трансплантата после назначения МАК с включением тотального облучения тела (TOT), но и с целью дополнительного иммуносупрессивного эффекта, обеспечивающего «вето» пролиферации Т-лимфоцитов. (Aversa F., 1998).

Европейская ассоциация по трансплантации костного мозга (EBMT) опубликовала результаты ретроспективного многоцентрового исследования по применению мега-доз гапло-ГСК. Результаты оказались сравнимыми с исследователями из Перуджи: для пациентов с ОМЛ, трансплантировавшихся в первой ремиссии заболевания, безрецидивная выживаемость составила 48% (Ciceri F. et al. 2011).

На рисунке 1 представлены данные о безрецидивной выживаемости больных с острым лейкозом исследовательской группы из Перуджи, Италия (А), многоцентрового исследования Европейской ассоциации по трансплантации костного мозга (В) и безрецидивная выживаемость для детей с ОЛЛ после Т-клеточной деплеции при помощи позитивной иммуноселекции $CD34^+$ (С).

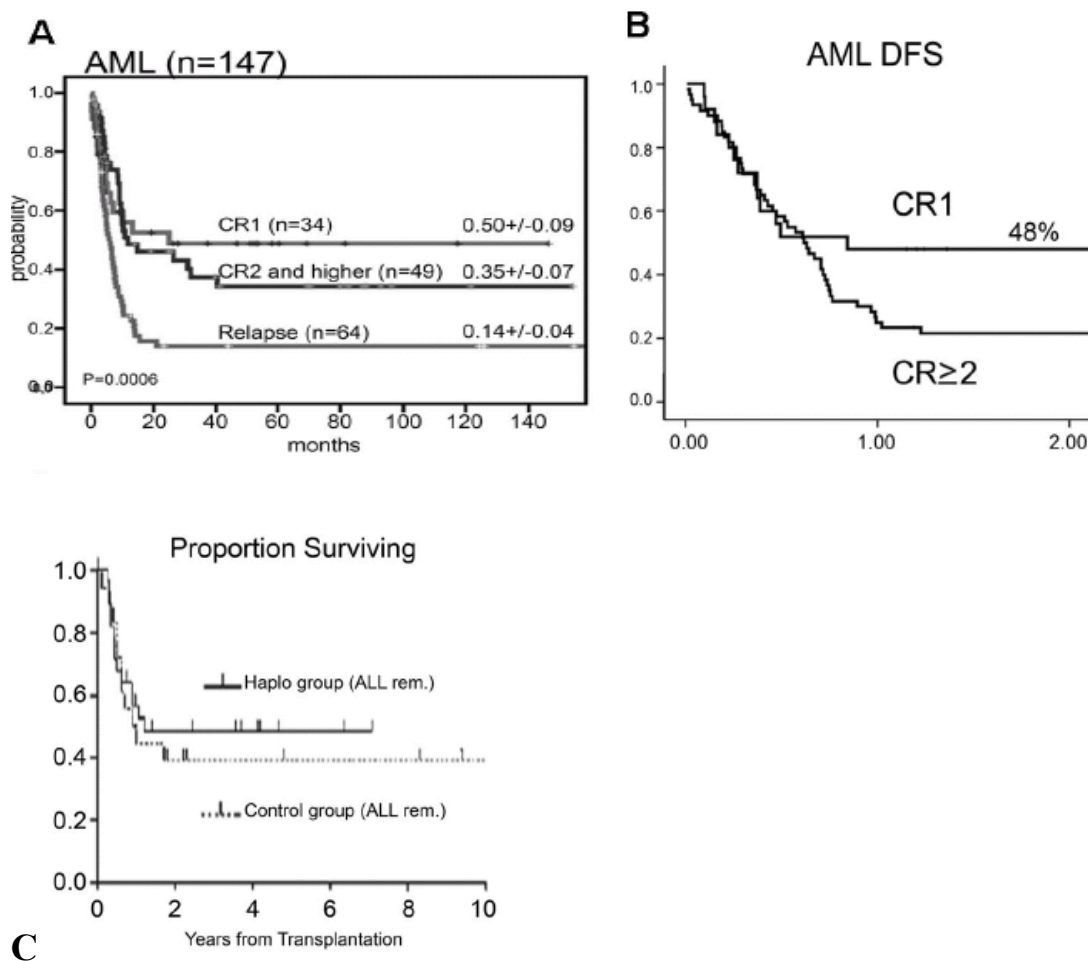


Рисунок 1 Результаты исследований по гаплоидентичной ТГСК

График А: результаты исследовательской группы из Перуджи, Италия, безрецидивная выживаемость больных с ОМЛ трансплантированных в любой ремиссии или рецидиве.

График В: результаты многоцентрового исследования EBMT, безрецидивная выживаемость 173 больных с острым лейкозом высокого риска (в I ремиссии n=25 и более чем II ремиссии n=148)

График С: безрецидивная выживаемость для детей с ОЛЛ после гапло-ТГСК с Т-клеточной деплеции при помощи позитивной иммуноселекции CD34⁺ (n=28) по сравнению с аллогенной неродственной полностью совместимой (n=18) в ремиссии заболевания.

AML – ОМЛ; ALL – ОЛЛ; CR1 – ремиссия I; CR2 – ремиссия II и более; Relapse – рецидив; Haplo group – гаплогруппа; Control group – контрольная группа.

Эти результаты выдвигают на первый план несколько аспектов, заслуживающих внимания (Reisner Y., Hagin D., Martelli M. 2011):

1. Большое количество CD34⁺ клеток в трансплантате способствует преодолению барьера гистосовместимости;
2. Пороговая доза $2,0 \times 10^4$ /кг веса реципиента по CD3⁺ Т-клеток практически не вызывает ОРТПХ, даже при отсутствии какой-либо иммуносупрессии после трансплантации. При этом длительный период полувыведения АТГ из плазмы, после использования в режиме кондиционирования, вызывает дополнительную Т-клеточную деплецию «in vivo», что способствует уменьшению частоты и тяжести РТПХ.
3. Высокую частота развития рецидивов при выполнении гапло-ТГСК с Т-клеточной деплецией, ввиду отсутствие РТПХ, по мнению профессора MF Martelli, Перуджи, Италия, может быть нивелирована несколькими факторами –

миелоаблативный режим кондиционирования, наличие НК-аллореактивности между донором и реципиентом, отсутствие фармакологической иммуносупрессивной терапии.

4. Относительно высокий уровень смертности при трансплантации может быть обусловлен медленным иммунным восстановлением после данного вида гапло-ТГСК, клиническим состоянием больного на момент трансплантации, наличием сопутствующих заболеваний и статусом заболевания на момент гапло-ТГСК. Большинство смертей связано с оппортунистическими инфекциями (цитомегаловирусная инфекция, инвазивный аспергиллез). Риск развития угрожающих жизни инфекционных эпизодов после гапло-ТГСК снижается по прошествии года и выходит на плато. Подтверждение этому, отсутствие инфекций после полного иммунологического восстановления у больных, не получивших иммуносупрессивной терапии и не имеющих признаков хрРТПХ.

Дальнейшее совершенствование метода связано с группой исследователей из Тюбнгена, Германия, продемонстрировавших обнадеживающие результаты по применению мега-доз гаплоидентичных CD34⁺ с использованием позитивной иммуноселекции (медиана 20,7 x 10⁶/кг веса реципиента) у 39 детей, страдавших онкогематологическими заболеваниями, после миелоаблативного режима кондиционирования с использованием анти CD3 моноклонального антитела ОКТ-3. Быстрое приживление трансплантата наблюдалось у 36 больных и крайне низкая частота РТПХ. От рецидива заболевания погибло 13 пациентов, смерть, связанная с процедурой трансплантации зафиксирована у 10 реципиентов. При среднем сроке наблюдения в два года 15 пациентов из 39 были живы и хорошо себя чувствовали (Handgretinger R. et al. 2001). В более поздних исследованиях той же группы безрецидивная выживаемость для 28 больных с ОЛЛ/НХЛ в ремиссии заболевания, которые получили гаплоидентичные CD34⁺ с использованием позитивной иммуноселекции, была сопоставима с таковой у больных после аллогенной неродственной трансплантацией и составила 48% против 38% соответственно (p=0,6). Более того, не наблюдалось существенной

разницы в безрецидивной выживаемости в этих группах со сроком наблюдения 3 года (Lang P. et al. 2004).

Аналогичные результаты были представлены исследовательской группой под руководством профессора Locatelli, Павиа, Италия (Locatelli F. et al. 2009, 2013).

Следующий этап развития технологии гапло-ТГСК связан с внедрением деплеции Т-лимфоцитов с анти-CD3 (Handgretinger R. et al. 2001, 2011, 2014, Chen X. et al. 2006) и анти-CD19 колонками, и возможной комбинацией с МАТ (анти-CD20, Ритуксимаб), потенцирующими деплецию В-лимфоцитов «in vivo». Применение CD3/CD19 Т-клеточной деплеции в основном используется трансплантационными клиниками в Тюбингене, Германия и Мемфисе, США у взрослых и детей с острыми лейкозами. В режим кондиционирования входят: флюдарабин ($150-200 \text{ мг/м}^2$), тиотепа (10 мг/кг), мелфалан (120 мг/м^2) и моноклональное антитело анти-CD3 ОКТ-3 (5 мг/день с минус 5 по 14 день после гапло-ТГСК). С целью Т-клеточной деплеции трансплантата был применен иммуномагнитный метод с анти-CD3 и анти-CD19 моноклональными антителами с сохранением достаточного количества НК-клеток и моноцитов. В первое исследование было включено 29 взрослых пациентов высокого риска с резистентным течением болезни или рецидивом. При анализе результатов гапло-ТГСК у 28 из 29 реципиентов достигнуто приживание трансплантата и полный донорский химеризм. Частота развития оРТПХ была выше, чем после трансплантации с использованием иммуномагнитной позитивной селекции CD34⁺ клеток и составила 34% II⁰ степени и 14% III⁰-IV⁰ степени. Общая выживаемость была равна 31% с медианой наблюдения 241 день. Рецидив заболевания стал причиной смерти у 12 из 20 больных, 7 пациентов погибли от инфекционных осложнений и 1 реципиент от РТПХ (Bethge W. et al. 2008).

Bader P. et al., 2011 опубликовали данные о применении гапло-ТГСК с иммуномагнитной CD3/CD19 деплецией у 22 детей с острым лейкозом. Режим кондиционирования включал флюдарабин, мелфалан и тиотепу. Все пациенты достигли быстро приживания трансплантата, смертность, связанная с

процедурой трансплантации составила 10,7%, а 3-летняя вероятность выживаемости для больных, трансплантированных в ремиссии заболевания достигла 68% (Bader P. et al. 2011). Gonzalez-Vicent et al., 2011 опубликовали результаты применения того же протокола у детей с ОЛЛ. В исследовании было достигнуто значительное улучшение безрецидивной выживаемости ($41\% \pm 13\%$ против $26\% \pm 9\%$), низкая частота смертности, связанная с трансплантацией ($25\% \pm 9\%$ против $47\% \pm 9\%$) и низкая частота оРТПХ ($19\% \pm 7\%$ против $44\% \pm 10\%$) после гапло-ТГСК по сравнению с трансплантацией ГСК из образца пуповинной крови, которые проводились в один период времени (Gonzalez-Vicent M. et al. 2011).

Эти данные в дальнейшем были подтверждены многочисленными исследованиями. Однако, было также отмечено увеличение частоты РТПХ, по сравнению с гапло-ТГСК с использованием иммуномагнитной позитивной селекцией $CD34^+$, что может быть результатом вариабельности количества Т-клеток в трансплантате.

С целью повышения эффективности Т-клеточной деплеции трансплантата, полученного из ПСКК, исследовательская группа профессора Handgretinger R., Тюбенген, Германия совместно с исследовательской группой профессора Locatelli F., Рим, Италия разработали новый протокол прямой TCR альфа/бета и CD19 деплеции Т-лимфоцитов, теоретически обосновав сохранность свойств трансплантата, связанных с иммунодепрессивным эффектом «трансплантат против лейкоза» и инфекционной защитой. Сущность метода заключается в удалении из трансплантата $\alpha\beta$ -Т-лимфоцитов при помощи биотинилированного анти-TcR $\alpha\beta$ моноклонального антитела с дальнейшим использованием иммуномагнитного метода с антибиотин конъюгированным антителом. При этом методе иммуномагнитной сепарации сохраняются $\gamma\delta$ -Т лимфоциты, НК клетки и другие клетки трансплантата. Кроме того, CD19 В-лимфоциты были также удалены с целью профилактики посттрансплантационных лимфопролиферативных заболеваний ассоциированных с Эпштейн-Барр вирусной инфекцией. Деплецию CD19 В-лимфоцитов и $\alpha\beta$ -Т лимфоцитов осуществляли при помощи аппарата

CliniMACS® (Miltenyi Biotec). В первое исследование было включено 23 пациента, трансплантированных в двух центрах: университетская клиника г.Тюбнген (10 больных с онкогематологическими заболеваниями), и детский госпиталь Джесу, Рим (13 пациентов с онкогематологическими заболеваниями). В целом данные показали, что трансплантация TcR $\alpha\beta^+$ /CD19 деплетированных ГСК от гаплоидентичного донора способна достичь устойчивого приживания трансплантата, быстрого иммунного восстановления и низкой частоты развития как оРТПХ, так и хрРТПХ. (Handgretinger R. et al. 2011; Chaleff S. et al. 2007). В дальнейшем было подтверждено, что применение данной технологии позволяет достигнуть 2-х летней ОВ на уровне 72 % у пациентов с ОМЛ, высоким риском заболевания (Maschan M.A.,2016).

Данный метод подготовки ГСК с успехом может применяться при гапло-ТГСК у пациентов с незлокачественными заболеваниями (Bertaina A., 2014).

Гаплоидентичная ТГСК при частичной или полном отсутствии T-клеточной деплеции.

В последние годы большой интерес представляет гаплоидентичная трансплантация неманипулированных ГСК. По данным китайских исследователей Huang et al., 2004, использование в качестве трансплантата Г-КСФ праймированного нативного костного мозга и ПСКК в комбинации с интенсивной профилактикой оРТПХ, снижает риск смертности связанной с процедурой трансплантации и улучшает долгосрочную выживаемость больных (Huang X. et al. 2004).

В первое исследование было включено 250 больных с острым лейкозом после гапло-ТГСК, 87 пациентов отнесены в группу высокого риска. В основе протокола были следующие обязательные элементы (Huang X. et al. 2006):

1. Стимуляция Г-КСФ всех гаплоидентичных доноров;
2. Интенсивная иммуносупрессивная терапия с использованием АТГ в режиме кондиционирования (РК);
3. Комбинированная трансплантация ГСК праймированного костного

мозга и периферических стволовых клеток крови.

4. Отсутствие Т-клеточной деплеции *ex vivo*.

Необходимость комбинации праймированного костного мозга со стимулированными неманипулированными ПСКК объясняется стремлением преодоления иммунологического барьера гистосовместимости при гапло-ТГСК путем введения трансплантата высокой клеточности по CD34⁺ клеткам, что было оценено ранее на основании увеличения после стимуляции колониеобразующей способности гемопоэтических стволовых клеток в трансплантате в 7-10 раз (Aversa F. et al. 1994).

Кроме того, первые исследования показали, что использование гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (Г-КСФ) у доноров перед получением ГСК костного мозга и ПСКК, приводит к иммуномодулирующему эффекту, приводящему к изменению иммунного ответа – уменьшению реактивности Т-лимфоцитов и изменению баланса между Th1 и Th2 (Chen S., Li X., Huang X. 2004; Jun H., Jun C., Yu Z. 2004; 2005; Rutella S. et al. 2005; Chang Y. et al. 2009). Считается, что эффект Г-КСФ на Т-клетки развивается опосредовано через другие эффекторные клетки, такие как моноциты CD40⁺ ГМ-клетки и дендритические клетки 2 типа (DC2, плазмацитоидные дендритные клетки) (Chen S., Li X., Huang X. 2004; Jun H., Jun C., Yu Z. 2004; 2005; Chang Y. et al. 2009). Franzke et al., 2003 сообщили, что Г-КСФ может непосредственно модулировать Т-клеточную иммунную реакцию через Г-КСФ рецептор (Franzke A. et al. 2003). Morries et al., 2006 предполагают, что после использования у здоровых доноров Г-КСФ, три основных иммуномодулирующих эффекта могут привести к уменьшению оРТПХ. Во-первых, Т-клетки донора регулируют GATA3 и дифференциация смещена в сторону Th2, ограничивая функцию Th1 зависимых моноцитов после алло-ТГСК. Во-вторых, Г-КСФ индуцирует поколение Т-регуляторных клеток Tr1 посредством продукции интерлейкина 10 (ИЛ-10). В-третьих, Г-КСФ стимулирует выработку регуляторных антиген презентующих клеток (АПК) донора (незрелых миелоидных предшественников и

плазматических дендритических клеток), которые после трансплантации повышают популяцию «классических» $CD4^+$ и $CD25^+$ ИЛ-10 продуцирующих регуляторных клеток (T_{reg}). Генерация ИЛ-10 и трансформирующего фактора роста- β ($TGF-\beta$) $Tr1$ и T_{reg} способствует дальнейшему подавлению воспалительной эффекторной фазы ОРТПХ, ограничивая повреждение тканей-мишеней. Ниже представлена схема 1 адаптированная из статьи Huang X.J, Chang Y.J (Huang X., Chang Y. 2011).

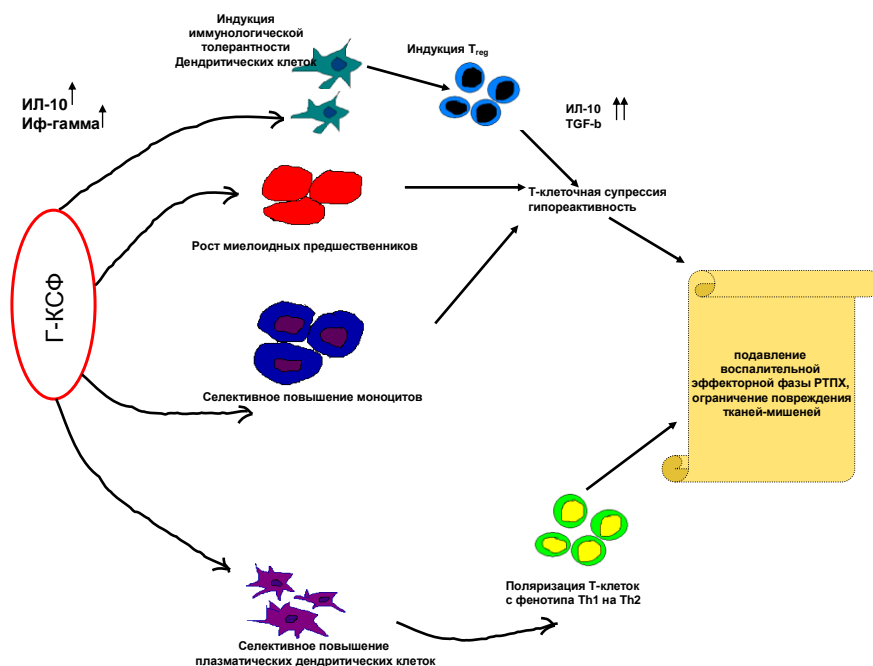


Схема 1. Иммунорегуляторный эффект на клетки костного мозга и периферической крови после введения Г-КСФ гаплоидентичному донору.

В последние годы данные о возможности применения при гапло-ТГСК неманипулированных гаплоидентичных гемопоэтических клеток костного мозга и периферических клеток вызвали большой интерес к разработке новых стратегий для профилактики ОРТПХ, таких как использование Г-КСФ праймированного КМ в качестве моноисточника ГСК, применение в период после алло-ТГСК новых препаратов – рапамицин (сиролимус) или назначения высоких доз циклофосфана на 3 и 4 день после введения ГСК донорах в комбинации с другими иммуносупрессивными препаратами.

Китайские исследователи сообщают о 100% приживлении трансплантата,

кумулятивная частота оРТПХ II⁰-IV⁰ отмечалась у 45,8% больных и 13,4% развили III⁰-IV⁰ степень; хрРТПХ описана в 53,9% случаев, распространенная форма у 22,6%. Трехлетняя безрецидивная выживаемость у больных с ОМЛ составила 70,7% в стандартной группы риска и 55,9% в группе высокого риска; у пациентов с ОЛЛ в стандартной группе риска 59,7%, в группе высокого риска 24,8%. Замечено, что общая выживаемость у больных с острым лейкозом была выше после гаплоидентичной трансплантации 42% против 20% после совместимой родственной (p=0,048), по-видимому, из-за более выраженной реакции «трансплантат против лейкоза» (РТПЛ). Многие исследователи считают, что необходимо дальнейшее изучение снижения частоты и тяжести РТПХ в западноевропейской популяции (Di Bartolomeo P. et al. 2010).

Однако, несмотря на положительные результаты, представленные по гапло-ТГСК итальянскими, немецкими, американскими и китайскими коллегами, существует многоцентровое европейское исследование, включившее 127 пациентов, с ОЛЛ высокого риска. Пятилетняя безрецидивная выживаемость в этом исследовании составила 27% для больных, трансплантированных в ремиссии заболевания. Тем не менее, при многофакторном анализе выявлена тенденция к улучшению безрецидивной выживаемости в крупных трансплантационных центрах и составляет 39% против 15% (Klingebiel T. et al., 2010).

Профилактики оРТПХ с помощью T-клеточной деплеции in vivo и иммуномодуляции.

Базовыми препаратами в профилактике РТПХ традиционно являются ингибиторы кальциневрина – циклоспорин А и такролимус, механизм действия которых хорошо изучен. Эти препараты не имеют принципиальных различий в эффективности и развитии побочных осложнений, в том числе при гапло-ТГСК. При их сравнении 2-х летняя ОВ пациентов с различными злокачественными заболеваниями системы крови составила 70% и 65% соответственно (Castagna L. et al., 2015).

Усиление эффекта профилактики оРТПХ при гапло-ТГСК связано с

комбинацией с другими препаратами, обладающими свойствами вызывать Т-клеточную деплецию «in vivo».

Антилимфоцитарный иммуноглобулин (АЛГ/АТГ) – является гамма-глобулином, полученным из сыворотки лошадей, коз или кроликов, иммунизированных лимфоцитами или тимоцитами человека. Широко применяется в качестве иммунодепрессанта в лечении апластической анемии, а также для усиления иммуносупрессивного воздействия в режимах кондиционирования при подготовке пациентов к алло-ТГСК, особенно, при трансплантации от неродственного донора, отсутствии полной совместимости по генам HLA-системы между реципиентом и донором ГСК с целью профилактики развития оРТПХ и отторжения трансплантата. При выполнении гапло-ТГСК до последнего времени был одним из составляющих компонентов режимов кондиционирования, что представлено в многочисленных исследованиях (Lu D. et al., 2006, Wang Y. et al., 2011).

В одном из первых проспективных исследований Luo Y. et al., 2014 при сравнении у 305 пациентов алло-ТГСК от родственного, неродственного и гаплоидентичного доноров подтверждена важность применения данного препарата. Так, при включении АТГ только в РК при алло-ТГСК от неродственного и гаплоидентичного донора было показано отсутствие различия в приживлении ГСК от родственного, неродственного и гаплоидентичного доноров, развития оРТПХ II-IV степени (39,7% и 42,4%, соответственно), хрРТПХ (41,7% и 41,4%, соответственно) при сравнении двух последних. При этом 5-летняя ОВ была сопоставима для всех групп пациентов – 77,2%, 63,5% и 60,8% (родственный, неродственный и гаплоидентичный донор) (Luo Y. et al., 2014).

Алемтузумаб. Алемтузумаб – гуманизированные IgG1 каппа анти-CD52 МАТ, который экспрессируется на поверхности В- и Т-лимфоцитов. Алемтузумаб получен в результате включения 6 вариабельных зон (определяющих комплементарность участков) крысиного моноклонального антитела IgG2 в

молекулу человеческого IgG1. Механизм действия обусловлен связываемым алемтузумаба с CD 52 антигенами на поверхности лимфоцитов, что вызывает их разрушение путём активации системы комплемента, антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности, индукции апоптоза.

По результатам пилотного исследования по использованию алемтузумаба у 12 пациентов старшей возрастной группы (медиана возраста 49,5 лет) с острым лейкозом высокого риска, 8 пациентов из которых находились в резистентном течении болезни и 4 больных в ремиссии заболевания, Алемтузумаб использовался в дозе 0,2 мг/кг веса реципиента в течение 6 дней (начиная с минус Д -8 по Д -3) в составе МАК с включением ТОТ. У всех больных было достигнуто приживление трансплантата в среднем на 17 день и полный донорский химеризм. Кумулятивная частота возникновения оРТПХ III⁰-IV⁰ составила 9%. Смертности, связанной с инфекциями, в этом исследовании не наблюдалась. В течение двух месяцев после гапло-ТСК отмечалась выраженная супрессия CD3+/CD4+ и CD3+/CD8+ Т-клеток, восстановление зафиксировано к 90 дню после трансплантации. Рецидив острого лейкоза выявлен у 5 из 8 пациентов, трансплантированных в рецидиве заболевания, в то время, как ни у одного из пациентов, находившихся в ремиссии, не было отмечено развитие рецидива (Kanda Y. et al. 2005). В более поздних исследованиях алемтузумаб стали включать в режимы кондиционирования со сниженной интенсивностью доз (содержащих флуодарабин и циклофосфан) для Т-клеточной деплеции «in vivo» при гапло-ТГСК. Так, из 49 больных с острым лейкозом, высокого риска, медианой возраста 48 лет, приживление было достигнуто в 94% случаев, тяжелая РТПХ развилась у 8% больных, а смертность, связанная с процедурой трансплантации составила 10,2% (Rizzieri D. et al. 2007). Тем не менее, позднее были получены следующие данные, свидетельствующие о повышенном риске инфекционных осложнений при применении алемтузумаба в профилактике оРТПХ (Dvorak C. et al., 2014, Marek A. et al., 2014).

Циклофосфан. Исследования по применению высоких доз циклофосфана после аллогенной трансплантации костного мозга (алло-ТКМ) были начаты в

конце 50-х годов прошлого столетия, когда в 1956 году Schwartz and Dameshek (Schwartz R., Dameshek W. 1959) впервые был описан эффект «препарат-индуцированной иммунологической толерантности». В 70-х годах Owens и Santos, Балтимор, США, на мышинной модели показали, что введение циклофосфана после алло-ТКМ целенаправленно действует на аллореактивные Т-клетки донора или реципиента (Owens J. Et al., Santos G et al., 1971). Этот подход к профилактике ОРТПХ был забыт на долгое время, до публикации в 1987 году данных рандомизированного двойного слепого исследования, по исследованию циклофосфана. Однако в исследовании была показана меньшая эффективность низких доз циклофосфана по сравнению с применением циклоспорина А после алло-ТГСК от совместимого сиблинга (Santos G., Tutschka P. et al., 1987). Тем не менее, исследования в этой области продолжались, Jones и Barber в 1995 году подтвердили, что циклофосфан не токсичен для ГСК, из-за высокой экспрессии этими клетками энзима альдегид дегидрогеназы (Jones R. et al., 1995). В дальнейшем, исследовательская группа Пригожиной Т. Б. на мышинной модели продемонстрировала, что высокие дозы циклофосфана могут редуцировать ОРТПХ и предотвратить отторжение трансплантата без негативных эффектов на ГСК. Эти данные подтолкнули исследователей к возобновлению исследования по применению препарата в клинической практике с целью профилактики ОРТПХ и отторжения трансплантата (Prigozhina T. et al., 1997). Таким образом, циклофосфан обладает высокой иммуносупрессивной и антинеопластической активностью. Роль его в режиме кондиционирования была неоднократно изучена. Препараты, вводимые до алло-ТГСК направлены на предотвращение отторжения аллогенного трансплантата посредством подавления иммунной системы реципиента. Однако, применение циклофосфана до алло-ТГСК не изменяет риск развития ОРТПХ при активации присутствующих в трансплантате аллогенных Т-клеток (Lehnert S., Rybka W. et. al., 1994). Напротив, введение высоких доз циклофосфана в ранний период после алло-ТГСК уменьшает вероятность отторжения трансплантата и риск ОРТПХ (Lehnert S., Rybka W. Et al., 1994, Mayumi H., Umesue M., Nomoto K. Et al., 1996, Mayumi H. et al., 1987).

Группа авторов из Johns Hopkins and Fred Hutchinson Cancer Research Center во главе с Leo Luznik (Luznik L. et al., 2008) воспроизвели протокол «препарат-индуцированной иммунологической толерантности», для получения селективной деплеции «in vivo» аллореактивных Т-клеток после немиелоаблативной гапло-ТГСК с использованием циклофосфана, флюдарабина и 2 Гр тотального облучения, профилактика РТПХ заключалась в посттрансплантационном введении циклофосфана в дозе 50 мг/кг веса реципиента на третий и четвертый день после гапло-ТГСК, назначение такролимуса и микифенолата мофетила с пятого дня после трансплантации. В исследование было включено 210 больных с острым лейкозом. Приживление трансплантата было достигнуто у 87% пациентов. Острая РТПХ II⁰-IV⁰ степени отмечалась у 27% больных и III⁰-IV⁰ степени наблюдалась в 5% случаев; хрРТПХ отмечалась у 15% пациентов. Кумулятивная частота рецидивов составила 55%, а смертность не связанная с рецидивом заболевания 18%. Структура смертности была следующей: из 113 больных 79 человек умерли от рецидива болезни, 15 пациентов от инфекционных осложнений, у 7 реципиентов наблюдалось вовлечение легких, приведшее к смерти, РТПХ с летальным исходом в 5 случаях, 7 больных погибли от других причин. Трехлетняя общая и бессобытийная выживаемость составили 41% и 32% соответственно. На рисунке 2 представлены графически результаты исследования (Munchel A. et al., 2011).

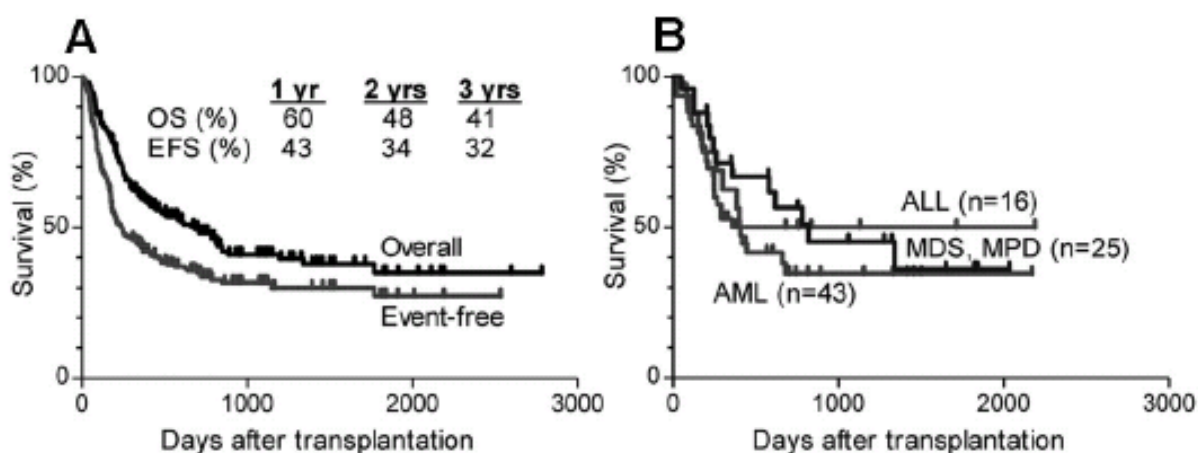


Рисунок 2. Немиелоаблативный режим кондиционирования с посттрансплантационным введением высоких доз циклофосфана:

График А – общая и бессобытийная трехлетняя выживаемость 210 больных.

График В – общая выживаемость больных с ОЛЛ, ОМЛ, МДС и МПЗ

ALL – ОЛЛ; AML – ОМЛ; MDS – МДС; MPD – МПЗ; OS – общая выживаемость; EFS – бессобытийная выживаемость; Days after transplantation – дни после трансплантации.

Применение циклофосфана после гапло-ТГСК у детей с острым лейкозом, высокий риск также эффективно – оРТПХ II-IV степени составила 46%, хрРТПХ – 17%, ОВ в течение года- 75%, БРВ – 68,8%, не повышало смертность, связанную с гапло-ТГСК – 12,5% (Yesilipek M. et al., 2015).

Сиролимус.

Сиролимус – макролидный антибиотик, продуцируемый *Streptomyces hygroscopicus*, используемый в комбинации с ингибиторами кальциневрина для профилактики РТПХ и отторжения в органной трансплантологии. In vitro был показан эффект экспансии CD4+CD25+Foxp3+ Т – регуляторных клеток. Иммунодепрессивное средство, механизм действия которого отличается от других иммунодепрессантов: подавляет активацию Т-клеток за счет блокирования Ca²⁺-опосредованной и Ca²⁺-независимой внутриклеточной передачи сигнала. Связывается со специфическим цитозольным белком – иммунофилином (FK-связывающим белком-12 - FKPB-12), комплекс FKPB-12-сиролимус подавляет активацию киназы mTOR (mTOR - mammalian target of rapamycin). Ингибирование mTOR приводит к блокаде нескольких специфических путей преобразования сигнала и в конечном итоге к подавлению активации лимфоцитов и снижению иммунитета. Снижает активность Т- и В-лимфоцитов и подавляет отторжение аллогенного трансплантата.

Ранее рапамицин (сиролимус) не использовался в клинической практике в качестве иммуносупрессанта при гапло-ТГСК. Pescatori J. et al., 2010 разработал протокол для профилактики РТПХ на основе рапамицина и микофенолата мофетила после режима кондиционирования со сниженной токсичностью,

включавшего тресульфен, флюдарабин, АТГ и ритуксимаб однократное введение (Pescatori J. et al., 2010). В исследование включены взрослые реципиенты: 39 больных с ОМЛ, 9 пациентов с ОЛЛ. Все пациенты на момент включения в протокол исследования находились в резистентном течении болезни или рецидиве заболевания. Кумулятивная частота развития оРТПХ от II⁰ до IV⁰ степени была 29% и 13% от III⁰ до IV⁰ степени, соответственно. Двенадцать больных из 59 развили хрРТПХ. Смертность связанная с процедурой трансплантации и рецидивом заболевания составила 25% и 44% соответственно. Общая годовая выживаемость больных в этой группе была равна 43%. Иммунное восстановление было достаточно быстрым и составляло в среднем 221 циркулирующая CD3+клетка/нл (49-1690) с 30 дня после гапло-ТГСК. Высокий уровень CD4+CD25+CD127-FOXP3+ Т-регуляторных клеток также обнаруживался с дня +30, которые были способны «in vitro» подавлять аутологичные эффекторные клетки, демонстрируя Т-регуляторную активность. Таким образом, эти результаты говорят, что использовании «новой платформы» для профилактики РТПХ при неманипулированной гапло-ТГСК, ассоциируется с более ранним Т-клеточным восстановлением.

Выбор донора и NK-аллореактивность.

Выбор оптимального донора при гапло-ТГСК остается в стадии изучения. Среди потенциальных источников ГСК при гапло-ТГСК возможны следующие варианты – отец, мать, сиблинги (брат, сестра), другие ближайшие – тети, дяди, двоюродные братья, сестры.

Так, при анализе 1210 гапло-ТГСК было показано, что осложнения и смертность, связанная с трансплантацией значительно ниже при использовании донора до 30 лет, мужского пола, отец донор имеет преимущество по сравнению с донором-матерью. При этом возраст не имел значения при сравнении доноров отец-брат (Wang Y. et al., 2014). В тоже время другие авторы, подтверждая значение возраста, не указывают на влияние пола, скорее на роль наследуемых и ненаследуемых антигенов HLA-системы матери и отца (Hangretinger R. et al., 2014, Sun Y. et al., 2015).

Дополнительные факторы, повышающие иммунологическую толерантность при алло-ТГСК были выявлена недавно (Tamaki S. et al., 2001, van Rood J. et al., 2002, Ochiai N. et al., 2002). Выбору донора, базируясь на принципе толерантности к ненаследуемым материнским антигенам (ННМА), уделяется много внимания. В нескольких клинических исследованиях было показано установление ремиссии у больных с химиорезистентным течением заболевания и приемлемый уровень РТПХ после трансплантации неманипулированного трансплантата от родственного донора, имеющего микрохимеризм и ННМА (Davies J. et al., 2007).

Ряд исследователей ссылаются на принцип толерантности к материнским генам, развивающийся вследствие беременности (Ichinohe T., 2004). При сравнении данных Японского национального исследования и Van Rood J. et al., 2002 (van Rood J. et al., 2002), у пациентов, получивших ГСК без Т-клеточной деплеции от матери значительно снижается частота развития хрРТПХ, по сравнению с реципиентами, получившими трансплантат от отца. Так же было продемонстрировано более низкое развитие оРТПХ у реципиентов, трансплантированных от сиблингов, несовместимых в ненаследуемых материнских антигенах, по сравнению с больными, получившими гапло-ТГСК от донора несовместимого по ненаследуемым отцовским антигенам (Rood J. et al., 2002). Ненаследуемые материнские (ННМА) и ненаследуемые отцовские (ННОА) антигены были определены, как присутствующие в фенотипе матерей и отцов и отсутствующие в фенотипе ребенка (Van der Horst B. et al., 1998). ННМА-несовместимые сиблинги-доноры и реципиенты «делят» наследуемые отцовские антигены, но у них сохраняется клеточный микрохимеризм и экспрессия ННМА (Van der Horst B. et al., 1998). Из-за трансплацентарного перехода материнских клеток и клеток плода, материнские антигены вызывают взаимную гипореактивность и длительный фето-материнский микрохимеризм (Molitor M., Burlingham W. et al., 2007). Лучшие результаты при трансплантации от матери к ребенку могут быть результатом предшествующего состояния иммунной системы матери, которая воздействует на антигены плода во время беременности и в

дальнейшем имеет Т-клетки памяти, воздействующие на гаплотип отца (Reisner Y. et al., 2011).

Т-лимфоциты матери, возможно, повышают реакцию «трансплантат против лейкоза» (РТПЛ), направленную против бластных клеток, но не против здоровых (Montagna D. et al., 2006).

На рисунке 3 представлены результаты БСВ пациентов, в зависимости от NK-аллореактивности и типа донора (мать или отец) между донором и реципиентом (Stern M. et al., 2008).

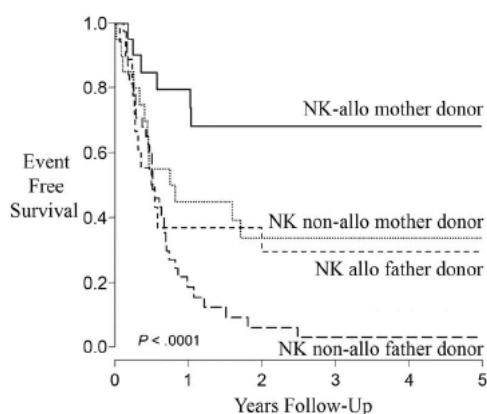


Рисунок 3 Бессобытийная выживаемость больных, трансплантированных от родителей.

NK-allo mother donor – донор NK-аллореактивная мать; NK non-allo mother donor - донор NK неаллореактивная мать; NK-allo father donor – донор NK-аллореактивный отец; NK non-allo father donor - донор NK неаллореактивный отец; Years Follow-Up – годы наблюдения; Event Free Survival – бессобытийная выживаемость.

Считается, что РТПЛ достигается посредством аллореактивных Т-клеток донора, направленных против антигенов гистосовместимости, представленных на опухолевых клетках реципиента. В исследовании Ruggeri L. et al. 2007 было показано, что реакция, возникающая между аллореактивными NK- клетками донора и реципиента, уменьшает риск развития рецидива, не вызывая оРТПХ, и значительно улучшает бессобытийную выживаемость у 112 больных с ОМЛ, получивших гапло-ТГСК (Ruggeri L. et al., 2002). У пациентов,

трансплантированных в ремиссии заболевания кумулятивная частота рецидива была значительно ниже при гапло-ТГСК от НК-аллореактивного донора (3% против 47%, $p < 0,003$) и вероятность общей выживаемости значительно улучшена за счет бессобытийной, которая составила 67% у реципиентов с НК-аллореактивным трансплантатом против 18% у больных, трансплантированных от неаллореактивного донора ($p=0,02$). У пациентов, трансплантированных в рецидиве от НК-аллореактивного донора, также наблюдалась более высокая бессобытийная выживаемость до 34% (Ruggeri L. et al., 2007). На рисунке 4 представлены результаты этого исследования.

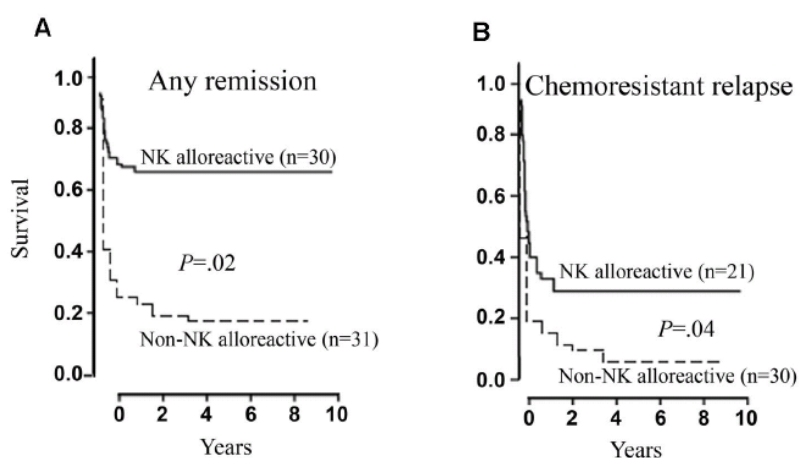


Рисунок 4 Гапло-ТГСК от НК-аллореактивного донора

График А: бессобытийная выживаемость больных, трансплантированных в ремиссии от НК-аллореактивного донора против неаллореактивного

График В: бессобытийная выживаемость больных, трансплантированных в рецидиве от НК-аллореактивного донора против неаллореактивного

Any remission – любая ремиссия заболевания, НК – alloreactive – НК-аллореактивный, Non - NK – alloreactive – неаллореактивный, chemoresistant relapse – химиорезистентный рецидив, years – годы.

Исследования по гапло-ТГСК от НК-аллореактивного донора показали также более низкую частоту развития рецидивов ОЛЛ у детей (Locatelli F. et al., 2009, Moretta A. et al., 2010; Lankester A. et al., 2010, Oevermann L. et al., 2014), при рефрактерном течении солидных опухолей (Perez-Martinez A. et al., 2012).

NK-клетки человека обладают ингибирующими рецепторами – KIR-рецепторы, которые распознают KIR-лиганды (аллели HLA-I класса). KIR2DL1 распознает аллели HLA-C с Lys80 (HLA-Cw4 и родственные аллели 2 группы), KIR2DL2 и KIR2DL3 распознают HLA-C с Asn80 (HLA-Cw3 и родственные аллели 1 группы), KIR3DL1 является рецептором для HLA-B аллелей, Bw4 специфичность.

По всей вероятности, при гапло-ТГСК KIR-лиганды не совместимы в направлении РТПХ; NK-клетки донора (функциональные) экспрессируют подавляющий KIR-рецептор для HLA-I класса, который отсутствует у реципиента, чувствуя потерю экспрессии собственных лиганд I класса, запускается аллореакция распознавания. Возможно, при этой модели улучшаются результаты после гапло-ТГСК: контролируется рецидив заболевания и улучшается выживаемость (Leung W. et al., 2004, 2005, Hsu K. et al., 2005).

Пионерами в этой области считаются исследователи из Перуджи, Италия, во главе с профессором Massimo F. Martelli, которые показали эффект донорских NK-клеток в виде уменьшения частоты рецидивов заболевания после гаплоидентичной ТГСК с использованием Т-клеточной деплеции для больных с острым миелобластным лейкозом (ОМЛ) (Ruggeri L. et al., 2002, 2007, Aversa F. et al., 2005). Исследовательская группа описывает эффект NK-клеток в виде улучшения приживления гапло-ГСК, развитие РТПЛ и уменьшения РТПХ. Для развития максимального эффекта аллореактивности NK-клеток важны несколько факторов (Barrett A., 2008):

В первую очередь к ним относится «вето» активность, которая была определена в 1980 году исследовательской группой во главе с Miller, как способность специфично подавлять цитотоксические Т-клетки предшественники против антиген презентующих вето клеток (Miller R. et al., 1980). На протяжении многих лет были описаны различные типы «вето» клеток, оказывающие свою деятельность через различные механизмы. Таким образом, термин «вето» представляет рабочее определение, а не конкретные субпопуляции клеток. После проведенного исследования, свидетельствующих о том, что

трансплантат с гиперклеточностью по CD34⁺ может преодолеть опосредованное Т-клетками неприживание/отторжение, Rachamim N. et al., 1998 продемонстрировали в смешанной лимфоцитарной реакции, что фракция клеток CD34⁺ подавляет предшественники цитотоксических Т-лимфоцитов направленные против собственных антигенов, при этом, не действуя на другие (Rachamim N. et al., 1998). Эта «вето» активность опосредована через индуцированное фактором некроза опухоли (ФНО- α) удаление распознающих эффекторных Т-клеток (Gur H. et al., 2005) и также представлена «ex vivo» дифференцировкой незрелых CD34⁺CD33⁺ и CD34⁻CD33⁺ миелоидных клеток (Gur H. et al., 2002). Кроме того, ранее было показано, что незрелые дендритические клетки индуцируют иммунологическую толерантность, оказывая «вето» активность на CD8⁺ Т-клетки через перфорин-основанный механизм, подавляя CD4⁺ Т-клетки через независимый от главного комплекса гистосовместимости механизм, опосредованный системой оксида азота (Zangi L. et al., 2009, 2012). Таким образом, после трансплантации чистой фракции CD34⁺ клеток вероятность активации анти-донор предшественников цитотоксических лимфоцитов пропорциональна уровню резидуальных Т-клеток хозяина и носит обратную корреляцию с количеством «вето» и других толерантных клеток. «Вето» активность изначально может быть запущена при введение CD34⁺ клеток и последующих CD33⁺ клеток, а так же незрелыми дендритическими клетками CD11c⁺ (Zangi L. et al., 2009, 2012).

Клеточный состав трансплантата является основным фактором, влияющим на скорость приживания ГСК донора. Т-клеточная деплеция трансплантата задерживает восстановление иммунитета (Chang Y-J et al., 2014, Park B. et al., 2015), что приводит к риску развития тяжелых инфекционных осложнений после трансплантации, наиболее значимыми из которых являются микозы, ЦМВ-инфекция (Luo X. Et al., 2014). С целью профилактики этих осложнений рассматриваются варианты проведения гапло-ТГСК в два этапа: Т-лимфоциты донора (лимфоидная часть), введение циклофосфана, затем на Д+5 Т-деплецированные ГСК (миелоидная часть трансплантата). (Gaballa S. et al., 2015).

С целью ускорения приживления ГСК пуповинной крови используется совместное введение гапло-ГСК и пуповинной крови (Chen J. et al., 2014), а также с мезенхимными стволовыми клетками (Li X-H. et al., 2014).

Режим кондиционирования.

По данным CIBMTR (Center International Blood and Marrow Research) при сравнении гапло-ТГСК и алло-ТГСК от неродственного донора с МАК не выявлено существенных различий – 1-годовая смертность составила 12% и 14%, 3-летняя вероятность рецидива 46% и 44% соответственно. При этом с достоверным снижением при гапло-ТГСК вероятности развития оРТПХ II-IV степени 16% и 33%, II-IV степени – 7% и 13%, хронической РТПХ 30% и 53%, соответственно (Solomon S. et al., 2016).

До последнего времени применение МАК при гапло-ТГСК являлось общепризнанным вариантом ввиду более широкого применения при острых лейкозах.

Недостатки РИК, связанные с риском первичного неприживления, высокой вероятностью рецидива, увеличивающиеся при использовании трансплантата с «очисткой» ограничивали применение этих вариантов подготовки пациентов (Munchel A. et al., 2011).

Однако, возможности режимов кондиционирования со сниженной интенсивностью доз/немиелоаблативных (РИК) при гапло-ТГСК позволяют не только расширить показания к трансплантации с учётом возраста пациентов (важно для взрослых и пожилых), но применять данный вариант трансплантации у пациентов с высокой коморбидностью, а также при рецидиве и прогрессии острого лейкоза, как этап подготовки к иммуноадаптивной терапии, что наиболее важно у детей и подростков (Solomon S. et al., 2016).

В зависимости от источника ГСК при сравнении РИК при алло-ТГСК от родственного, неродственного и гаплоидентичного донора не было показано различия в 3-х летней ОВ у пациентов ОМЛ и МДС – 57%, 45% и 41% соответственно (Di Stasi A., 2014). Улучшить результаты с уменьшением

рецидивов заболевания, у детей, получивших гапло-трансплантат, возможно, при использовании трансплантата с большой клеточностью по CD34⁺ (Klingebiel T. et al., 2010).

Адоптивная иммунотерапия с использованием донорских T-клеток после гапло-ТГСК.

Алло-ТГСК от гаплоидентичного донора открывает новые возможности в применении иммуноадоптивной терапии у пациентов с злокачественными заболеваниями (Kongtim P. et al., 2015). Рядом исследователей показано, что алло-ТГСК от гаплоидентичного донора имеет более выраженный иммуноадоптивный эффект по сравнению, например, с родственным донором, что в конечном счете влияет на ОВ: 3-х летняя ОВ 20% и 42%, соответственно в группе пациентов ОМЛ, высокого риска (продвинутые стадии заболевания) (Wang Y. et al., 2011).

Изучение гапло-ТГСК в качестве платформы для проведения иммуноадоптивной терапии является важным этапом повышения эффективности данного метода терапии. Среди вариантов могут рассматриваться инфузия донорских лимфоцитов, совместное введение с ГСК донора T_{reg} и T_{con} - лимфоцитов с целью подавления оРТПХ, но усиления РТПЛ, фотодеплеция аллореактивных T-лимфоцитов, инфузия $\gamma\delta$ -T-лимфоцитов, T-лимфоцитов с химерными антигенными рецепторами (CARs), НК-клеток, стимулированных *ex vivo*, с целью профилактики инфекционных осложнений – вирус-специфических T-лимфоцитов (например, ЦМВ, микозы) (Ghiso A. et al., 2014, Zeidan A. et al., 2013, Martelli M. et al., 2014, Luo X. et al., 2014).

Получены обнадеживающие результаты по применению инфузии донорских лимфоцитов (ИДЛ) в лечении рецидивов после гапло-ТГСК с МАК и РИК у пациентов разных возрастных групп с диагнозом ОМЛ и лимфомы. Достижение полной ремиссии возможно у 30% пациентов с небольшой вероятностью развития оРТПХ (Zeidan A. et al., 2014). Показано, что инфузия донорских лимфоцитов после гапло-ТГСК у пациентов с рецидивом ОМЛ с превентивными или терапевтическими показаниями приводит к достижению ремиссии у 45%

пациентов (Ghioso A. et al., 2014).

Группа итальянских исследователей во главе с профессором Martelli и профессором Velardi в 2005 году опубликовала исследование о введении клона донорских неаллореактивных патоген-специфических CD4⁺ Т-клеток, которые были генерированы и успешно введены после гапло-ТГСК в среднем от 13 до 23 дня. Ни у одного из 34 пациентов, включенных в протокол, после введения клона анти-ЦМВ специфических CD4⁺ и анти-аспергиллез специфических CD4⁺ Т-клеток в дозе 1x10⁶/кг веса реципиента не было развития РТПХ. Введение клона 1 типа аспергиллез специфических CD4⁺ Т-клеток контролировало аспергиллезную антигемию и помогло избавиться от инвазивного аспергиллеза 9 из 10 больным. Иммунотерапия с использованием клона анти-ЦМВ специфических CD4⁺ Т-клеток значительно снизила уровень реактивации ЦМВ и ускорила развитие клона анти-ЦМВ специфических CD8⁺ Т-клеток (Perruccio K. et al., 2005). В других исследованиях рефрактерная к терапии ЦМВ инфекция была успешно вылечена донорскими ЦМВ специфическими Т-лимфоцитами (Feuchtinger T. et al., 2010).

Описано успешное применение клона анти-аденовирус специфических CD4⁺ и анти-Эпштейн Барр вирусных цитотоксических лимфоцитов, как терапия спасения у 6 больных с посттрансплантационными лимфомами, утратившими ответ на терапию ритуксимабом (Comoli P. et al., 2008) .

Учитывая многоступенчатость и длительный подготовительный лабораторный этап перед введением антиген-специфических Т-клеток, эти формы иммунотерапии трудно применить в рутинной профилактике или когда необходим быстрый ответ на проводимую противовирусную терапию. Генетически модифицированные антиген-презентирующие клетки могут значительно сократить временной промежуток и позволяют одновременно выработать цитотоксические лимфоциты против различных вирусов (Gerdemann U. et al., 2011).

С целью исключить необходимость индивидуальной терапии, Naque и соавторы, университет Эдинбурга, Шотландия, использовали специфические

Эпштейн-Барр вирусные цитотоксические лимфоциты, которые были получены у сторонних, серопозитивных Эпштейн-Барр вирус доноров крови (Naque T. et al., 2007). Терапию использовали у 33 реципиентов, развивших Эпштейн-Барр вирус ассоциированное лимфопролиферативное заболевание и не достигших положительного ответа на традиционное лечение. Полный или частичный ответ получен у 65% пациентов через 5 недель и у 52% через 6 месяцев без каких-либо побочных эффектов. Несмотря на то, что сторонние цитотоксические Т-лимфоциты – короткоживущие клетки, требующие повторного введения, вероятно, их можно так же хорошо использовать для лечения других вирусных инфекций.

Другой подход обойти проблему, связанную с необходимостью длительного культивирования, - отсортировать антиген-специфические Т-лимфоциты по продукции гамма-интерферона. Исследовательская группа Feuchtinger и соавторы выделили ЦМВ-специфические Т-клетки при помощи стимуляции «ex-vivo» pp65 и затем отсортировали антиген-специфические лимфоциты по продукции гамма-интерферона (Feuchtinger T. et al., 2010). Восемнадцать реципиентов после ТГСК с рефрактерным течением ЦМВ болезни и виремии получили введение ЦМВ-специфических Т-лимфоцитов в дозе 21×10^3 /кг веса пациента. Исчезновение вирусной нагрузки или значительное уменьшение отмечалось в 83% случаев, включая двух пациентов с ЦМВ-энцефалитом. Такой результат был связан с экспансией «in vivo» ЦМВ-специфических цитотоксических Т-лимфоцитов у 12 из 16 больных. При использовании этого метода иммунотерапии не отмечалось побочных эффектов в момент введения клеток, так же не наблюдалось развития РТПХ даже у 11 больных, получивших гапло-ТГСК. Таким образом, различные методы выделения антиген-специфических Т-клеток, не приводящих к развитию РТПХ, позволяют в клинической практике смягчить инфекционные осложнения после трансплантации.

Как альтернатива патоген-специфической терапии, иммуноадаптивная Т-клеточная терапия представляет широкий репертуар клеток, отражающих

физиологическую иммунную систему. Главная задача – введение миллионов Т-клеток на килограмм реципиента без возникновения РТПХ. Для достижения этой цели было предложено несколько стратегий.

Необходимое условие для дальнейшего лечения донорскими Т-клетками (Amrolia P. et al., 2003) или NK-клетками (Miller J. et al., 2005) – отсутствие РТПХ и посттрансплантационной иммуносупрессии.

Деплеция «ex-vivo» аллореактивных Т-клеток. Один из способов – подготовка Т-клеток путем удаления аллореактивных клеток донора в смешанной лимфоцитарной реакции, стимулируя против клеток реципиента, затем проводят деплецию, используя иммунотоксины, иммуномагнитную селекцию или FACS всех клеток, представляющих экспрессию поверхностных активных маркеров (CD25, CD69, CD134, CD137, CD147 и HLA-DR) (Hartwig U.F. et al., 2005; Ge X., Brown J. et al., Sykes M., Boussiotis V. Et al., 2008, Wehler T. et al., 2007, Martins S. et al., 2004, Godfrey W. et al., 2004). Существуют другие методы, такие как FasL-опосредованное удаление активированных Т-клеток (Bohana-Kashtan O. et al., 2009), индукция апоптоза белком теплового шока (протеин 90, HSP 90) (Stuehler C. et al., 2009) или индукция анергии блокадой ко-стимуляции (Davies J. et al., 2008).

Фотодинамическая аллодеплеция при условии эффективности и обширной деплеции аллореактивных Т-клеток сохраняет широкий спектр Т-клеток для адоптивной иммунотерапии (Perruccio K. et al., 2008). Безопасность использования такого метода деплеции Т-клеток при гапло-ТГСК для адоптивной терапии была описана в декабре 2009 года совместной исследовательской группой из Канады и Нидерландов. Девятнадцати пациентам с онкогематологическими заболеваниями очень высокого риска (большинство больных с рефрактерным течением болезни, из них с ОМЛ – 10, МДС – 4, рефрактерный ОЛЛ – 1, ХМЛ – 1, НХЛ – 1) старшей возрастной группы (медиана 54 года) после миелоаблативного режима кондиционирования, на основе тотального облучения тела, выполнена гапло-ТГСК, с использованием позитивной иммуноселекции CD34⁺ клеток без дальнейшей

посттрансплантационной иммуносупрессии. Все пациенты достигли полного донорского химеризма и устойчивого приживания трансплантата. Введение донорских Т-лимфоцитов после фотодинамической аллодеплеции проводили в возрастающих дозах ($1,0 \times 10^4/\text{кг}$ веса реципиента до $2,0 \times 10^6/\text{кг}$ веса реципиента) в среднем на 34 день после гапло-ТГСК. Это международное многоцентровое исследование в настоящее время еще ведется (Roy D. et al., 2009).

Использование суицидных генов-вставок в Т-клетки на примере тимидинкиназы простого герпеса с целью достижения восприимчивости к ганцикловиру описала Bonini и соавторы в 1997 году (Bonini C. et al., 1997). В это исследование вошло 28 пациентов, получивших приблизительно $10 \times 10^6/\text{кг}$ веса реципиента со встроенным в Т-клетки тимидинкиназным суицидным геном. Двадцать два пациента показали иммунное восстановление с медианой в 23 дня после введения. Проявления оРТПХ I⁰-IV⁰ отмечались у 10 пациентов и хрРТПХ у одного больного и контролировалась введением ганцикловира. Общая трехлетняя выживаемость составила 49% для 19 пациентов, находившихся в ремиссии на момент трансплантации. Низкий уровень РТПХ указывает на функциональные нарушения преобразованных Т-клеток, которые, в противном случае, в дозе $10 \times 10^6/\text{кг}$ веса реципиента привели бы к смертельным формам РТПХ. Из-за длительного восстановления в значительной степени опосредованного вновь возникшими Т-лимфоцитами, авторы предположили, что генетически модифицированные клетки запускают функцию тимуса. Третья фаза этого исследования в настоящее время продолжается.

До последнего времени попытки манапулирования субпопуляциями Т-лимфоцитов, иницирующих РТПХ и РТПЛ, не имеют значительных успехов. В этом отношении особое внимание уделяется происходящей из тимуса субпопуляции Treg-лимфоцитов $\text{CD4}^+\text{CD25}^+\text{FoxP3}^+$, поддерживающей иммунологическую толерантность и гомеостаз внутри иммунной системы (Martelli M. et al., 2014). Привлекает внимание применение комбинации донорских Т-регуляторных клеток (Tregs) и обычных Т-лимфоцитов (Tcons).

Иммунотерапия, с использованием как натуральных, свежее-изолированных

донорских Treg, так и «ex vivo» экспансированных поликлональных или реципиент специфических Treg, была описана на мышинной модели для предотвращения РТПХ, индуцированной совместным введением Tcons и улучшения посттрансплантационного иммунного восстановления (Hoffmann P. et al., 2002; Edinger M. et al., 2003; Trenado A. et al., 2003; Nguyen V. et al., 2008). В пилотном исследовании Brunstein и соавторов, опубликованном в ноябре 2011 года, пациентам с резистентным течением онкогематологических заболеваний выполнена трансплантация ГСК из двух образцов пуповинной крови. В исследование включено 23 больных, которым после двойной трансплантации ГСК из пуповинной крови на плюс первый или плюс пятнадцатый день вводились сторонние Treg в дозе от $0,1 \times 10^5$ до $30,0 \times 10^5$ /кг веса реципиента, которые были «ex vivo» экспансированы используя анти CD3/CD28 антитела. Все пациенты получили фармакологическую иммуносупрессию после трансплантации. Частота возникновения РТПХ II⁰-IV⁰ степени была ниже, чем в исторической группе сравнения (43% против 61%, $p=0,05$). Так же не было получено статистически значимых различий в частоте возникновения рецидивов заболевания и инфекционных осложнений (Brunstein C. et al., 2011). Исследовательская группа из Перужди, Италия, в апреле 2011 года опубликовала результаты применения у 28 больных с онкогематологическими заболеваниями высокого риска свежеизолированных Treg в дозе 2×10^6 /кг веса реципиента после миелоаблативного режима кондиционирования на основе тотального облучения тела. Через четыре дня последовало введение Tcons в дозе 1×10^6 /кг веса реципиента и гаплоидентичных CD34⁺ в дозе 10×10^6 /кг веса реципиента после иммуномагнитной позитивной селекции. Интервал между введениями был выбран на основании животной модели, которая показала, что первоочередное введение Tregs обеспечивает максимальную защиту от РТПХ (Nguyen V. et al., 2007). В этом исследовании пациенты не получали посттрансплантационную иммуносупрессивную терапию. Частота возникновения оРТПХ и хрРТПХ была крайне низкой. Картина восстановления иммунитета значительно отличалась от стандартной гапло-ТГСК с применением Т-клеточной деплеции. Отмечено

быстрое восстановление Т-клеточной субпопуляции, развитие широкого спектра Т-клеток с высокой частотой патоген-специфических CD4⁺ и CD8⁺ лимфоцитов. Значительно реже происходила ЦМВ реактивация и не отмечалось смертей после ЦМВ болезни. Это пилотное исследование продемонстрировало, что естественные поликлональные Treg контролируют аллореактивность иммунотерапии Tcons в дозовом соотношении 2:1x10⁶/кг веса реципиента и не связаны с наблюдаемым угнетением общего иммунитета (Di Ianni M. et al., 2011). Тем не менее, не отмечалось снижения смертности, связанной с процедурой трансплантации, из-за клинического состояния пациентов на момент трансплантации и токсичности режима кондиционирования. В настоящее время в режим кондиционирования внесены изменения: циклофосфан был заменен алемтузумабом. Предварительные результаты показали, что частота угрожающих жизни инфекционных осложнений значительно снизилась и трансплантационная смертность стала менее 20%. Исследование еще не закрыто. Эти пилотные исследования показали, что «in vitro» введение естественных CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Tregs не требует подавления РТПХ, так как активация аллоантиген-специфических Tregs эффективно происходит в естественных условиях. Количество естественных Tregs, забранных от здоровых гаплоидентичных доноров достаточно для контроля аллореактивности в соотношении 2:1x10⁶/кг веса реципиента. У больных не наблюдалось угнетения общего иммунитета при введении Tregs в описанном выше соотношении. Таким образом, «ex vivo» экспансия донорских Tregs не обязательна для клеточной терапии на основе Tregs.

Перспективы применения гаплоидентичной трансплантации ГСК.

Ввиду высокой частоты приживления гаплоидентичного трансплантата, возможности предотвращения РТПХ при помощи Т-клеточной деплеции, и отсутствии массивной иммуносупрессивной терапии в посттрансплантационном периоде, гапло-ТГСК может быть использована как платформа для клеточной терапии донорскими клетками в лечении злокачественных заболеваний. Уже в

настоящее время в дополнение к гапло-ТГСК могут быть использованы способы выработки противоопухолевых клеток из Т-клеток реципиента: трансфекция с трансгенными закодированными опухоль-специфическими Т-клеточными рецепторами (Heemskerk M. et al., 2004) или химерные рецептор-модифицированные Т-клетки, основанные на опухоль-специфической антителопродуктивной специфичности (Eshhar Z. et al., 2010, Jena V. et al., 2010, Porter D. et al., 2011).

В последнее время показано, что сторонние цитотоксические лимфоциты с фенотипом центральных клеток памяти способствуют аллогенной трансплантации костного мозга (Ophir E. et al., 2010). Кроме того, у этих клеток имеются новые TCR-независимые механизмы уничтожения лимфомных клеток человека, опосредованных через индуцированный апоптоз после лигирования цитотоксических лимфоцитов CD8 молекулами большого комплекса гистосовместимости I класса на опухолевых клетках. На мышинной модели для В-клеточной лимфомы эти цитотоксические Т-лимфоциты элиминировали остаточную болезнь и значительно продлили выживаемость (Lask A. et al., 2010). Такая клеточная терапия в сочетании с трансплантацией мега-доз CD34⁺ клеток, может быть привлекательной, как платформа для индукции толерантности перед клеточной терапией или органной трансплантацией и в частности для ликвидации резидуальной болезни у пациентов с В-клеточной лимфомой, которые не могут перенести интенсивную радио-химиотерапию.

Таким образом, гапло-ТГСК имеет ряд преимуществ. Получены обнадеживающие результаты в европейских, американских и китайских клиниках при гапло-ТГСК у детей (Lang P. et al., 2004; Bader P. et al., 2011; Rocha V. et al., 2008). Накоплен огромный опыт по применению гаплоидентичного донора как альтернативного источника ГСК у взрослых. Сообщается о достижении безрецидивной выживаемости при ОМЛ 43% и ОЛЛ 30% у больных, трансплантированных в ремиссию заболевания (Aversa F. et al., 2011). В Перудже, Италия, вероятность бессрбытийной выживаемости при ОМЛ возросла до 65% при трансплантации от НК-аллореактивного донора, которого можно найти для

50% пациентов. Учитывая значительно улучшающиеся результаты по гаплогенотипу (ТГСК), необходимо использовать этот метод лечения у больных высокого риска и не имеющих совместимого неродственного донора. Семнадцатилетнее наблюдение за пациентами после гаплогенотипа (ТГСК) продемонстрировало хорошее качество жизни без признаков хронического респираторного туберкулеза (Aversa F. et al., 2011).

Кроме того, сравнивая гаплогенотип (ТГСК) и трансплантацию от совместимого неродственного донора, необходимо помнить, что пациенты получили гаплогенотип (ТГСК) в кратчайшие сроки, не было затрачено времени на поиск и организацию донорства ГСК от неродственного донора, в то время как по разным причинам, другие пациенты развили рецидив заболевания и погибли в ожидании совместимого неродственного донора.

На сегодняшний день внимание при гаплогенотипе (ТГСК) обращено на проведение иммуноадаптивной посттрансплантационной терапии, с целью улучшения иммунного восстановления, уменьшения смертности, связанной с трансплантацией и повышением эффекта РТПЛ/РТПО (Kongtim P. et al., 2015). Целесообразность использования гаплогенотипного донора повышается при необходимости клеточной терапии от того же донора. Параллельно продолжаются исследовательские работы по применению этого метода лечения у пожилых больных и пациентов со значительными сопутствующими заболеваниями. С этой целью все больше применяют РКСИД с использованием Т-клеточной деплеции «ex vivo» или применение неманипулированного трансплантата с посттрансплантационным введением высоких доз циклофосфана для предотвращения РТПХ.

Таким образом, гаплогенотипная трансплантация за последние десятилетия прошла путь от «терапии спасения», применяемой у больных в терминальных стадиях заболевания, до терапии первой линии, которая может быть применима и должна рассматриваться у больных с острыми лейкозами в первой ремиссии заболевания, при наличии неблагоприятных факторов риска (цитогенетические и молекулярные), первично-резистентном течении болезни и высоком риске рецидива.

ГЛАВА 2

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ХАРАКТЕРИСТИКА ПАЦИЕНТОВ

Исследование выполнено на базе Научно исследовательского института детской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р.М.Горбачевой ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. академика И.П.Павлова» Минздрава России.

Включено 56 детей и подростков в возрасте от 1 до 21 года (медиана возраста – 9 лет) с диагнозами острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ) (n=32; 57,1%) и острый миелобластный лейкоз (ОМЛ) (n=24; 42,9%), получивших терапию методом гапло-ТГСК в период с декабря 2007 по июнь 2013 годов. Медиана наблюдения за пациентами составила 3,7 года.

Общая характеристика группы больных, получивших гапло-ТГСК.

Средний возраст пациентов с ОЛЛ составил 8 лет 9 месяцев (от 1 года до 21 года), медиана возраста 9 лет. Стадия заболевания расценивалась, как рецидив – у 28 (87,5%) больных, первично-резистентное течение – 2 (6,25%) пациента и 2 (6,25%) с ответом после курса химиотерапии .

Средний возраст пациентов с ОМЛ равен 9 лет 7 месяцев (от 1 года до 19 лет), медиана возраста 9,5 лет. Стадия заболевания расценивалась, как рецидив – у 16 (66,7%) пациентов, первично-резистентное течение – 7 (29,1%) больных и 1 (4,2%) реципиент с ответом, на проведенный блок химиотерапии на момент проведения трансплантации.

Режимы кондиционирования и профилактика острой РТПХ.

Подготовку к гапло-ТГСК осуществляли следующими вариантами режимов

кондиционирования (РК):

- миелоаблативные режимы кондиционирования (МАК) – 25 (44,6%) больных. Режим кондиционирования состоял из следующих препаратов: бусульфан (Bu, 16мг/кг), циклофосфан (Cy, 2000мг/м²), цитозар (Ara-C, 8000мг/м²), ломустин (CCNU, 120 мг/кг);
- режим кондиционирования сниженной интенсивности (РИК) – 31 (55,4%) пациентов. В режиме кондиционирования РИК использовали флюдарабин-содержащие протоколы – у 15 пациентов (48,4%) флюдарабин (Flu, 150мг/м²), бусульфан (Bu, 8мг/кг); у 13 пациентов (41,9%) – флюдарабин (Flu, 150 мг/м²), мелфалан (Mel, 140мг/м²), флюдарабин (Flu, 120мг/м²), циклофосфан (Cy, 1200мг/м²) применялись у 3 (9,9%) реципиентов.

Профилактику острой «реакции трансплантат против хозяина» (oРТПХ) у 30 (53,6%) больных проводили с применением базовой иммуносупрессивной терапии (ИСТ) циклоспорином А (ЦСА), начальная доза – 3 мг/кг/сут или такролимусом (Такро) – 0,03 мг/кг/сут у 26 (46,4%) пациентов.

Из 56 пациентов у 34 (60,7%) для профилактики oРТПХ в РК был включен антитимоцитарный глобулин (АТГАМ, фирма «Pharmacia & Upjohn Company, США»), суммарная доза – 60 мг/кг, 4 больных (7,2%) получили введение алемтузумаба (Кэмпас, фирма «Джензайм Корпорэйшн, США») в дозе 1,2мг/кг.

Для 18 пациентов вне зависимости от интенсивности РК использовали протокол профилактики oРТПХ с включением циклофосфана в Д+3, Д+4 после дня введения ГСК донора (Д 0) :

- МАК с введением циклофосфана в дозе 50 мг/кг/сут. в Д+3, Д+4 после гаплогенесиса получили 5 (9%) пациентов;
- РИК с введением циклофосфана в дозе 50 мг/кг/сут. в Д+3, Д+4 после гаплогенесиса – 13 (23,2%) пациентов.

У 18 (32,1%) пациентов при режиме профилактики oРТПХ на основе такролимуса, получивших в ранний период на Д+3 и Д+4 циклофосфан, с Д-3

назначали ингибитор m-TOR – сиролимус ($1 \text{ мг/м}^2/\text{сут}$).

Источник ГСК.

Источником трансплантата являлись праймированные ГСК КМ и ПСКК, как в комбинации, так и в качестве моно - источника. С целью праймирования КМ все гаплоидентичные доноры получали гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (Г-КСФ) в дозе 5 мг/кг/день в течение 3 дней до момента последующей миелоэкспузии. Миелоэкспузию осуществляли на третий день стимуляции в условиях стерильной операционной под эндотрахеальным наркозом путем повторных пункций задних остей крыльев подвздошных костей без последующей обработки (неманипулированный КМ).

При использовании комбинированного трансплантата КМ+ПСКК гаплоидентичный донор получал стимуляцию Г-КСФ в той же дозе, но в течение 4 последующих дней. На пятый (при необходимости шестой) день производили аппаратный аферез ПСКК с применением оборудования COBE Blood Cell Separator (Spectra LRS, COBE BCT Inc., Lakewood, CO, USA). После получения трансплантат ПСКК подвергался позитивной селекции CD34+клеток на аппарате CliniMACS (Miltenyi Biotec). Введение комбинированных ГСК проводили последовательно в 2 этапа – КМ (D0) и далее через 1 день – ПСКК (2-ой D0).

Клеточный состав трансплантата неманипулированного праймированного КМ составил по CD34+ от $2,6$ до $15,8 \times 10^6/\text{кг}$ (медиана $4,7 \times 10^6/\text{кг}$), по CD3+ от $3,1$ до $12,2 \times 10^7/\text{кг}$ (медиана $7,0 \times 10^7/\text{кг}$); для реципиентов, получивших комбинированный трансплантат, по CD34+ от $2,5$ до $30,7 \times 10^6/\text{кг}$ (медиана $11,3 \times 10^6/\text{кг}$), по CD3+ от $1,14$ до $6,9 \times 10^7/\text{кг}$ (медиана $4,0 \times 10^7/\text{кг}$).

Восстановление кроветворения.

Восстановление кроветворения определяли согласно критериям EBMT (The EBMT Handbook 5th Edition 2008). Признаками приживления трансплантата являлось обнаружение в анализе периферической крови реципиента следующих

показателей:

- 1) абсолютного числа гранулоцитов $0,5 \times 10^9/\text{л}$ и более на протяжении трех последующих дней при условии отсутствия стимуляции кроветворения реципиента с помощью ростовых факторов (Г-КСФ);
- 2) абсолютного числа лейкоцитов $1,0 \times 10^9/\text{л}$ и более на протяжении трех последующих дней;
- 3) абсолютного числа тромбоцитов $20,0 \times 10^9/\text{л}$ и более на протяжении трех последующих дней при условии отсутствия заместительных трансфузий тромбоконцентратом;
- 4) уровня гемоглобина 80 г/л и более на протяжении трех последующих дней при условии отсутствия заместительных трансфузий эритроцитарной массы.

Подробная характеристика пациентов представлена в таблице 1, 1а.

Перед гаплогенетическим анализом (ТГСК) пациенты были обследованы, в том числе выполнены клинический и биохимический анализ крови, миелограмма, кариотипирование клеток костного мозга, флуоресцентная *in situ* гибридизация с локус – специфичным ДНК – зондом (FISH), цитофлуориметрическое исследование клеток костного мозга на аппарате FACS Aria II для диагностики варианта рецидива ОЛ, исследование молекулярных маркеров, наблюдаемых при острых лимфобластных (BCR-ABL, MLL/AF9, MLL/AF4, MLL/ENL, TEL/AML1) и острых миелобластных (PML/RARa (bcr1,2,3), AML1/ETO, AML1/EVI) лейкозах, а также компьютерная томография органов грудной и брюшной полости, магнитно-резонансное исследование головного мозга, ультразвуковое исследование органов брюшной полости и почек, эхокардиографическое исследование сердца, комплексное обследование почек.

Таблица 1. Общая характеристика пациентов получивших гапло-ТГСК

Характеристики	N – 56 пациентов (%)
Медиана возраста (годы)	9 (1-21)
Диагнозы и стадия заболевания	
ОЛЛ	32(57,1%)
Рецидив заболевания	28(87,5%)
Первичная резистентность	2 (6,25%)
Ответ на химиотерапию	2(6,25%)
ОМЛ	24(42,9%)
Рецидив заболевания	16(66,7%)
Первичная резистентность	7(29,1%)
Ответ на химиотерапию	1(4,2%)
Медиана наблюдения	3, 7 года (21-1998)
Соотношение по полу М : Ж	32:24
Циторедуктивная химиотерапия до гапло-ТГСК	
Да	15(26,8%)
Нет	41(73,2%)
Режим кондиционирования	
МАК	20(35,7%)
МАК+Циклофосфан	5(9%)
РИК	18(32,1%)
РИК+Циклофосфан	13(23,2%)
Профилактика оРТПХ	
Базовая ИСТ ЦСА	30(53,6%)
Базовая ИСТ Такро	26(46,4%)

Таблица 1а. Источники ГСК.

Источник ГСК	
КМ	33(59%)
ПСКК	23(41%)

Продолжение Таблица 1а. Источники ГСК.

медiana CD34+ x 10 ⁶ /кг	
КМ	4,7(2,6-15,8)
КМ+ПСКК	11,3(2,5-30,7)
медiana CD3+x10 ⁷ /кг	
КМ	7(3,1-12,2)
КМ+ПСКК	4(1,14-6,9)
Совместимость по HLA-системе 3/6	56(100%)

Типирование генов HLA-системы осуществлялось молекулярно-биологическим методом – полимеразной цепной реакцией с сиквенс-специфическими праймерами (PCR-SSP) с использованием наборов-реагентов фирмы «Protrans» низким разрешением и от среднего к высокому. Визуализацию продуктов, полученных в результате полимеразной цепной реакции (ПЦР), проводили посредством электрофореза в горизонтальном 2% агарозном геле. Интерпретацию результатов осуществляли с помощью таблиц, прилагаемых к набору праймеров. В 100% случаев (56 пациентов) совместимость по генам HLA-системы была 3 из 6 генов.

В качестве гаплоидентичного донора для 41 (73,2%) пациента использовалась гаплоидентичная мать, 15 (26,8%) реципиентов трансплантированы от другого гаплоидентичного донора (отец – 14; брат – 1). Учитывая отсутствие ремиссии на момент гапло-ТГСК, крайне высокий риск развития рецидива острого лейкоза после трансплантации, с целью стабилизации и поддержания ремиссии, 21 (37,5%) пациенту с соматическим статусом не более 2 баллов по шкале EGOС или по индексу Карновского в модификации Ланского для детей не менее 50% после гапло-ТГСК в периоде отмены базовой ИСТ и до 180 дней, была начата терапия – 11 (52,4%) больным с использованием химиопрепаратов (поддерживающая ХТ 6-МП в дозе 50 мг/м², ежедневно, и метотрексат в дозе 30 мг/м² 1 раз в неделю под контролем клинического анализа

крови при ОЛЛ в периоде с Д+100-150 до 18-24 мес., использование 3-5 курсов гипомитилирующего препарата 5-азацитидин «Вайдаза» в дозе 50 мг/м² в течение 5 дней с интервалом 28 дней при ОМЛ в периоде с Д+100. Восьми (38,1%) пациентам проводилась превентивная иммуноадоптивная терапия инфузией донорских лимфоцитов (ИДЛ) в эскалирующих дозах начиная с 1,0 x 10⁴/кг до 1,0 x 10⁶/кг по CD3+, а также комбинация ХТ и ИДЛ у 2 (9,5%) реципиентов в периоде с Д+100.

Плановое обследование после гапло-ТГСК проводилось на 15, 30, 60, 120, 180, 365 день и далее 1 раз в полгода, что включало:

Миелограмма

Цитогенетическое исследование (методом кариотипирования костного мозга или при необходимости FISH исследование)

Цитофлюориметрическое исследование костного мозга на аппарате FACS Aria II

Молекулярно-биологические методы исследование (определения химеризма методом ПЦР STR с целью выявления процента клеток донорского происхождения, исследование молекулярных маркеров острых лимфобластных и острых миелобластных лейкозов методом ПЦР с целью выявления мутаций, характерных для дебюта заболевания)

также клинические и инструментальные методы обследования (проведение компьютерной томографии органов брюшной и грудной полости, ультразвуковое исследование органов брюшной полости, эхокардиографическое исследование сердца).

Характеристика группы пациентов с ОЛЛ получивших гапло-ТГСК.

В группу больных с ОЛЛ вошло 32 пациента (57,1%). Возраст реципиентов на момент гапло-ТГСК составил от 1 года 2 месяцев до 21 года (медиана возраста 9 лет).

Варианты ОЛЛ были следующими: В-ОЛЛ – 21 (65,6%) человек, ОЛЛ с филадельфийской хромосомой (Ph+ ОЛЛ) – 3 (9,4%) больных, Т-клеточный ОЛЛ у 7 (21,9%) реципиентов и врожденный В-ОЛЛ – 1 (3,1%) больной. Стадия заболевания расценивалась, как рецидив – у 28 (87,5%) больных, первично-

резистентное течение – 2 (6,25%) пациента и 2 (6,25%) в состоянии ответа после химиотерапии.

В связи с резистентным течением болезни 8 (25%) больным, в период 45-30 дней до начала РК с целью циторедукции проведена ХТ с использованием резервной схемы FLAG (флюдарабин+цитозар+Г-КСФ). Ответ на ХТ (химиочувствительность) в виде снижения уровня бластов в костном мозге наблюдали у 2 (25%) пациента, в том числе в костном мозге < 5% (в состоянии ответа после химиотерапии), длительность этого периода до момента гапло-ТГСК составила не более 30 дней.

Остальным 24 (75%) реципиентам РК проводили без предшествующей циторедуктивной ХТ.

Общий срок наблюдения больных составил от 1 года 7 месяцев до 5 лет 5 месяцев (медиана наблюдения составила 3 года 3 месяца). Характеристика группы представлена в таблице 2 и 2а.

Таблица 2. Общая характеристика пациентов с ОЛЛ получивших алло-ТГСК от гаплоидентичного донора.

Характеристики	N – 32 пациента
Медиана возраста (годы)	9 (1-21)
Медиана наблюдения (годы)	3, 3 года (1,7-5,5)
Статус на момент трансплантации	
Все пациенты с химиорезистентным течением ОЛЛ	32(100%)
После циторедуктивной ХТ	8(25%)
Без циторедуктивной ХТ	24(75%)
Режим кондиционирования	
МАК	15(46,9%)
МАК+Циклофосфан	4(12,5%)
РИК	9(28,1%)
РИК+Циклофосфан	4(12,5%)
Профилактика оРТПХ	
Базовая ИСТ ЦСА	18(56,3%)
Базовая ИСТ Такро	14(43,7%)

Таблица 2а. Источник ГСК для пациентов с ОЛЛ, получивших алло-ТГСК от гаплоидентичного донора.

Источник ГСК	
КМ	21(65,6%)
КМ+ПСКК	11(34,4%)
медиана CD34+ x10 ⁶ /кг	
КМ	6(3,6-21,9)
КМ+ПСКК	7(2,5-30,7)
медиана CD3+ x10 ⁷ /кг	
КМ	7,5(3,8-11,1)
КМ+ПСКК	2,4(1,14-4,31)
Совместимость по HLA-системе 3/6	32(100%)

У 15 (46,9%) пациентов с ОЛЛ в качестве подготовки к гапло-ТГСК использовали МАК, МАК с введением циклофосфана в Д+3, Д+4 – 4 (12,5%) пациентам.

Режим кондиционирования сниженной интенсивности получили 9 (28,1%) реципиентов, РИК с введением циклофосфана в Д+3, Д+4 – 4 (12,5%) человека.

Все пациенты в группе получили профилактику оРТПХ. Базовая ИСТ ЦСА (3 мг/кг/сут.) применялась у 18 (56,3%) больных, Такро (0,03 мг/кг/сут.) у 14 (43,7%) пациентов. В дополнение к такролимусу, 8 (25%) пациентам, получившим в качестве профилактики оРТПХ циклофосфан на Д+3 и Д+4, с Д-3 назначали ингибитор m-TOR – сиролимус (1 мг/м²/сут). С целью профилактики оРТПХ у 23 (72%) пациентов в РК был включен антитимоцитарный глобулин (АТГАМ, фирма «Pharmacia & Upjohn Company, США», суммарная доза 60 мг/кг), 1 больной (3%) получил в РК введение алемтузумаба (Кэмпас, фирма «Джензайм Корпорэйшн, США», суммарная доза 1,2 мг/кг). В случае применения циклофосфана в суммарной дозе 100 мг/кг (50 мг/кг в Д+3 и Д+4) у 8 (25%) реципиентов в РК не применяли антилимфоцитарный/антитимоцитарный иммуноглобулин.

Источниками ГСК были комбинированный трансплантат, состоящий из неманипулированных стимулированных ГСК КМ и манипулированных ПСКК у 11 (34,4%) реципиентов, неманипулированный стимулированный КМ у 21

(65,6%) пациента.

Клеточность трансплантата по CD34⁺ составила при использовании неманипулированного стимулированного КМ от 3,6 до 21,9x10⁶/кг (медиана 6,0x10⁶/кг). Для реципиентов, получивших комбинированный трансплантат, от 2,5 до 30,7 x 10⁶/кг (медиана 7,0x10⁶/кг). Содержание CD3⁺ в неманипулированном трансплантате было от 3,8 до 11,1 x10⁷/кг (медиана 7,5 x10⁷/кг), для комбинированного трансплантата составило от 1,14 до 4,31 x10⁷/кг (медиана (2,4 x10⁷/кг).

С целью профилактики рецидива 12 (37,5%) пациентов с ОЛЛ и сохранным соматическим статусом получили терапию после гапло-ТГСК. Из них с использованием химиопрепаратов 6-МП в дозе 50 мг/м², метотрексат в дозе 30 мг/м² – 8 (66,6%) человек, инфузии донорских лимфоцитов (ИДЛ) в эскалирующих дозах от 1,0 x 10⁴/кг – 1,0 x 10⁶/кг по CD3⁺ 2 (16,7%) пациентам и комбинация ХТ и ИДЛ для 2 (16,7%) реципиентов. Характеристика посттрансплантационной терапии представлена в таблице 3.

Таблица 3. Характеристика посттрансплантационной терапии с ОЛЛ.

Посттрансплантационная терапия пациентов с ОЛЛ		
Характер терапии	С терапией N=12	Без терапии N=20
ИДЛ	2(16,7%)	-
ХТ+ИДЛ	2(16,7%)	-
ХТ	8(66,6%)	-

Характеристика группы больных с ОМЛ, получивших алло-ТГСК от гаплоидентичного донора

В группу больных с ОМЛ включено 24 пациента (42,9%). Возраст больных на момент гапло-ТГСК составил от 1 года до 19 лет (медиана возраста 9,5 лет). Варианты ОМЛ были следующими: вторичный ОМЛ (в ОМЛ) – 4 (17%) пациента, ОМЛ, трансформация из миелодиспластического синдрома (ОМЛ из МДС) – 1 (4%) больной, вариант М0 – 1 (4%) человек, вариант М1 – 3 (13%) реципиента, вариант М2 – 7 (29%), вариант М5 – 7 (29%) человек и вариант М7 –

1 (4%) пациент. Все больные с ОМЛ находились в состоянии химиорезистентного рецидива на момент выполнения гапло-ТГСК. С циторедуктивной целью 7 (29%) реципиентам, в период 45-30 дней до начала РК проведена ХТ по схеме FLAG – 5 человек, hAM – 2 пациента. Ответ на ХТ в виде снижения уровня бластов в костном мозге < 5% (в состоянии ответа после химиотерапии) наблюдали у 1 (14%) пациента, длительность ответа составила 30 дней до момента гапло-ТГСК.

Остальным 17 (71%) реципиентам РК проводили без предшествующей циторедуктивной ХТ.

Общий срок наблюдения больных составил от 1 года 3 месяцев до 5 лет 9 месяцев (медиана наблюдения составила 2 года). Характеристика группы представлена в таблице 4 и 4а.

Таблица 4. Общая характеристика больных с ОМЛ, получивших алло-ТГСК от гаплоидентичного донора.

Характеристики	N – 24 пациента
Медиана возраста (годы)	9,5 (1-19)
Медиана наблюдения (годы)	2 года (1,3-5,9)
Статус на момент трансплантации	
Все пациенты с химиорезистентным течением ОМЛ	24(100%)
После циторедуктивной ХТ	7(29%)
Без циторедуктивной ХТ	17(71%)
Режим кондиционирования	
МАК	5(21%)
МАК+Циклофосфан	1(4%)
РИК	9(37,5%)
РИК+Циклофосфан	9(37,5%)

Таблица 4а. Источник ГСК для пациентов с ОМЛ, получивших алло-ТГСК от гаплоидентичного донора.

Источник ГСК	
КМ	12(50%)
КМ+ПСКК	12(50%)
медиана CD34+ x10 ⁶ /кг	
КМ	8(2,6-20,4)
КМ+ПСКК	8(2,5-20,2)
медиана CD3+ x10 ⁷ /кг	
КМ	7,2(3,1-13,7)
КМ+ПСКК	3,3(2,4-6,9)
Совместимость по HLA-системе 3/6	14(100%)

С целью подготовки к проведению гапло-ТГСК использовалось МАК у 5 (21%) больных, МАК с введением циклофосфана в Д+3 и Д+4 с целью развития медикаментозной толерантности – 1 (4%) пациенту.

РИК получили 9 (37,5%) реципиентов, РИК с посттрансплантационным введением циклофосфана – 9 (37,5%) человек.

Всем пациентам в группе с ОМЛ, получившим гапло-ТГСК, проводили профилактику оРТПХ. Для 11 больных (45,8%) в РК был использован антитимоцитарный глобулин (АТГАМ, фирма «Pharmacia & Upjohn Company, США» 60мг/кг), 3 пациента (12,5%) получили в РК введение алемтузумаба (Кэмпас, фирма «Джензайм Корпорэйшн, США» 1,2мг/кг), циклофосфан в суммарной дозе 100 мг/кг (50мг/кг в Д+3 и Д+4) использован у 10 (41,7%) реципиентов. В случае применения посттрансплантационного циклофосфана, АЛГ не применялся. Базовая ИСТ ЦСА (3 мг/кг/сут) применялась у 12 (50%) больных, Такро (0,03 мг/кг/сут) у 12 (50%) пациентов. В дополнение к такролимусу, 10 (25%) пациентам, получившим в качестве профилактики оРТПХ в ранний посттрансплантационный период на Д+3 и Д+4 циклофосфан, с Д-3 назначали ингибитор m-TOR – сиролимус (1 мг/м²/сут).

Комбинированный трансплантат с использованием неманипулированных

стимулированных ГСК КМ и стимулированных, манипулированных ПСКК использовался у 12 (50%) реципиентов, стимулированный неманипулированный костный мозг трансплантирован 12 (50%) больным.

Клеточность трансплантата по CD34⁺ при использовании стимулированного неманипулированного КМ составила от 2,6 до 20,4x10⁶/кг (медиана 8,0 x10⁶/кг), и от 2,5 до 20,2x10⁶/кг (медиана 8,0 x10⁶/кг) для реципиентов, получивших комбинированный трансплантат. Содержание CD3⁺ в неманипулированном трансплантате было от 3,1 до 13,7 x10⁷/кг (медиана 7,2 x10⁷/кг), для комбинированного трансплантата составило от 2,4 до 6,9 x10⁷/кг (медиана 3,3 x10⁷/кг).

В группе больных с ОМЛ при сохранном соматическом статусе посттрансплантационную терапию, с целью профилактики рецидива, получили 9 (37,5%) человек: гипометилирующим агентом (5-Азацидин в дозе 50 мг/м² подкожное введение в течение 5 дней, 3 курса использовалась у 3 (33,3%) человек, ИДЛ в эскалирующих дозах от 1x10⁴/кг – 1x10⁶/кг по CD3⁺ 6 (66,7%) пациентам. Характеристика посттрансплантационной терапии отражена в таблице 5.

Таблица 5. Характеристика посттрансплантационной терапии пациентов с ОМЛ

Посттрансплантационная терапия пациентов с ОМЛ		
Характер терапии	С терапией N=9	Без терапии N=15
ИДЛ	6(66,7%)	-
ХТ+ИДЛ	-	-
Таргетная	3(33,3%)	-

Статистический анализ.

Анализ результатов терапии проведен в рамках ретроспективного исследования, с использованием соответствующих массиву данных методик статистической обработки и применением современного программного пакета

Statistica 8.0, и SPSS 17.0, с целью оценки конкурирующих рисков применялась программа «R», рекомендуемая к использованию Европейской ассоциацией трансплантации костного мозга (EBMT). Для построения графиков использовали табличный процессор Microsoft Excel. Функция выживаемости и кумулятивная вероятность наступления анализируемого события рассчитывалась по методу Kaplan-Meier. Сравнение медиан выполнено при помощи теста Mann-Whitney, сравнение разности долей, расчет относительного риска – при помощи точного теста Fisher. При анализе факторов прогноза, сравнение функций выживаемости выполнялось при помощи log-rank теста. Статистически значимыми считались различия при $p < 0,05$.

ГЛАВА 3

РЕЗУЛЬТАТЫ ГАПЛО-ТГСК У ДЕТЕЙ И ПОДРОСТКОВ С ОСТРЫМ МИЕЛОБЛАСТНЫМ ЛЕЙКОЗОМ И ОСТРЫМ ЛИМФОБЛАСТНЫМ ЛЕЙКОЗОМ

Острый миелобластный лейкоз.

В группе с ОМЛ гапλο-ТГСК выполнена у 24 пациентов. Из них приживление ГСК с достижением полного донорского «химеризма» зафиксировано у 18 (75%) человек.

У всех пациентов, достигших приживления, полный донорский химеризм определяли к 30-му дню после гапло-ТГСК – 18 (75%) пациентов. Медиана восстановления гранулоцитов (три последовательных дня $>0,5 \times 10^9/\text{л}$) составила Д+19 (Д+10 – Д+34), лейкоцитов ($>1,0 \times 10^9/\text{л}$) Д+17 (Д+10 – Д+34), тромбоцитов ($>20 \times 10^9/\text{л}$) Д+17 (Д+10 – Д+30) и медиана восстановления лимфоцитов ($>0,3 \times 10^9/\text{л}$) Д+30 (Д+14 – Д+43). Среди пациентов, достигших приживления, 1 (14%) имел ответ после проведения циторедуктивной терапии, количество бластов в костном мозге на момент гапло-ТГСК составила 6%.

Первичное неприживление трансплантата диагностировано у 6 (25%) реципиентов. Среди пациентов с неприживлением не было ответивших на ХТ, неприживление возникало у пациентов, имевших более 30% бластов в костном мозге на момент гапло-ТГСК.

Выживаемость пациентов

Общая выживаемость (ОВ) больных ОМЛ с медианой наблюдения 2 года составила 37,5% (рис. 5), безрецидивная выживаемость (БРВ) в группе равна 40,9% (рис. 6)

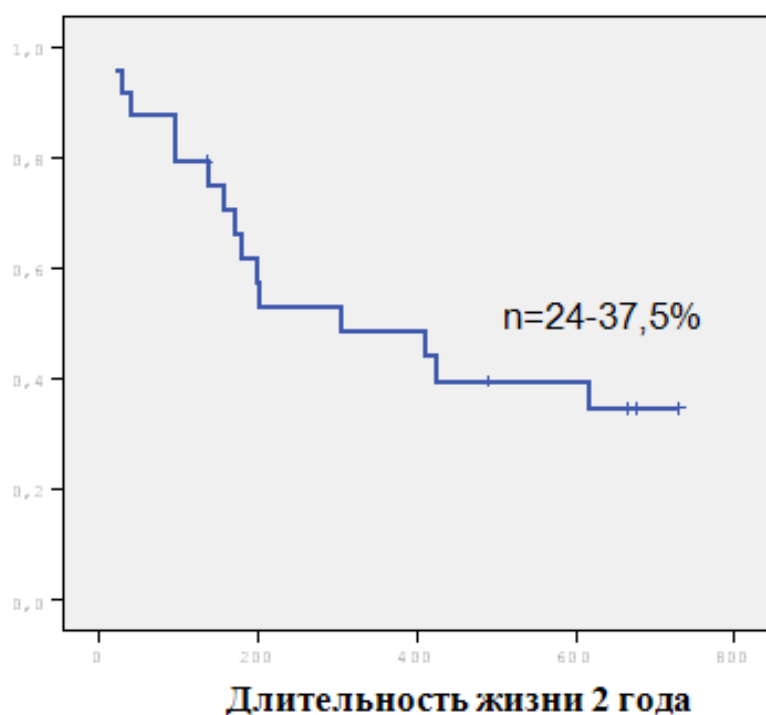


Рисунок 5. Трёх-летняя ОВ пациентов с ОМЛ после гапло-ТГСК. Ось X- время в днях, ось Y – общая выживаемость

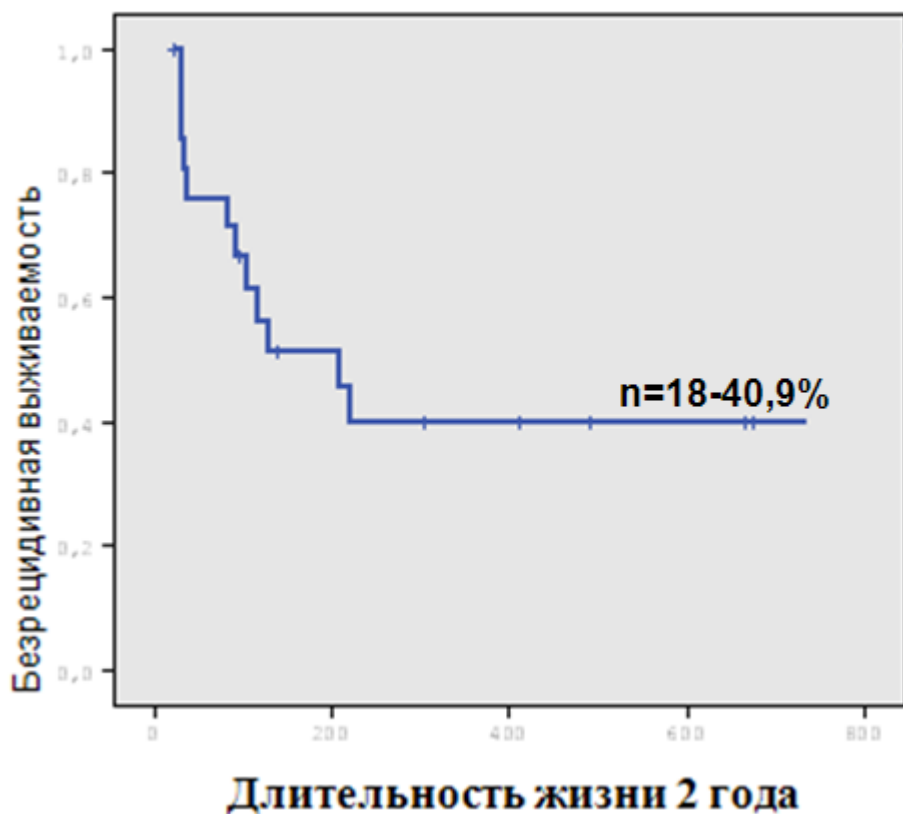


Рисунок 6. Трёх- летняя БРВ пациентов с ОМЛ после гапло-ТГСК. Ось X- время в днях, ось Y – безрецидивная выживаемость

Важным фактором, достоверно влиявшим на ОВ у этой группы больных, являлся возраст пациентов. Так, пациенты до 9 лет (n=12) имели более высокую 3-х летнюю ОВ – 58,3%, по сравнению с реципиентами, получившими гапло-ТГСК в возрасте старше 9 лет (n=12) – 16,7% (p=0,01) (рис. 7).

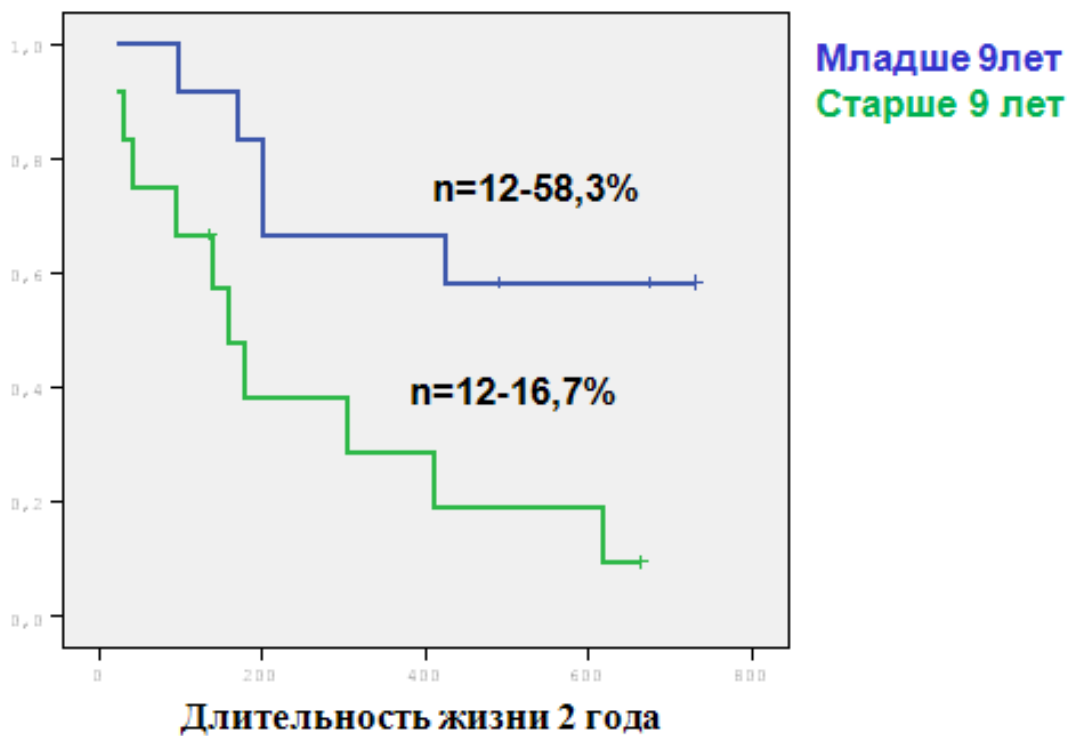


Рисунок 7. Трёх-летняя ОВ пациентов с ОМЛ после гапло-ТГСК в зависимости от возраста (log-rank 0,01). Ось X- время в днях, ось Y – общая выживаемость

Эффективность гапло-ТГСК зависела от качественных характеристик трансплантата. Было выполнено сравнение ОВ больных, получивших Г-КСФ праймированный неманипулированный КМ (n=12) и комбинацию Г-КСФ праймированного неманипулированного КМ и стимулированных ПСКК (CD34+ селекция – CliniMac) (в дальнейшем – комбинированный манипулированный трансплантат). Установлено, что 3-х летняя ОВ у пациентов, получивших Г-КСФ праймированный неманипулированным КМ была выше – 58,3%, по сравнению с 16,7% у реципиентов, получивших комбинированный трансплантат (p=0,05) (рис. 8).

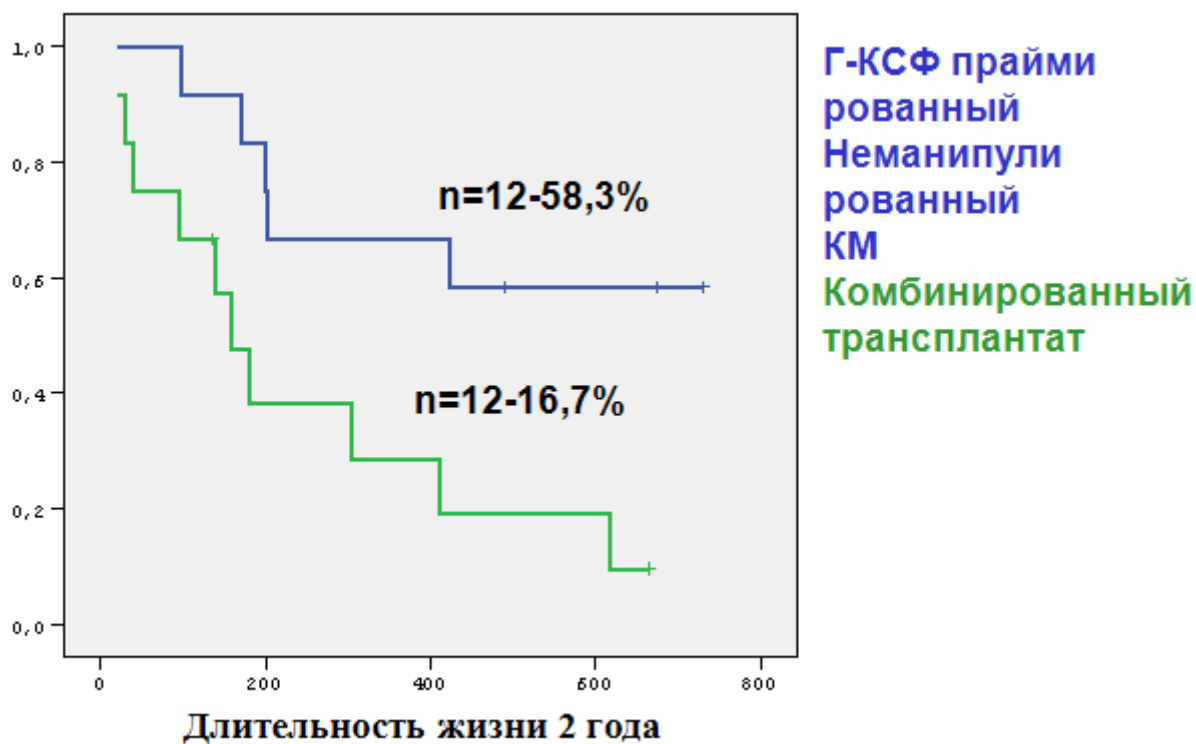


Рисунок 8. Трёх-летняя ОВ пациентов с ОМЛ после гапло-ТГСК в зависимости от источника трансплантат (log-rank 0,05). Ось X- время в днях, ось Y – общая выживаемость

В тоже время, не получено достоверного влияния на 3-х летнюю ОВ типа используемого донора (мать или отец/брат). При трансплантации ГСК от матери (n=19) 3-х летняя ОВ составила 36,8% по сравнению с 40% у реципиентов, получивших трансплантат от отца/брата (n=5) (p=0,97). Так же не наблюдается достоверного различия в 3-х летней ОВ при совпадении пар донор-реципиент по полу. Трёх-летняя ОВ в группе больных, трансплантировавшихся от совместимого по полу донора (n=8), составила 50% против 31,3% при несовместимости (n=16) (p=0,36) (рис. 9, 10).

комбинация (схема введения представлена в гл.2). При сравнении ОВ больных, получивших один из вариантов терапии после гапло-ТГСК (n=9) с реципиентами не получившими посттрансплантационную терапию (n=15) в виду значимых проявлений оРТПХ, получено достоверное влияние терапии на 3-х летнюю ОВ пациентов, которая составила 66,7% и 20%, соответственно (p=0,03) (рис. 11).

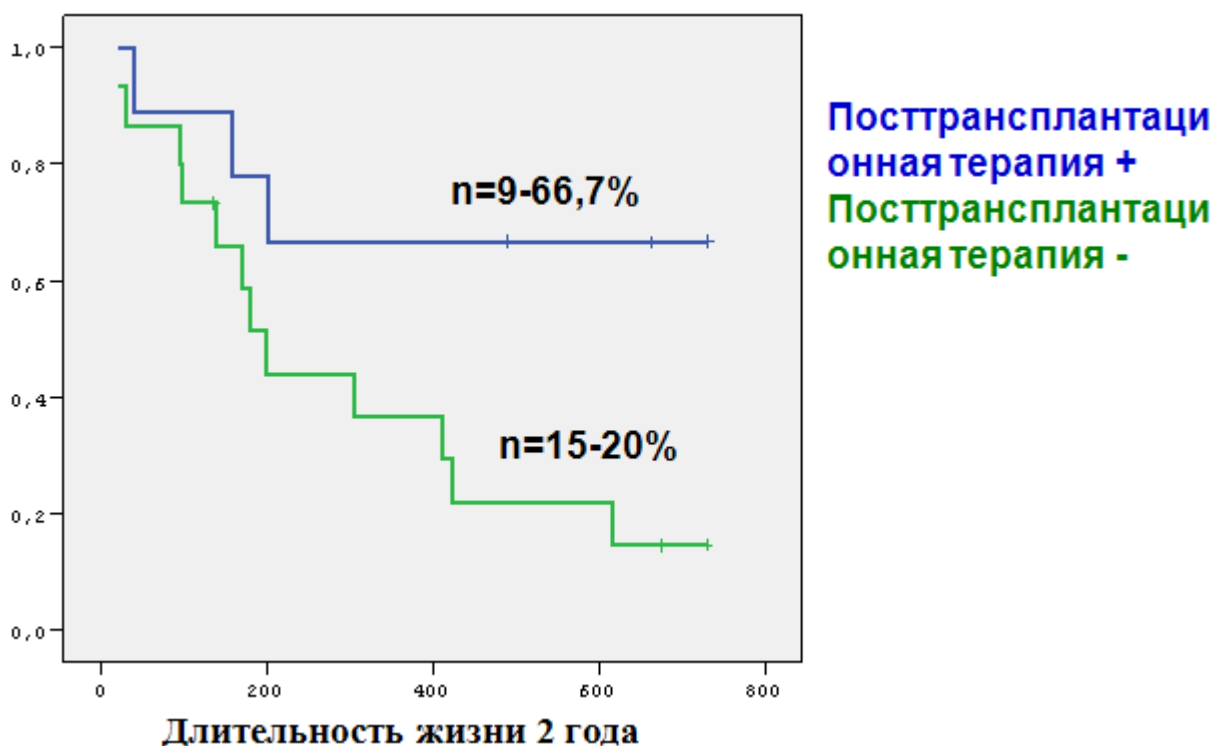


Рисунок 11. 2-х летняя ОВ пациентов с ОМЛ после гапло-ТГСК в зависимости от применения посттрансплантационной терапии (log-rank 0,03). Ось X- время в днях, ось Y – общая выживаемость

Нами был проведен анализ 3-х летней ОВ в зависимости от используемого режима кондиционирования. В связи с малочисленностью группы больных с ОМЛ, проведено разделение пациентов на следующие группы: получивших МАК (n=10), РИК (n=5) и МАК или РИК с введением ЦФ на Д+3, Д+4 (n=9). Не было получено достоверной разницы у этих групп больных. Трех-летняя ОВ больных после МАК составила 20%, РИК – 22,2%, в объединенной группе МАК и РИК с посттрансплантационным введением ЦФ после гапло-ТГСК – 60% (p=0,32) (рис. 12).

Для анализа 3-х летней ОВ в зависимости от проводимой профилактики

ОРТПХ, пациенты получившие в РК АТГАМ и Кэмпас объединены (n=14), вторую группу составили больные, которым в периоде на Д+3 и Д+4 введен ЦФ (n=10). При анализе 3-х летней ОВ в зависимости от проводимой профилактики ОРТПХ в группах больных получивших АТГАМ/Кэмпас или ЦФ различий не получено. Так, в группе пациентов, получивших АТГАМ/Кэмпас 3-х летняя ОВ составила 21,4% по сравнению с 60% у реципиентов с введением ЦФ после гапло-ТГСК (p=0,21) (рис. 13).

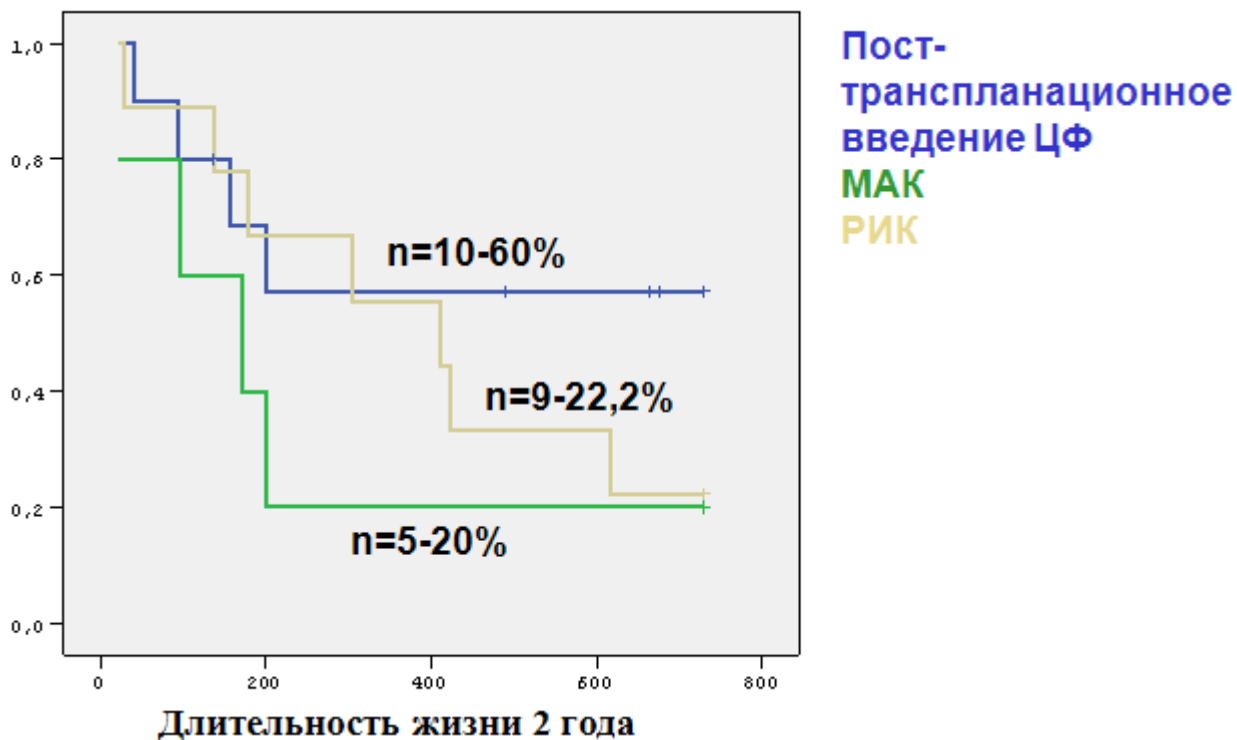


Рисунок 12. Трёх-летняя ОВ пациентов с ОМЛ после гапло-ТГСК в зависимости от РК (log-rank 0,32). Ось X- время в днях, ось Y – общая выживаемость

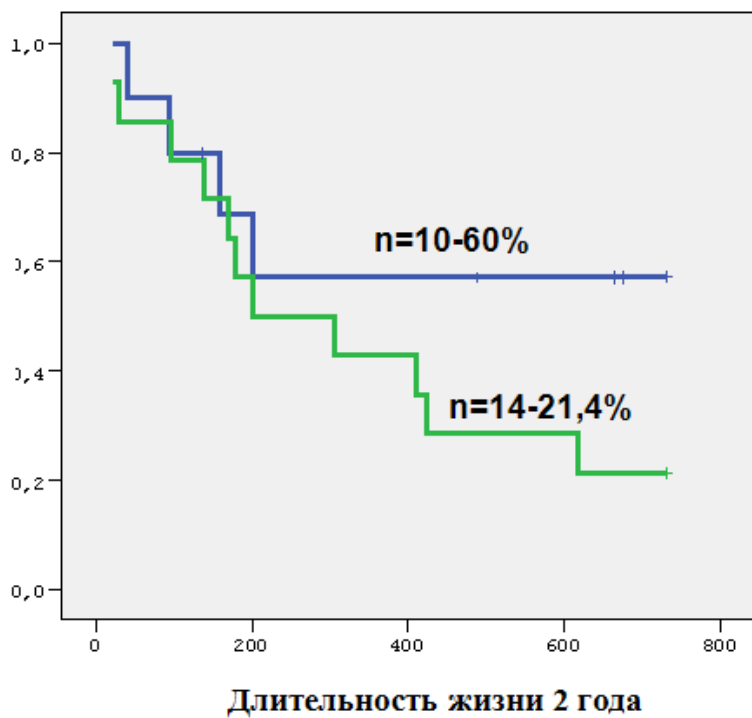


Рисунок 13. 2-х летняя ОВ пациентов с ОМЛ после гапло-ТГСК в зависимости от профилактики орТПХ (log-rank 0,21). Ось X- время в днях, ось Y – общая выживаемость

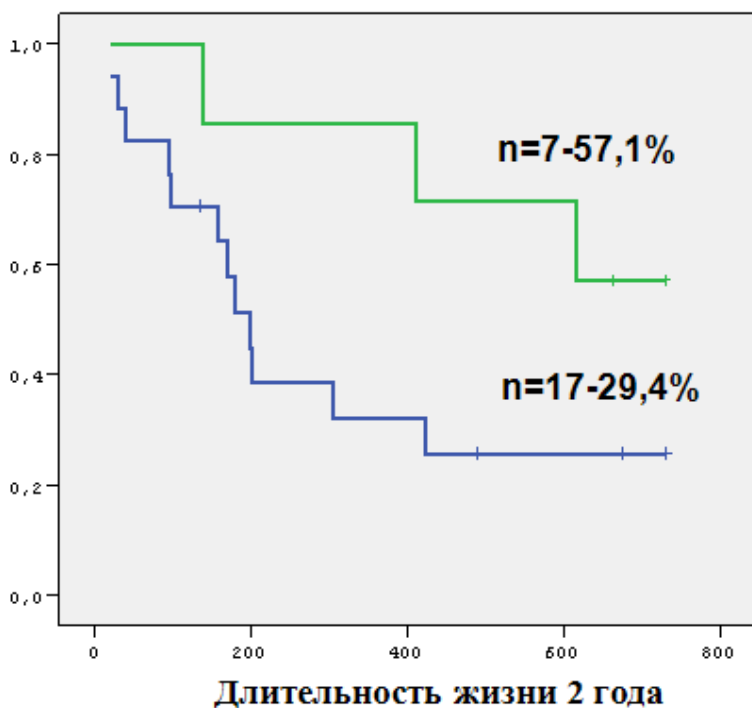


Рисунок 14. 2-х летняя ОВ пациентов с ОМЛ в зависимости от применения

циторедуктивной ХТ до гапло-ТГСК (log-rank 0,09). Ось X- время в днях, ось Y – общая выживаемость

При этом отмечено влияние на уровне тенденции (p=0,09) на 2-х летнюю ОВ больных, факта проведения курсов циторедуктивной ХТ (n=7) перед началом РК в отличие от больных, трансплантировавшихся в развернутой стадии ОМЛ (n=17), которая составила 57,1% и 29,4% соответственно (рис. 14).

В нашем исследовании не оказали влияния на 2-х летнюю ОВ клеточность трансплантата, оценённая по CD34⁺ и содержание CD3⁺-клеток, а также сроки восстановления нейтрофилов (>0,5x10⁹/л), лейкоцитов (>1,0x10⁹/л), лимфоцитов (лимфоциты>0,3x10⁹/л), тромбоцитов (>20x10⁹/л) и день достижения полного донорского химеризма.

Анализ возможных факторов, влияющих на 2-х летнюю ОВ пациентов с ОМЛ, основанный на унивариантном исследовании, представлен в таблице 6.

Таблица 6. Факторы, влияющие на ОВ при проведении гапло-ТГСК у детей и подростков с неблагоприятными формами ОМЛ

Фактор	Значение %	Значение p
Общая выживаемость в группе	37,5	
Возраст		
<9 лет	58,3	0,01
>9 лет	16,7	
Циторедуктивная ХТ перед гапло-ТГСК		
После циторедуктивной ХТ	57,1	0,09
Без циторедуктивной ХТ	29,4	
Используемый РК		
МАК	20	0,32
РИК	22,2	
МАК или РИК с введением ЦФ	60	
Способ заготовки гапло-ГСК		
Г-КСФ праймированный неманипулированный КМ	58,3	0,05
Комбинированный трансплантат	16,7	

Продолжение. Таблица 6. Факторы, влияющие на ОВ при проведении гапло-ТГСК у детей и подростков с неблагоприятными формами ОМЛ

Фактор	Значени %	Значение р
Применение посттрансплантационной терапии		
Гипомитилирующий препарат или ИДЛ в	66,7	0,03
Без посттранспланационной терапии	20	
Тип донора		
Мать	36,8	0,97
Отец/брат	40	
Совместимость по полу пар донор-реципиент		
Совместимые	50	0,36
Несовместимые	31,3	
Профилактика ОРТПХ		
Посттрансплантационное введение ЦФ	60	0,21
Применение в РК АТГАМа/Кэмпаса	21,4	
Клеточность трансплантата по медиане		
CD34⁺		
>8x10 ⁶ /кг CD34 ⁺ клеток	36,8	0,41
<8x10 ⁶ /кг CD34 ⁺ клеток	40	
CD3⁺		
>6x10 ⁷ /кг CD3 ⁺ клеток	44,4	0,76
<6x10 ⁷ /кг CD3 ⁺ клеток	50	
Нет данных	22,2	

Продолжение. Таблица 6. Факторы, влияющие на ОВ при проведении гапло-ТГСК у детей и подростков с неблагоприятными формами ОМЛ

Восстановление кроветворения по медиане		
Нейтрофилы		
Д+19 >0,5x10 ⁹ /л	38,5	0,54
После Д+19 > 0,5x10 ⁹ /л	36,4	
Лейкоциты		
Д+17 >1,0x10 ⁹ /л	33,3	0,85
После Д+17 >1,0x10 ⁹ /л	45,5	
Тромбоциты		
Д+17 >20x10 ⁹ /л	28,6	0,42
После Д+17 >20x10 ⁹ /л	55,6	
Лимфоциты		
Д+30 до уровня 0,3x10 ⁹ /л	40	0,33
После Д+30 до уровня 0,3x10 ⁹ /л	22,2	
Достижение полного донорского химеризма		
Достигшие полного донорского химеризма	35	0,42
Не достигшие полного донорского химеризма	50	

Таким образом, основными факторами, повлиявшими на 3-летнюю ОВ больных с резистентным течением ОМЛ или рецидивом при унивариантном анализе являются: возраст больного на момент гапло-ТГСК ($p=0,01$), способ заготовки гапло-ГСК ($p=0,05$) и факт применения одного из видов терапии после гапло-ТГСК ($p=0,03$).

Острый лимфобластный лейкоз.

В группе с диагнозом ОЛЛ под наблюдением находилось 32 пациента после гапло-ТГСК.

Приживление гаплоидентичного трансплантата достигнуто у 27 (84,4%)

детей и подростков с резистентными формами ОЛЛ. При этом полный донорский химеризм к 30-му дню после гапло-ТГСК констатирован у 23 (71,9%) пациентов, к 60-му дню – у 4 (12,5%) больных.

Медиана восстановления гранулоцитов ($>0,5 \times 10^9/\text{л}$) составила Д+19 (Д+14 – Д+32), лейкоцитов ($>1,0 \times 10^9/\text{л}$) Д+17 (Д+12 – Д+32), тромбоцитов ($>20 \times 10^9/\text{л}$) Д+17 (Д+12 – Д+41) и медиана восстановления лимфоцитов ($>0,3 \times 10^9/\text{л}$) Д+30 (Д+17 – Д+50). Первичное неприживание зафиксировано в 5 (15,6%) случаях на фоне резистентного течения болезни. Среди пациентов, не имевших приживания, у 3 (60%) не было ответа на курс циторедуктивной терапии до гапло-ТГСК, содержание бластов (медиана) в костном мозге на момент гапло-ТГСК составило 54% (50-98%).

Выживаемость пациентов

Трёх-летняя ОВ у детей и подростков после гапло-ТГСК в группе с резистентными формами ОЛЛ составила 31,3% (рис. 11), БРВ в группе составила – 33,3% (рис. 15).

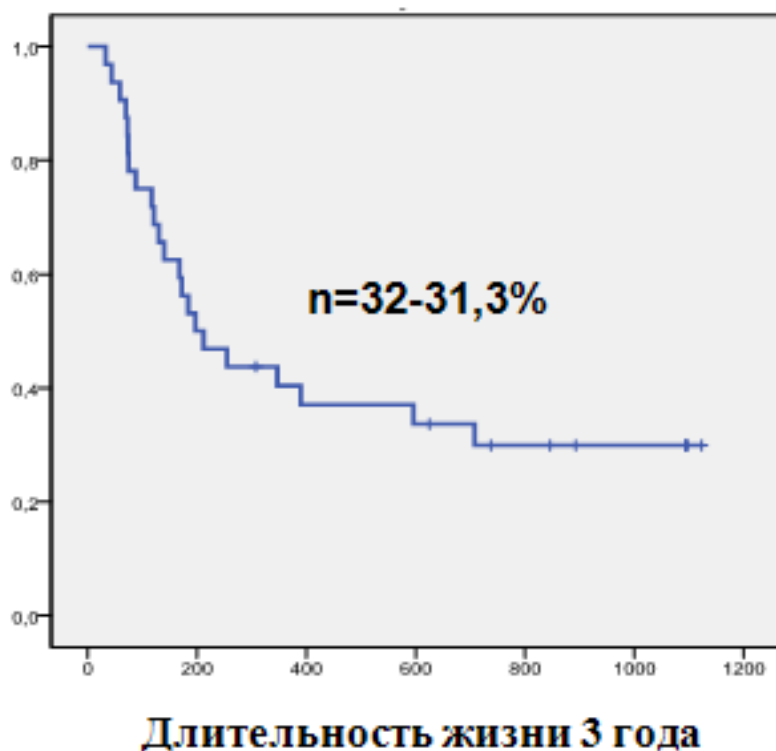


Рисунок 15. Трёх-летняя общая выживаемость детей и подростков с

химиорезистентным течением ОЛЛ после гапло-ТГСК. Ось X- время в днях, ось Y – общая выживаемость

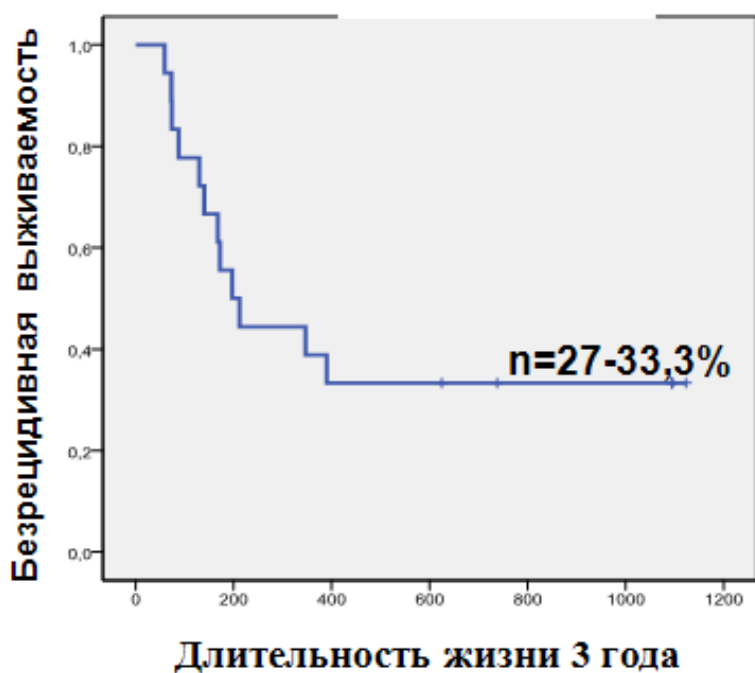


Рисунок 16. Трёх-летняя БРВ детей и подростков с химиорезистентным течением ОЛЛ после гапло-ТГСК. Ось X- время в днях, ось Y – безрецидивная выживаемость

Трёх-летняя ОВ пациентов, трансплантировавшихся в возрасте до 9 лет ($n=17$) составила 41,2% по сравнению с 20% у больных, возраст которых на момент гапло-ТГСК был старше 9 лет ($n=15$) (рис. 17). Однако, несмотря на имеющееся различие, это различие не были статистически достоверными ($p=0,2$). Не отмечалось влияния способа заготовки гапло-трансплантата на ОВ у детей и подростков с неблагоприятными формами ОЛЛ ($p=0,36$). Трёх летняя ОВ в этой группе составила 38,1% при трансплантации Г-КСФ праймированного неманипулированного КМ ($n=21$) и 18,2% у реципиентов комбинированного трансплантата ($n=11$) (Г-КСФ праймированный неманипулированный КМ и стимулированные ПСКК (CD34+ селекция – CliniMacs) (рис. 18).

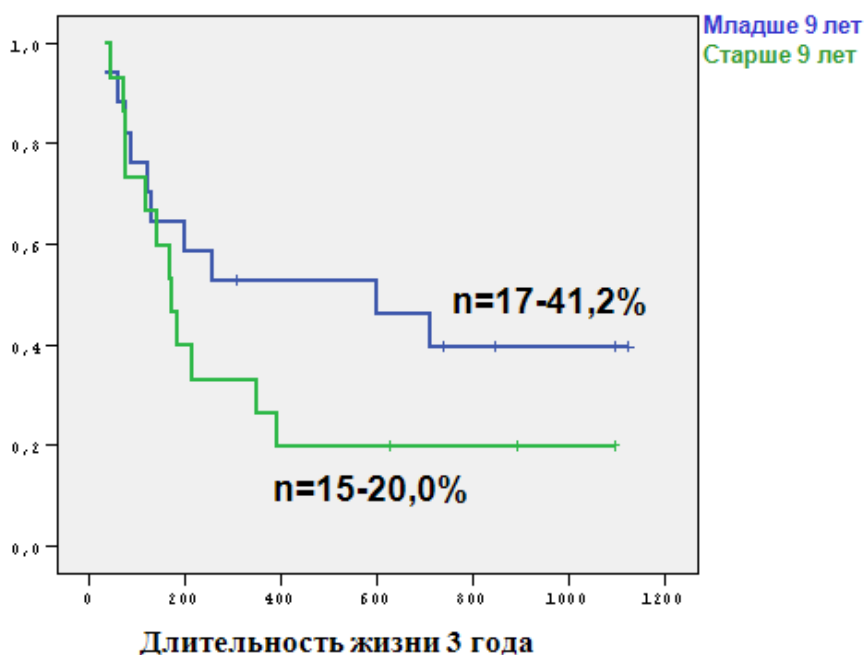


Рисунок 17. Трёх-летняя ОВ детей и подростков с химиорезистентным течением ОЛЛ после гапло-ТГСК в зависимости от возраста (log-rank 0,2). Ось X- время в днях, ось Y – общая выживаемость

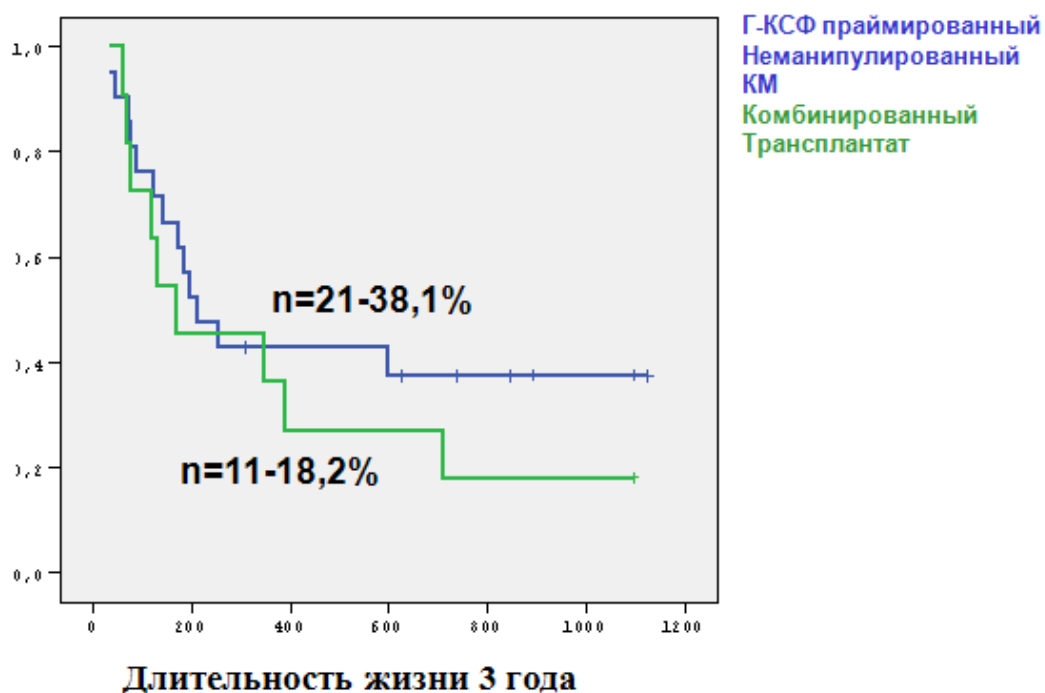


Рисунок 18. Трёх-летняя ОВ детей и подростков с химиорезистентным течением ОЛЛ после гапло-ТГСК в зависимости от способа заготовки гапто-трансплантата (log-rank 0,36). Ось X- время в днях, ось Y – общая выживаемость

Не оказал значимого влияния на ОВ тип используемого донора (мать против отец/брат). При трансплантации ГСК от матери (n=22) 3-х летняя ОВ

составила 22,7% по сравнению с 50% у больных, получивших трансплантат от отца/брата ($n=10$) ($p=0,16$) (рис.19). При совпадении пар донор-реципиент по полу ($n=16$) ОВ составила 43,8% и 18,8% при несовпадении ($n=16$), однако это различие не было статистически достоверным ($p=0,18$) (рис. 20).

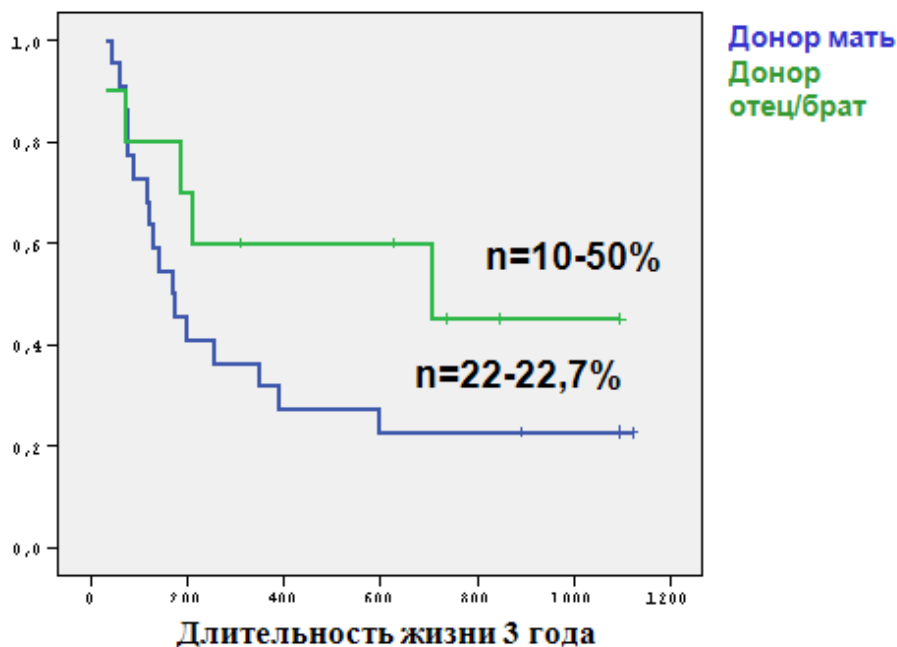


Рисунок 19. Трёх-летняя ОВ детей и подростков с химиорезистентным течением ОЛЛ после гапло-ТГСК в зависимости от типа донора (log-rank 0,16). Ось X- время в днях, ось Y – общая выживаемость

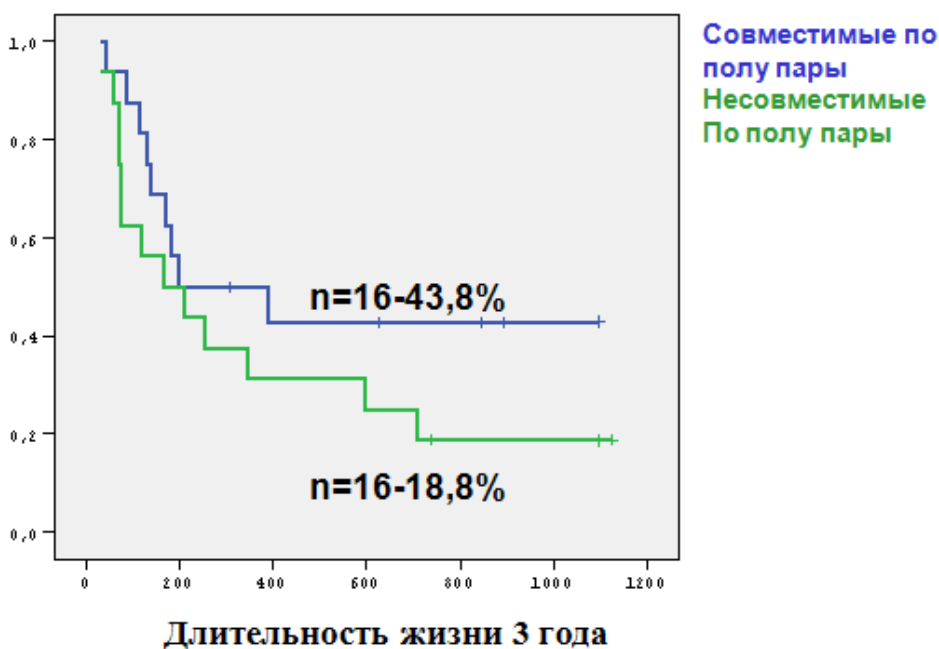


Рисунок 20. Трёх-летняя ОВ детей и подростков с химиорезистентным течением

ОЛЛ после гапло-ТГСК в зависимости от совместимости по полу пар донор-реципиент (log-rank 0,18). Ось X- время в днях, ось Y – общая выживаемость

С целью оценки эффективности нами был проведен анализ 3-х летней ОВ в зависимости от используемого РК. Учитывая небольшую группу больных с ОЛЛ, пациенты были разделены следующим образом: получившие МАК (n=15), РИК (n=9) и МАК или РИК с посттрансплантационным введением ЦФ (n=8). Не получено достоверного влияния РК на ОВ у этих групп больных. ОВ больных после МАК составила 40%, РИК – 11,1% у реципиентов получивших в посттрансплантационном периоде ЦФ после МАК или РИК – 37,5% (p=0,27) (рис. 21). Для анализа ОВ в зависимости от проводимой профилактики оРТПХ, больные, получившие в предтрансплантационном периоде АТГАМ и Кэмпас объединены (n=24), вторую группу составили больные, с посттрансплантационным введением ЦФ на Д+3 и Д+4 (n=8). Достоверных различий ОВ в этих группах не получено (p=0,72). В группе пациентов, получивших АТГАМ/Кэмпас, ОВ составила 29,2% и 37,5% у реципиентов с посттрансплантационным введением ЦФ (рис. 22).

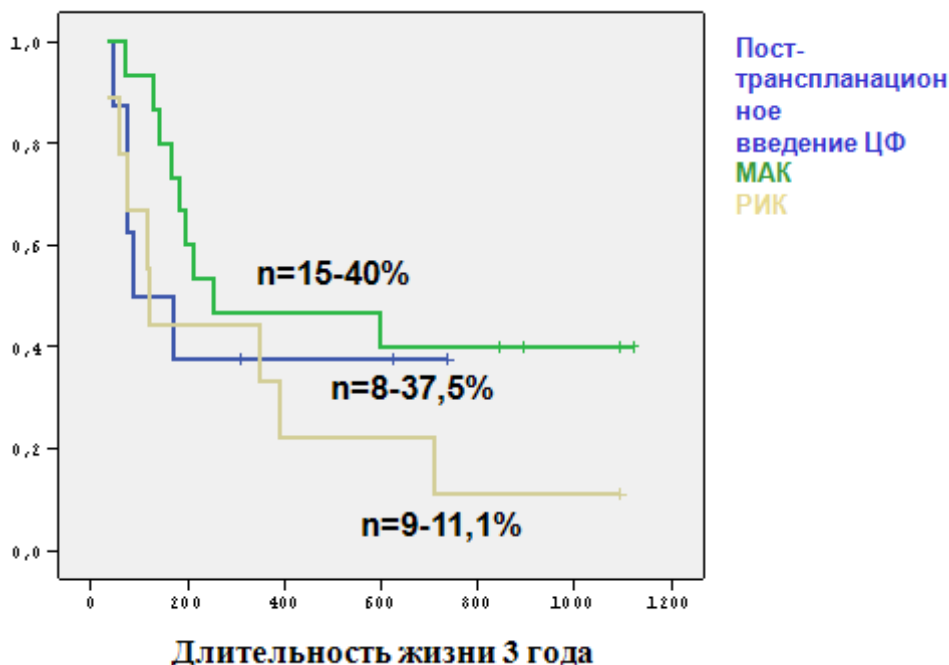


Рисунок 21. Трёх-летняя ОВ детей и подростков с химиорезистентным течением ОЛЛ после гапло-ТГСК в зависимости от РК (log-rank 0,27). Ось X- время в днях, ось Y – общая выживаемость

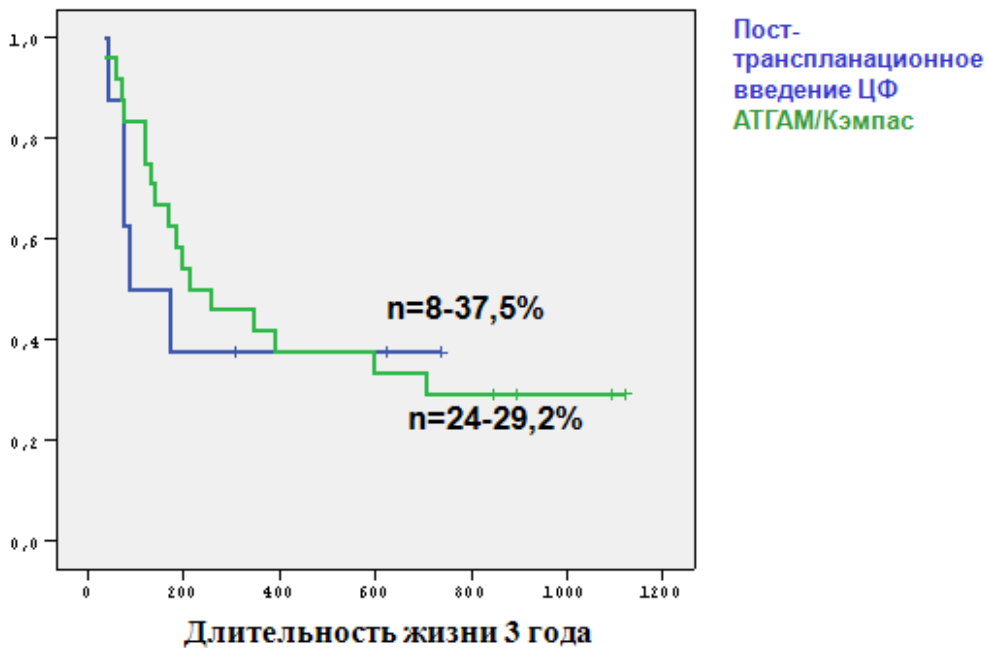


Рисунок 22. Трёх-летняя ОВ детей и подростков с химиорезистентным течением ОЛЛ после гапло-ТГСК в зависимости от профилактики оРТПХ (log-rank 0,72). Ось X- время в днях, ось Y – общая выживаемость

У пациентов с ОЛЛ значимое влияние оказал фактор восстановления лимфоцитов к Д+30 до уровня не менее $0,3 \times 10^9/\text{л}$. Пациенты, восстановившие лимфоциты к 30 дню после гапло-ТГСК до уровня $0,3 \times 10^9/\text{л}$ (n=11), имели 3-х летнюю ОВ равную 45,5% по сравнению с 11,8% без восстановления (n=17) (p=0,01). (рис. 23).

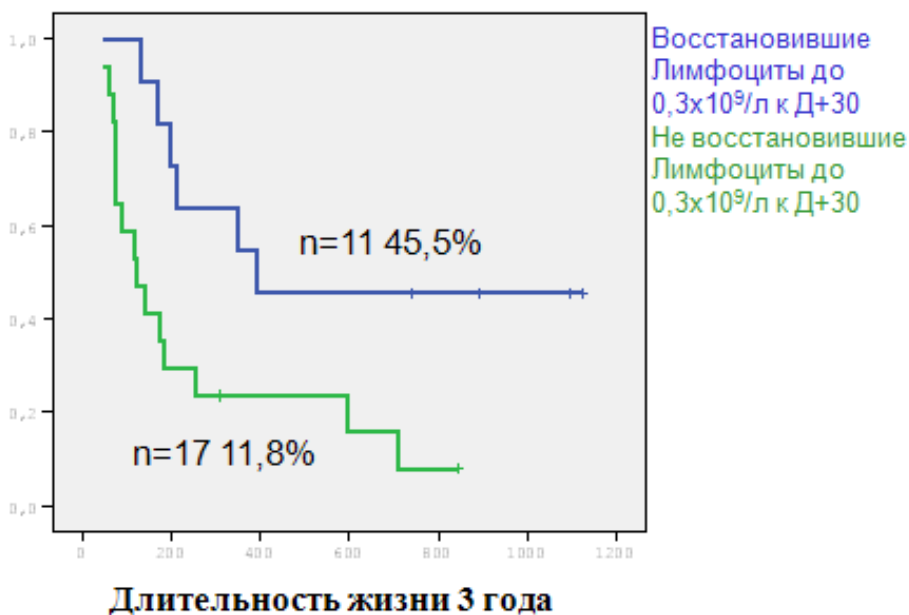


Рисунок 23. Трёх-летняя ОВ детей и подростков с химиорезистентным

течением ОЛЛ после гапло-ТГСК в зависимости от уровня восстановления лимфоцитов к 30-му дню после гапло-ТГСК (log-rank 0,01). Ось X- время в днях, ось Y – общая выживаемость

Однофакторный анализ не выявил влияния на 3-х летнюю ОВ таких факторов как клеточность трансплантата по CD34⁺/кг веса реципиента и CD3⁺/кг веса пациента, день приживления трансплантата по нейтрофилам (три последовательных дня нейтрофилы >0,5x10⁹/л), день восстановления по лейкоцитам (лейкоциты >1,0x10⁹/л), день восстановления по тромбоцитам (тромбоциты>20x10⁹/л) и день достижения полного донорского химеризма (эти данные приведены в таблице). Общие данные, свидетельствующие о факторах, влияющих на 3-х летнюю ОВ представлены в таблице 7.

Таблица 7. Влияние факторов на ОВ у детей и подростков, получивших гапло-ТГСК, с неблагоприятными формами ОЛЛ.

Фактор	Значение %	Значение р
Общая выживаемость в группе	31,3	
Возраст		
<9 лет	41,2	0,2
>9 лет	20	
Циторедуктивная ХТ перед гапло-ТГСК		
После циторедуктивной ХТ	62,5	0,01
Без циторедуктивной ХТ	20,8	
Используемый РК		
МАК	40	0,27
РИК	11,1	
МАК или РИК с введением ЦФ	37,5	
Способ заготовки гапло-ГСК Г-КСФ		
праймированный КМ	38,1	0,36
Комбинированный трансплантат	18,2	

Продолжение. Таблица 7. Влияние факторов на ОВ у детей и подростков, получивших гапло-ТГСК, с неблагоприятными формами ОЛЛ.

Фактор	Значение %	Значение р
Применение посттрансплантационной терапии		
ХТ, ХТ+ИДЛ или ИДЛ в	75	0,00
Без посттрансплантационной терапии	5	
Тип донора		
Мать	22,7	0,16
Отец/брат	50	
Совместимость по полу пар донор-реципиент	43,8	0,18
Совместимые	18,8	
Несовместимые		
Профилактика оРТПХ		
Введение ЦФ	37,5	0,72
Применение в РК АТГАМа/Кэмпаса	29,2	

Продолжение. Таблица 7. Влияние факторов на ОВ у детей и подростков, получивших гапло-ТГСК, с неблагоприятными формами ОЛЛ.

Клеточность трансплантата по медиане		
CD34⁺		
>7x10 ⁶ /кг CD34 ⁺ клеток	35,3	0,44
<7x10 ⁶ /кг CD34 ⁺ клеток	26,7	
CD3⁺		
>6x10 ⁷ /кг CD3 ⁺ клеток	44,4	0,26
<6x10 ⁷ /кг CD3 ⁺ клеток	25	
Нет данных	26,7	
Восстановление кроветворения по медиане		
Нейтрофилы		
Д+19 >0,5x10 ⁹ /л	27,3	0,9
После Д+19 >0,5x10 ⁹ /л	36,8	
Лейкоциты		
Д+17 >1,0x10 ⁹ /л	33,3	0,54
После Д+17 >1,0x10 ⁹ /л	33,3	
Тромбоциты		
Д+17 >20x10 ⁹ /л	33,3	0,48
После Д+17 >20x10 ⁹ /л	31,3	
Лимфоциты		
Д+30 до уровня 0,3x10 ⁹ /л	45,5	0,01
После Д+30 до уровня 0,3x10 ⁹ /л	11,8	
Достижение полного донорского химеризма		
Достигшие полного донорского химеризма	32	0,33
Не достигшие полного донорского химеризма	28,6	

Достоверная разница получена при анализе 3-х летней ОВ пациентов получивших перед началом РК курсы циторедуктивной ХТ (n=8) – 62,5% по

сравнению с 20,8% у больных, трансплантированных без предварительной ХТ (n=24) (p=0,01) (рис. 24).

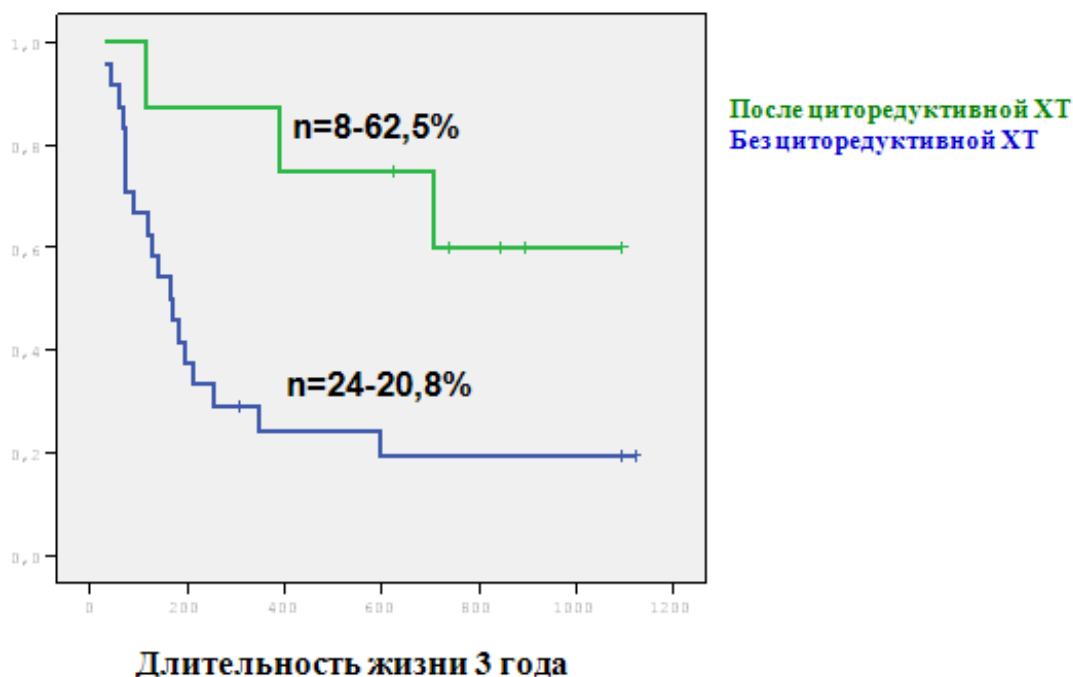


Рисунок 24. Трёх-летняя общая выживаемость детей и подростков с химиорезистентным течением ОЛЛ после гапло-ТГСК в зависимости от применения циторедуктивной ХТ и без на момент ТГСК (log-rank 0,01). Ось X- время в днях, ось Y – общая выживаемость

Ввиду высокой вероятности рецидива ОЛЛ после гапло-ТГСК, часть больных получила посттрансплантационную терапию, в случае отсутствия выраженных проявлений оРТПХ и при полной отмене базовой ИСТ. При этом 3-х летняя ОВ у реципиентов, получивших один из вариантов терапии после гапло-ТГСК (ХТ, ХТ+ИДЛ, ИДЛ) (n=12), значительно отличалась и составила 75% против 5% у больных, не получивших терапию в посттрансплантационном периоде (n=20) (p=0,00) (рис. 25).

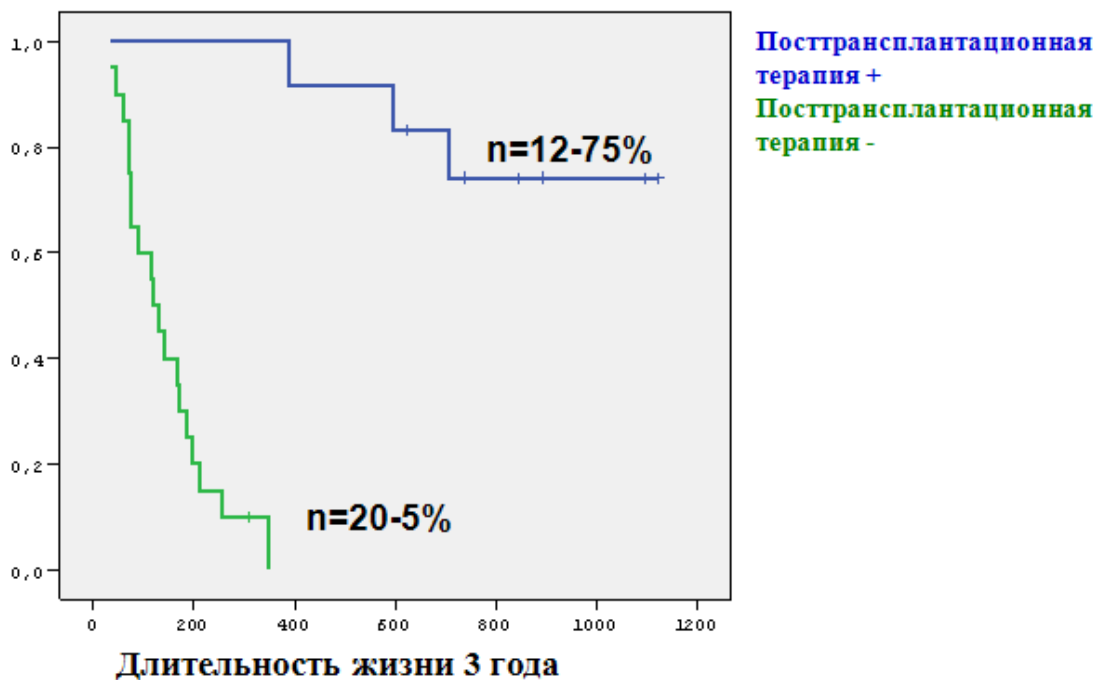


Рисунок 25. Трёх-летняя ОВ детей и подростков с химиорезистентным течением ОЛЛ после гапло-ТГСК в зависимости от факта применения посттрансплантационной терапии (log-rank 0,00). Ось X- время в днях, ось Y – общая выживаемость

Таким образом, основными факторами, повлиявшими на 3-х летнюю ОВ больных с резистентным течением ОЛЛ или рецидивом при унивариантном анализе являются: факт применения циторедуктивной ХТ перед гапло-ТГСК, что вероятнее всего, значительно уменьшает опухолевую массу на момент трансплантации, факт наличия одного из видов посттрансплантационной терапии и восстановление лимфоцитов до 30 дня с уровнем не менее $0,3 \times 10^9/\text{л}$.

ГЛАВА 4

ОБЩИЕ ДАННЫЕ О РЕЗУЛЬТАТАХ ГАПЛО-ТГСК У ДЕТЕЙ И ПОДРОСТКОВ С РЕЗИСТЕНТНЫМИ ФОРМАМИ ОСТРЫХ ЛЕЙКОЗОВ

В общей группе детей и подростков с резистентными формами острых лейкозов (ОМЛ – n=24; ОЛЛ – n=32) под наблюдением находилось 56 пациентов с медианой наблюдения 3 года.

По критериям EBMT приживление трансплантата зафиксировано у 46

(82,1%) пациентов. Первичное неприживление трансплантата наблюдалось у 10 (17,9%) человек с резистентным течением рецидива. При анализе восстановления кроветворения были получены следующие результаты: медиана восстановления гранулоцитов ($>0,5 \times 10^9/\text{л}$) составила Д+19 (Д+10 – Д+34), лейкоцитов ($>1,0 \times 10^9/\text{л}$) Д+17 (Д+10 – Д+34), тромбоцитов ($>20 \times 10^9/\text{л}$) Д+17 (Д+10 – Д+41) и медиана восстановления лимфоцитов ($>0,3 \times 10^9/\text{л}$) Д+29 (Д+14 – Д+50). При плановом рестадировании к 30-му дню полный донорский химеризм после гапло-ТГСК определялся у 41 (73,2%) пациента, к 60-му дню – у 5 (8,9%) больных.

Выживаемость пациентов.

По результатам проведенного исследования с медианой наблюдения 3 года 3-х летняя ОВ в группе пациентов с резистентными формами ОЛ составила 33,3% (рис. 26).

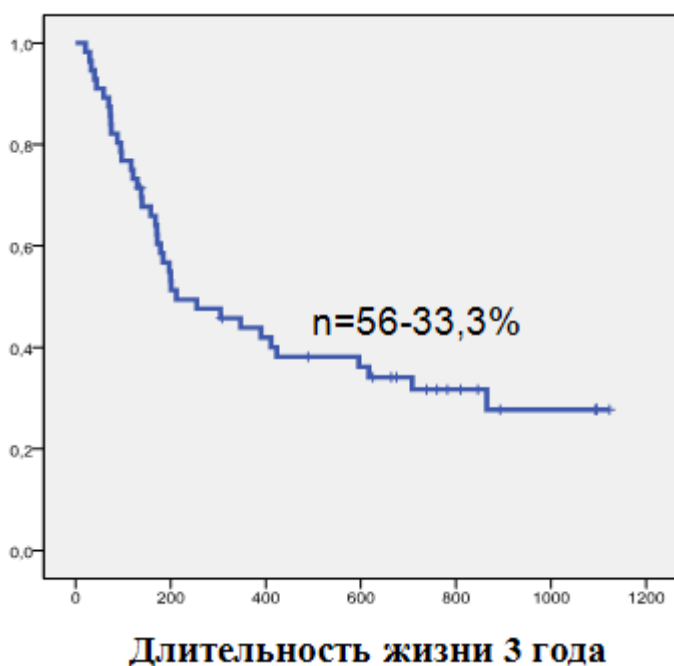


Рисунок 26. Трёх-летняя ОВ детей и подростков с резистентным течением ОЛ после гапло-ТГСК. Ось X- время в днях, ось Y – общая выживаемость

Проведение ХТ, с целью уменьшения опухолевой массы, перед началом РК, достоверно оказало влияние на 3-х летнюю ОВ ($p=0,00$), которая в группе больных с циторедуктивной ХТ перед началом РК ($n=15$) составила 50%, у реципиентов, получивших гапло-ТГСК без редукции объема опухолевой массы

– 26,8% (n=41) (рис. 27).

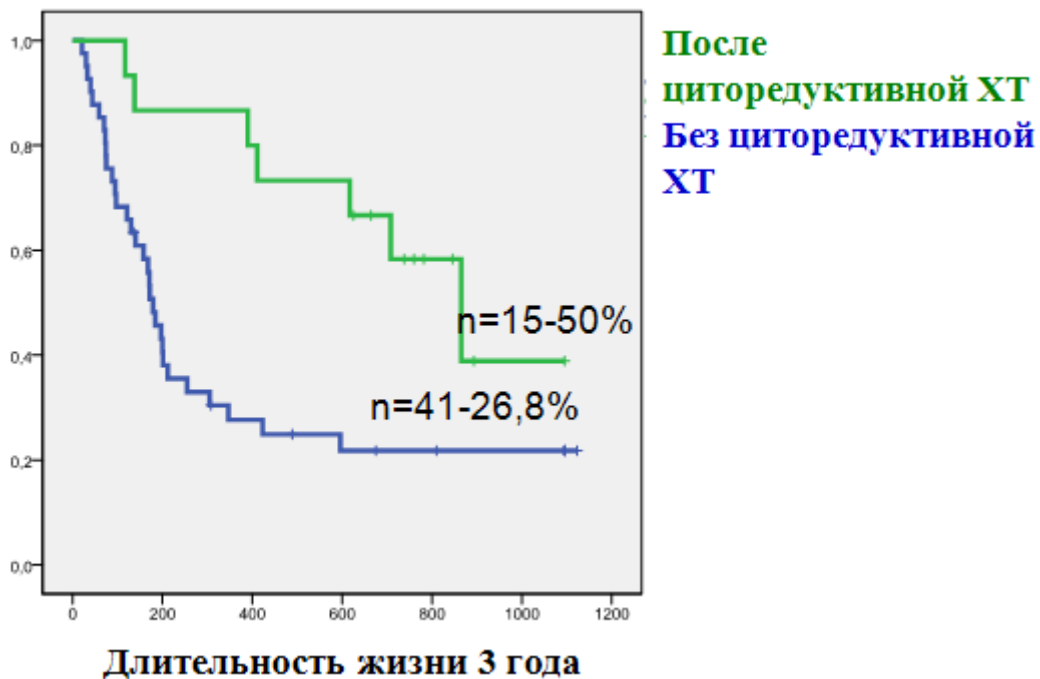


Рисунок 27. Трёх-летняя ОВ детей и подростков с резистентным течением ОЛ после гапло-ТГСК в зависимости от циторедуктивной ХТ и без на момент ТГСК (log-rank 0,00). Ось X- время в днях, ось Y – общая выживаемость

Пациенты, получившие гапло-ТГСК в возрасте младше 9 лет (n=30), имели достоверно более высокую 3-х летнюю ОВ равную 46,7% по сравнению со старшей возрастной группой (n=26), где ОВ была 18,5% (p=0,01) (рис. 28).

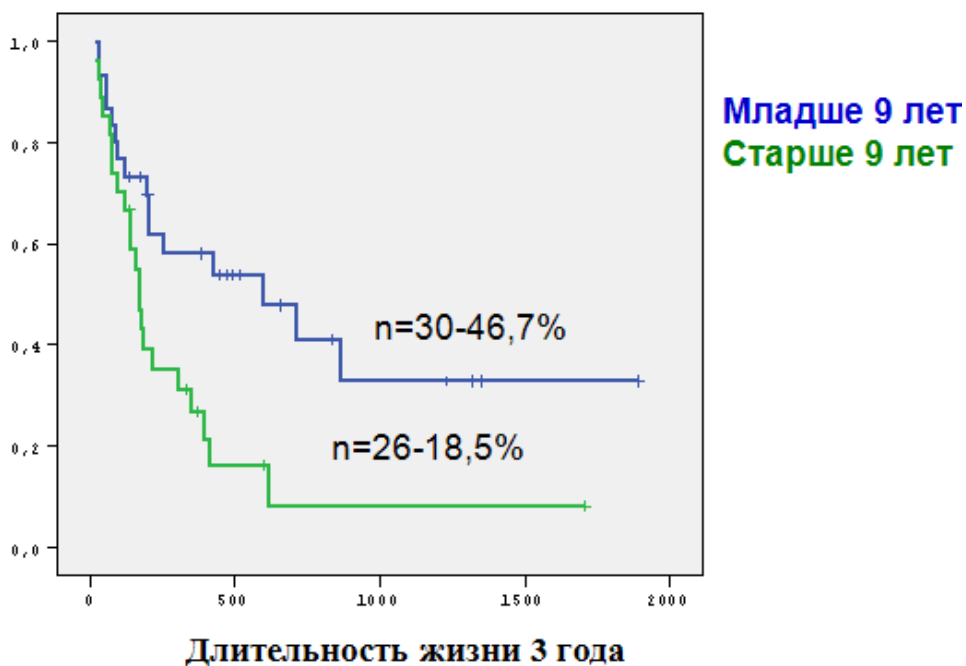


Рисунок 28. Трёх-летняя ОВ общая выживаемость детей и подростков с

резистентным течением ОЛ после гапло-ТГСК в зависимости от возраста (log-rank 0,01). Ось X- время в днях, ось Y – общая выживаемость

При сравнении 3-х летней ОВ пациентов, получивших Г-КСФ праймированный неманипулированный КМ (n=33) и комбинированный трансплантат (Г-КСФ праймированный неманипулированный КМ и стимулированные ПСКК (CD34+ селекция – CliniMacs)) (n=23) 3-х летняя ОВ составила 45,5% и 13% соответственно (p=0,03) (рис. 29).

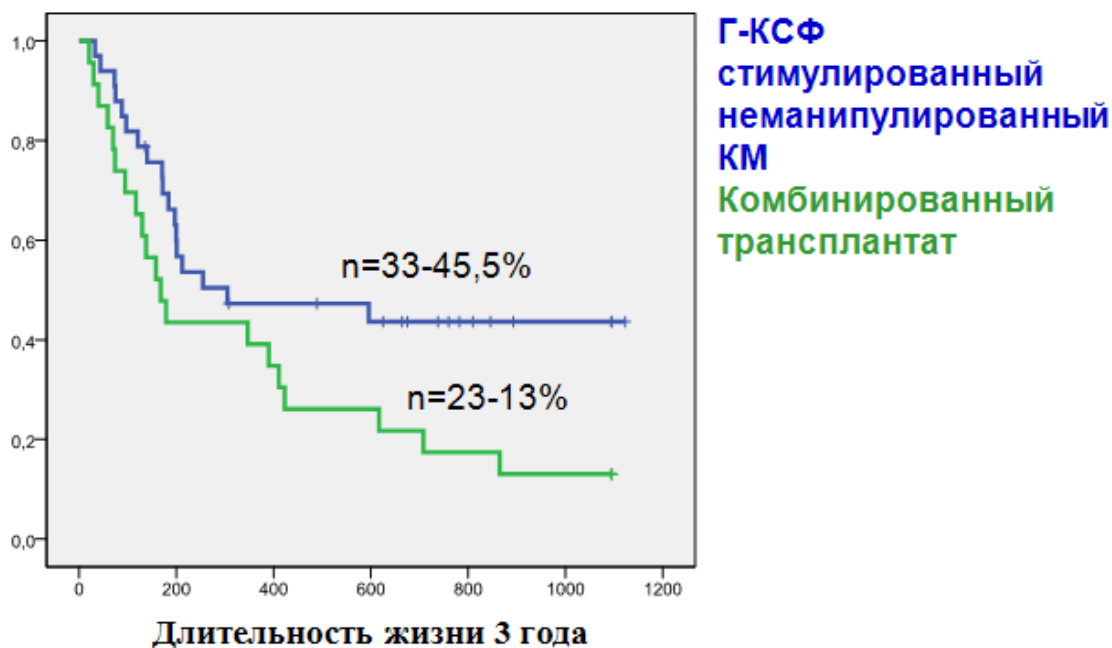


Рисунок 29. Трёх-летняя ОВ детей и подростков с резистентным течением ОЛ после гапло-ТГСК в зависимости от способа заготовки трансплантата (log-rank 0,03). Ось X- время в днях, ось Y – общая выживаемость

В общей группе больных детей и подростков с резистентным течением ОЛ 21 (37,5%) пациент получил в ранний период после гапло-ТГСК терапию с целью сохранения достигнутой ремиссии заболевания. При анализе 3-х летней ОВ с учетом факта применения одного из вариантов посттрансплантационной терапии, получена достоверная разница между группами: 3-х летняя ОВ пациентов у получивших ХТ (n=10) – 90%, ХТ+ИДЛ (n=5) – 60% и ИДЛ (n=6) – 50% по сравнению с 8,6% у больных без терапии (n=35) (p=0,00) (рис. 30).

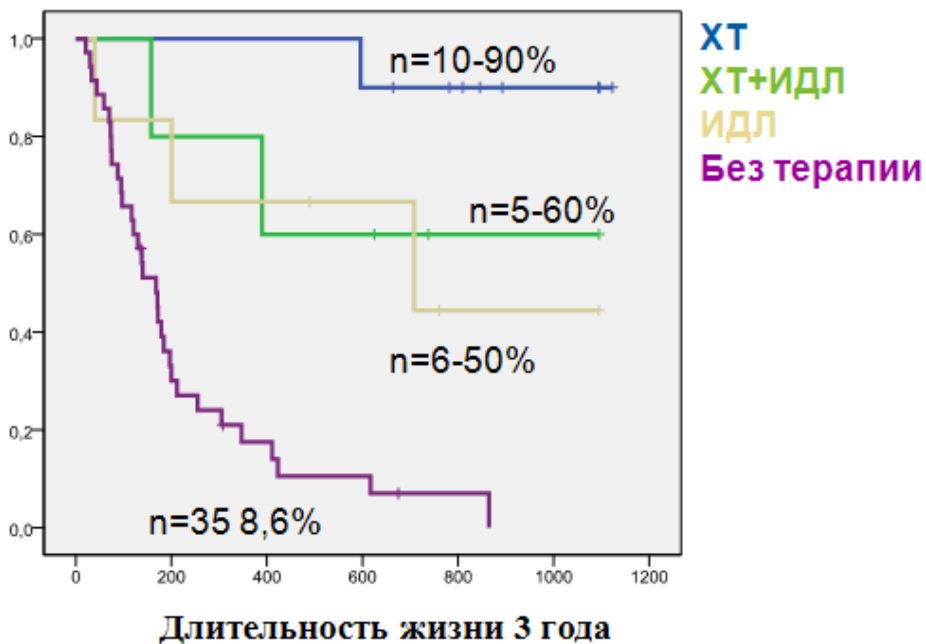


Рисунок 30. Трёх-летняя ОВ детей и подростков с резистентным течением ОЛ после гапло-ТГСК в зависимости от факта применения одного из вариантов посттрансплантационной терапии (log-rank 0,00). Ось X- время в днях, ось Y – общая выживаемость

Кроме того, удалось установить достоверное влияние на 3-летнюю ОВ факта восстановления к 30 дню после гапло-ТГСК до уровня лимфоцитов $0,3 \times 10^9/\text{л}$: пациенты, восстановившие лимфоциты (n=21) имели 3-летнюю ОВ равную 42,9% против 15,4% без восстановления (n=26) (p=0,00) (рис. 31).

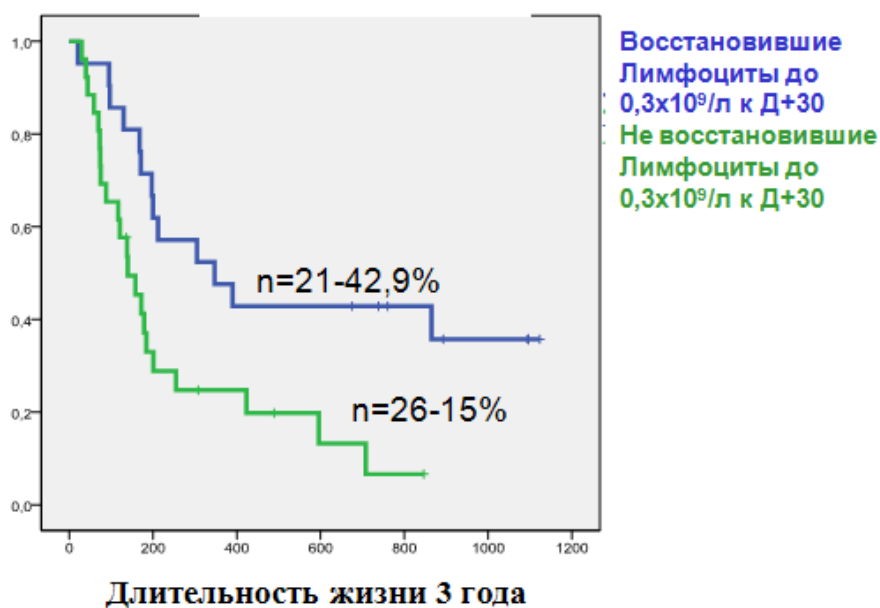


Рисунок 31. Трёх-летняя ОВ детей и подростков с резистентным течением ОЛ после гапло-ТГСК в зависимости от уровня восстановления лимфоцитов к 30-му

дню после гапло-ТГСК терапии (log-rank 0,03). Ось X- время в днях, ось Y – общая выживаемость

Влияние режима кондиционирования при выполнении гапло-ТГСК отмечалось на уровне тенденции. При использовании МАК 3-х летняя ОВ составила 35% (n=20), у реципиентов, получивших МАК+ЦФ – 20% (n=5), РИК– 11,1% (n=18) и у больных, трансплантировавшихся с РИК+ЦФ 61,5% (n=13). При сравнении 3-х летней ОВ между РИК+ЦФ и МАК различие имело тенденцию к достоверности (p=0,06) (рис. 32).

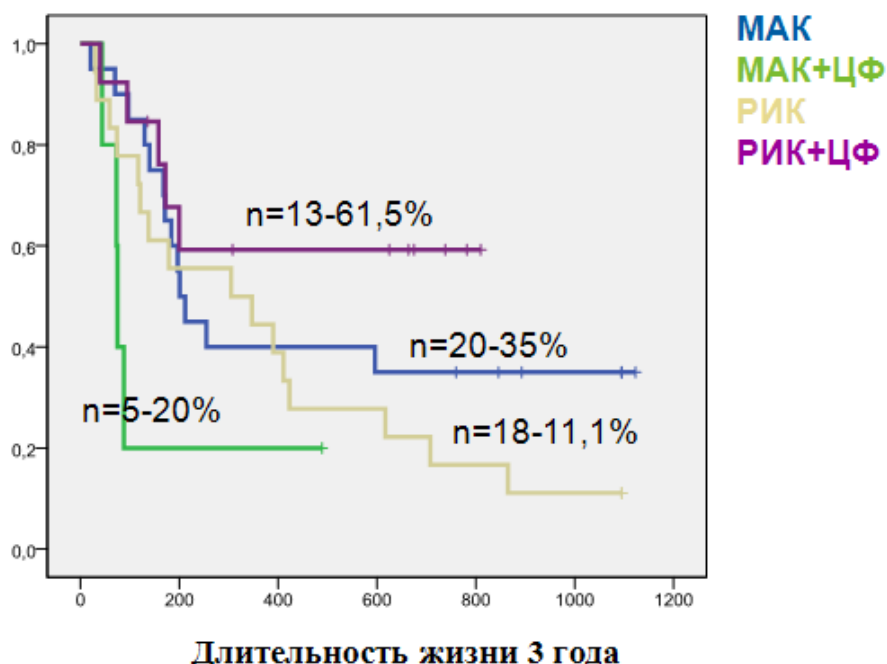


Рисунок 32. Трёх-летняя ОВ детей и подростков с резистентным течением ОЛ после гапло-ТГСК в зависимости от используемого РК (log-rank 0,06). Ось X- время в днях, ось Y – общая выживаемость

Не было достоверного отличия в 3-х летней ОВ при использовании в качестве донора ГСК матери по сравнению с отцом/братом (p=0,37). Трёх-летняя ОВ пациентов, трансплантировавшихся от матери составила 26,8% (n=41) по сравнению с 50% (n=16) у больных, получивших гапло-трансплантат от отца/брата (рис. 33). Так же не наблюдалось достоверного отличия в 3-х летней ОВ при совпадении пар донор-реципиент по полу 3-х летняя ОВ составила 40% (n=24), и 28,1% (n=32) при несовпадении (p=0,44) (рис. 34).

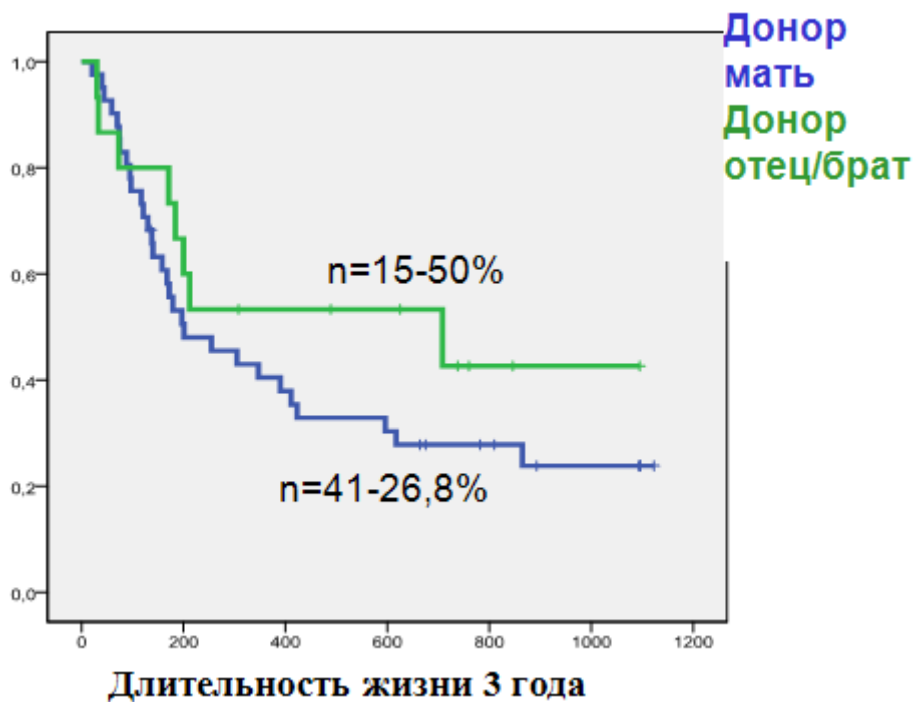


Рисунок 33. Трёх-летняя ОВ детей и подростков с резистентным течением ОЛ после гапло-ТГСК в зависимости от типа донора (log-rank 0,37). Ось X- время в днях, ось Y – общая выживаемость

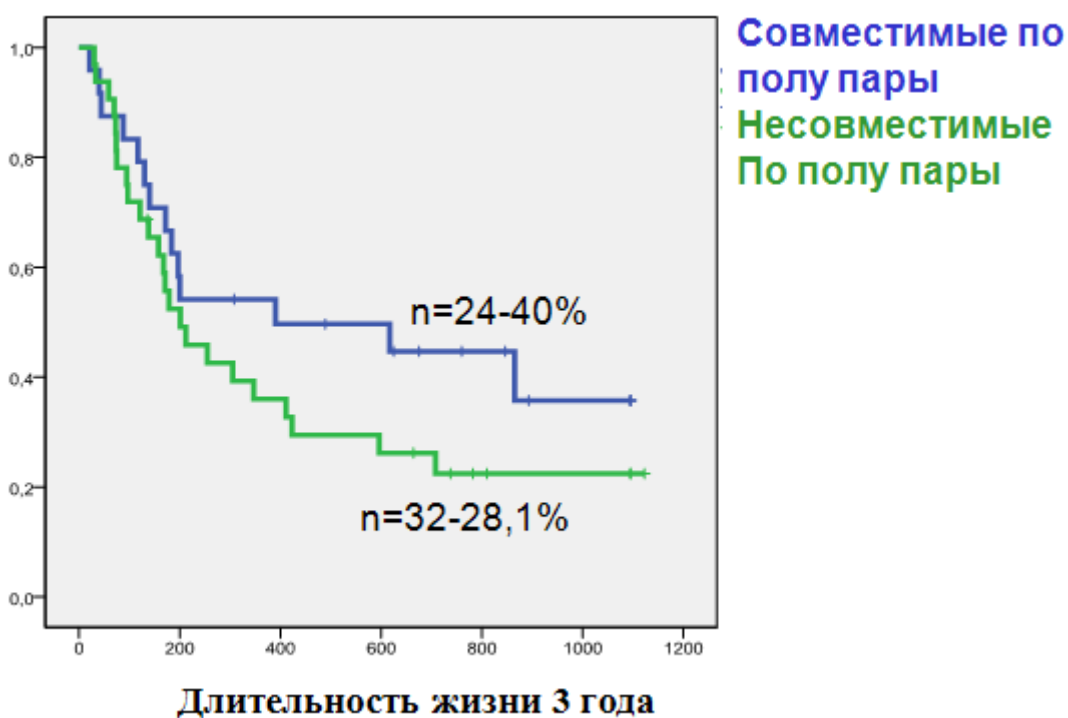


Рисунок 34. Трёх-летняя ОВ детей и подростков с резистентным течением ОЛ после гапло-ТГСК в зависимости от совместимости по полу пар донор-реципиент (log-rank 0,44). Ось X- время в днях, ось Y – общая выживаемость

Для оценки 3-х летней ОВ с учетом проводимой профилактики оРТПХ пациенты были разделены на следующие группы: получившие РК с включением АТГАМА/Кэмпаса (n=38) или введение циклофосфана (n=18) в раннем периоде после гапло-ТГСК на Д+3 и Д+4. При сравнении этих групп достоверных отличий в 3-х летней ОВ не было получено. В группе со стандартной профилактикой оРТПХ 3-х летняя ОВ составила 25,6% по сравнению с 50% у реципиентов, получивших посттрансплантационное введение ЦФ (p=0,44) (рис. 35).

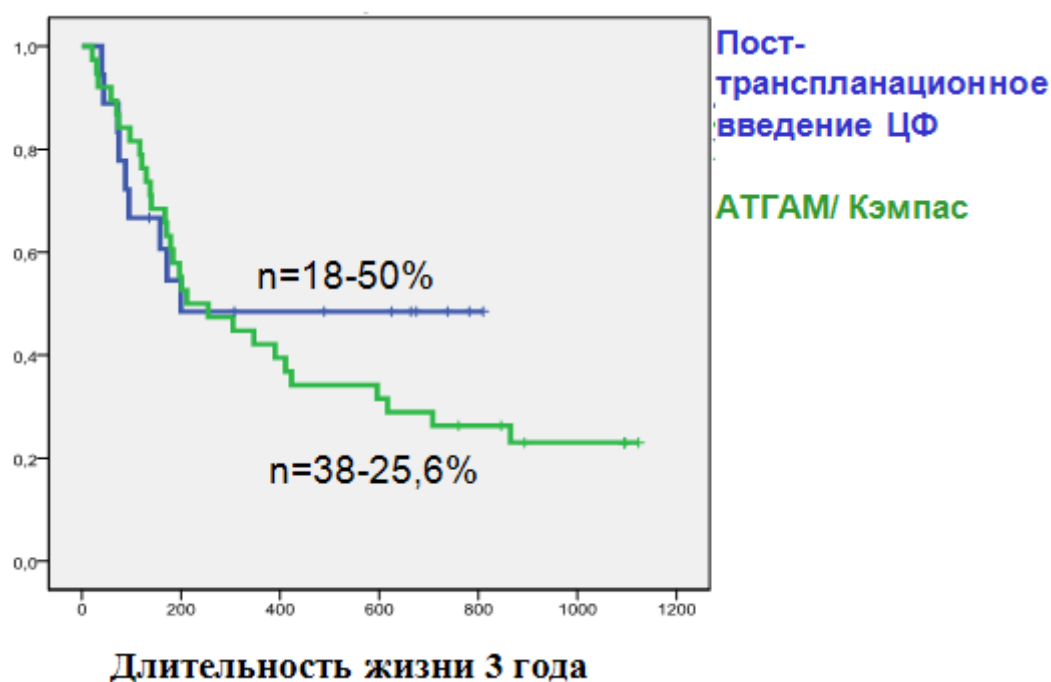


Рисунок 35. Трёх-летняя ОВ детей и подростков с резистентным течением ОЛ после гапло-ТГСК в зависимости от способа профилактики оРТПХ (log-rank 0,44). Ось X- время в днях, ось Y – общая выживаемость

В общей группе больных не оказали значимого влияния на 3-х летнюю ОВ такие факторы, как: клеточный состав трансплантата по CD34⁺/кг (> или < 7,0 x 10⁶/кг) (p=0,13) и CD3⁺/кг (> или < 6,0 x 10⁷/кг) (p=0,38), день приживления трансплантата по нейтрофилам (> или < Д+19) (p=0,56), лейкоцитам (> или < Д+17) (p=0,53) и тромбоцитам (> или < Д+17) (p=0,51). Пороговые значения выбраны на основании медиан в группах исследования. Влияние факторов на 3-х летнюю ОВ и их значения представлены в таблице 8.

Таблица 8. Влияние факторов на 3-х летнюю ОВ у детей и подростков с неблагоприятными формами ОЛ, получивших гапλο-ТГСК.

Фактор	3-х летняя ОВ (%)	Значение p
Общая выживаемость в группе	33,3	
Возраст		
<9 лет	46,7	0,01
>9 лет	18,5	
Терапия до гапло-ТГСК		
После циторедуктивной ХТ	50	0,02
Без циторедуктивной ХТ	26,8	
Используемый РК		
МАК	35	0,06
МАК+ЦФ	20	
РИК	11,1	
РИК+ЦФ	61,5	
Способ заготовки ГСК		
КМ	45,5	0,03
КМ+ПСКК	13	
Применение терапии после гапло-ТГСК		
ХТ	90	0,00
ХТ+ИДЛ	60	
ИДЛ	50	
Без терапии	8,6	
Восстановление лимфоцитов		
Д+30 до уровня $0,3 \times 10^9/\text{л}$	42,9	0,00
После Д+30 до уровня $0,3 \times 10^9/\text{л}$	15,4	

Продолжение. Таблица 8. Влияние факторов на 3-х летнюю ОВ у детей и подростков с неблагоприятными формами ОЛ, получивших гапло-ТГСК.

Фактор	3-х летняя ОВ (%)	Значение р
Донора		
Мать	26,8	0,37
Отец/сиблинг	50	
Совместимость по полу пар донор-реципиент		
Совместимые	40	0,44
Несовместимые	28,1	
Клеточность трансплантата по CD34+ клеток		
>7x10 ⁶ /кг по CD34+ клеток	36,1	0,13
<7x10 ⁶ /кг по CD34+ клеток	28,6	
по CD3+ клеток		
>6x10 ⁷ /кг по CD3+ клеток	44,4	0,38
<6x10 ⁷ /кг по CD3+ клеток	42,9	
Восстановление кроветворения		
Нейтрофилы		
Д+19 >0,5x10 ⁹ /л		
После Д+19 >0,5x10 ⁹ /л	32	0,56
Лейкоциты	36,7	
Д+17 >1x10 ⁹ /л		
После Д+17 >1x10 ⁹ /л	32	0,53
Тромбоциты	37,9	
Д+17 >20x10 ⁹ /л		
После Д+17 >20x10 ⁹ /л	30,8	
	38,5	0,51
Профилактика ОРТПХ		
АТГАМ/Кэмпас	25,6	0,44
Введение ЦФ Д+3 и Д+4	50	

В ходе унивариантного анализа были определены факторы, влияющие на эффективность и 3-х летнюю общую выживаемость больных после гапло-ТГСК.

Основываясь на полученных результатах унивариантного исследования, для применения в клинической практике, был проведен многофакторный анализ и построена модель с целью прогнозирования ОВ у детей и подростков с резистентными формами ОЛ. Предварительно проведя разведочный анализ с определением предикторов (прогностических факторов), влияющим на эффективность гапло-ТГСК. Для такого анализа была использована регрессионная модель Кокса.

Построение регрессии выполнено на списке предикторов.

Для такого анализа была использована регрессионная модель Кокса.

При выполнении регрессионного анализа Кокса (пошагового исключения) было получено, что для всех детей и подростков в общей группе, включенных в анализ (56 человек) с резистентными формами ОЛ на ОВ влияют следующие факторы:

- 1) Возраст пациента на момент гапло-ТГСК ($p=0,00$)
- 2) Приживление гапло-трансплантата ($p=0,01$)
- 3) Восстановление лимфоцитов до уровня $0,3 \times 10^9/\text{л}$ к 30-му дню после гапло-ТГСК ($p=0,07$)
- 4) Факт применения одного из вариантов посттрансплантационной терапии ($p=0,01$).

Таблица 9. Объединенные тесты коэффициентов модели

	Общий (балл)			Отличие от предыдущего шага			Отличие от предыдущего блока		
	Chi-Квадрат	с т.с.в.	Знч.	Chi-Квадрат	ст. св.	Знч.	Chi-Квадрат	ст. св.	Знч.
-2 Log Правдоподобия	189,539	37,606	4,000	39,522	4	,000	39,522	4	,000

Таблица 10. Переменные в уравнении

	В	Стд.Ошибк а	Вальд	ст. св.	Знч .	Exp(B)
Возраст <9лет >9лет	- 1,4 08	,432	10,608	1	,001	,245
Факт применения посттрансплантаци онной терапии	- 1,6 03	,497	10,403	1	,001	,201
Приживление трансплантата	- 1,3 00	,507	6,569	1	,010	,272
Восстановление лимфоцитов Д+30 до уровня $0,3 \times 10^9/\text{л}$	- ,74 8	,412	3,292	1	,070	,473

Модель построена на выборке из 47 записей, что обусловлено наличием пропусков в связи с отсутствием данных в переменной на четырех бинарных переменных и семейство кривых выживаемости будет представлено 16-ю ветвями. Модель можно считать валидной, однако один весовой коэффициент имеет уровень значимости 0,070. Общий хи-квадрат 37, 606 при 4-х степенях свободы. Отдельные ветви кривых выживаемости будут определяться 4-мя бинарными переменными, входящими в состав модели. Старшим предиктором будет переменная восстановление лимфоцитов Д+30 до уровня $0,3 \times 10^9/\text{л}$, т.к. она обладает наибольшим значением Exp(B), так, как представлено в таблице, затем идет переменная приживление трансплантата, возраст <9лет >9лет и последней переменной будет - факт применения посттрансплантационной терапии. В таком порядке переменные будут определять профиль кривых выживаемости.

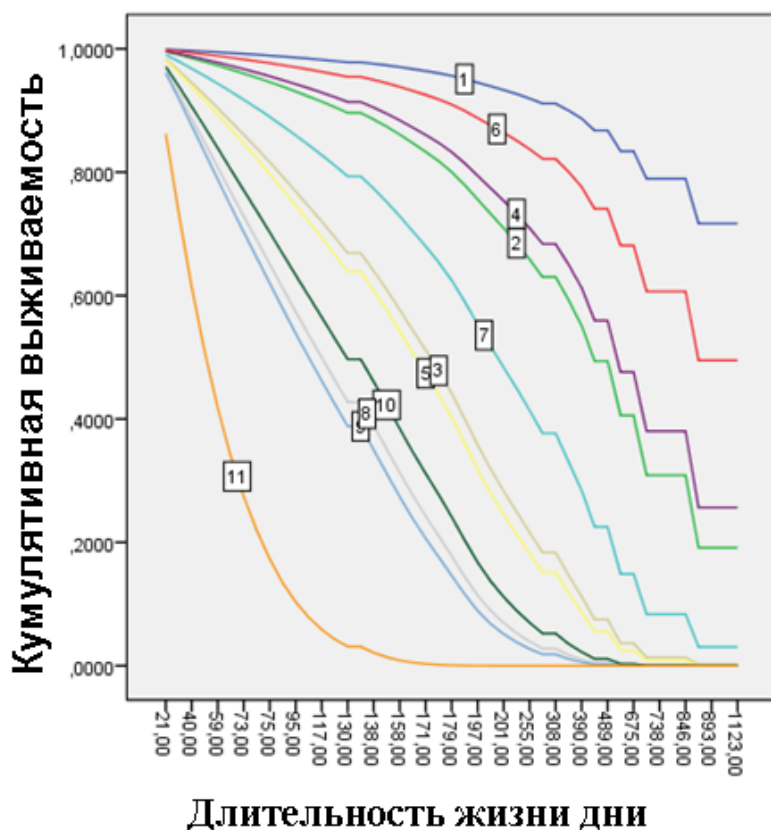
Всего для 4-х переменных должно быть 16 профилей. Реально наблюдаемые профили (11 шт.) и их встречаемости, а также значения весовых коэффициентов предикторов представлено на рисунке 36.

Комбинации предикторов в кодах БД					Профили	XBE 1 XBeta																
						-2,38553	-1,63736	-0,97759	-0,78270	-0,03453	0,51758	0,62524	1,07086	1,26575	1,37341	2,67369						
Восстановление лимфоцитов Д+30 до уровня 0,3x10 ⁹ /л	1	Возраст <9лет	Приживление трансплантата	1	Факт применения посттрансплантационной терапии	0	S1010	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
				1	S1011	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		2	Факт применения посттрансплантационной терапии	1	S1021	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		1	Приживление трансплантата	1	Факт применения посттрансплантационной терапии	0	S1110	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1	S1111	0	0	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	2	Возраст <9лет	Приживление трансплантата	1	Факт применения посттрансплантационной терапии	0	S2010	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
				1	S2011	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		2	Факт применения посттрансплантационной терапии	1	S2021	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0
1		Приживление трансплантата	1	Факт применения посттрансплантационной терапии	1	S2111	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	11	0	0	0	
2	Факт применения посттрансплантационной терапии	0	S2120	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0		
1	S2121	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0		

Рисунок 36. Коэффициенты предикторов и профили.

В отдельном столбце представлены профили, использованные при построении семейства кривых выживаемости, далее показана встречаемость этого профиля и вес, ему соответствующий. Профили построены на основе использования кодов базы данных. Сумма всех встречаемостей равна сумме случаев, представленных в базе.

Для анализа влияния каждой переменной на выживаемость можно воспользоваться введенными профилями. Например, влияние переменной Восстановление лимфоцитов Д+30 до уровня 0,3x10⁹/л, код которой стоит на первом месте профиля, можно получить взяв две кривые, которые отличаются кодом на первом месте профиля. Сравнив кривые профилей s1010 и s2010 (кривые 1, синий цвет и 6, красный) можно получить влияние переменной восстановления лимфоцитов Д+30 до уровня 0,3x10⁹/л при остальных переменных, заданных кодами 010. Аналогично можно произвести сравнение и для других профилей (рис. 37).



1-восстановление лимфоцитов до уровня $0,3 \times 10^9/\text{л}$ к Д+30, возраст <9 лет, достигшие приживления, посттрансплантационная терапия+

2-восстановление лимфоцитов до уровня $0,3 \times 10^9/\text{л}$ к Д+30, возраст <9 лет, достигшие приживления, посттрансплантационная терапия-

3-восстановление лимфоцитов до уровня $0,3 \times 10^9/\text{л}$ к Д+30, возраст <9 лет, не достигшие приживления, посттрансплантационная терапия-

4-восстановление лимфоцитов до уровня $0,3 \times 10^9/\text{л}$ к Д+30, возраст >9 лет, достигшие приживления, посттрансплантационная терапия+

5-восстановление лимфоцитов до уровня $0,3 \times 10^9/\text{л}$ к Д+30, возраст >9 лет, достигшие приживления, посттрансплантационная терапия-

6-не восстановившие лимфоциты до уровня $0,3 \times 10^9/\text{л}$ к Д+30, возраст <9 лет, достигшие приживления, посттрансплантационная терапия+

7-не восстановившие лимфоциты до уровня $0,3 \times 10^9/\text{л}$ к Д+30, возраст <9 лет, достигшие приживления, посттрансплантационная терапия-

8-не восстановившие лимфоциты до уровня $0,3 \times 10^9/\text{л}$ к Д+30, возраст <9 лет, не достигшие приживления, посттрансплантационная терапия-

9-не восстановившие лимфоциты до уровня $0,3 \times 10^9/\text{л}$ к Д+30, возраст >9 лет, достигшие приживления, посттрансплантационная терапия-

10-не восстановившие лимфоциты до уровня $0,3 \times 10^9/\text{л}$ к Д+30, возраст >9 лет, не достигшие приживления, посттрансплантационная терапия+

11-не восстановившие лимфоциты до уровня $0,3 \times 10^9/\text{л}$ к Д+30, возраст >9 лет, не достигшие приживления, посттрансплантационная терапия-

Рисунок 37. Трёх-летняя ОВ для детей и подростков с резистентным течением ОЛ после гапло-ТГСК с использованием регрессии Кокса.

Таким образом, при анализе семейства кривых выживаемости, видно, что основной вклад в улучшение приносят следующие анализируемые значения: достижение приживления, возраст < 9 лет, восстановление лимфоцитов до уровня $0,3 \times 10^9/\text{л}$ к 30 дню после гапло-ТГСК, факт наличия одного из вариантов посттрансплантационной терапии. Пациенты с резистентными формами ОЛ, не получившие в посттрансплантационный период терапию имеют значительно более низкую 3-х летнюю общую выживаемость.

ГЛАВА 5

ОСЛОЖНЕНИЯ ПОСЛЕ АЛЛО-ТГСК ОТ ГАПЛОИДЕНТИЧНОГО ДОНОРА У ДЕТЕЙ И ПОДРОСТКОВ С РЕЗИСТЕНТНЫМИ ФОРМАМИ ОСТРЫХ ЛЕЙКОЗОВ.

Острая реакция «трансплантат против хозяина».

Одним из основных осложнений после гапло-ТГСК являлась оРТПХ. Из 46 пациентов с зарегистрированным приживлением трансплантата ГСК, клинические признаки оРТПХ наблюдались в 33 (71,7%) случаях. Проявления оРТПХ I степени отмечались у 10 (30,3%) больных, II-IV степени у 23 (69,7%) реципиентов, при этом, тяжелые степени оРТПХ (III-IV степени) у 9 (27,3%) человек. В группе пациентов со значимыми клиническими проявлениями оРТПХ 22 пациента получили профилактику с использованием АТГАМа, 1 больной с введением ЦФ после гапло-ТГСК. Острую РТПХ не наблюдали у 13 (28,3%) реципиентов, 9 из которых после гапло-ТГСК получили введение ЦФ, у 4 больных использовали АТГАМ. Таким образом, в общей группе больных достоверно реже ($p=0,00$) наблюдались тяжелые степени оРТПХ после применения ЦФ в раннем периоде на Д+3 и Д+4. В дальнейшем, были проанализированы другие факторы, которые могли повлиять на частоту развития и тяжесть проявлений оРТПХ.

Не было отмечено достоверной разницы в развитии клинических форм оРТПХ в зависимости от диагноза ($p=0,3$). При ОЛЛ оРТПХ наблюдалась у 20 (71,4%) пациентов, из них 5 (17,9%) больных развили оРТПХ I степени и 15 (53,5%) человек – II-IV степень. В группе с ОМЛ у 13 (72,2%) реципиентов наблюдали развитие оРТПХ. Пятеро (27,8%) больных были с проявлениями оРТПХ I степени и 8 (44,4%) пациентов со II-IV степенью.

При трансплантации гапло-ГСК от матери диагностировали клинические проявления оРТПХ у 27 пациентов (81,8%) в отличие от донора отца/брата, где наблюдения были в 6 (18,2%) случаях ($p=0,05$). Тяжелую степень оРТПХ при гапло-ТГСК от матери II-IV степени развили 19 (57,6%) реципиентов по

сравнению с 4 (12,2%) больными при гапло-ГСК от отца/брата. Острая РТПХ I степени отмечалась у 8 (24,4%) пациентов и 2 (6%) соответственно.

При анализе развития оРТПХ в зависимости от способа заготовки ГСК от гаплоидентичного донора с одинаковой частотой наблюдали клинические проявления в группе больных, получивших Г-КСФ праймированный неманипулированный трансплантат и комбинированный трансплантат. Пациенты, не получившие трансплантат с применением Т-клеточной деплеции *ex vivo* в 17 (51,5%) случаях развили оРТПХ. При этом оРТПХ I степени отмечена у 6 (18,2%) больных, у 11 (33,3%) пациентов II-IV степени. В группе комбинированного трансплантата у 16 (48,5%) реципиентов наблюдались клинические проявления оРТПХ, I степень отмечена у 4 (12,1%), II-IV степень у 12 (36,4%).

Пациенты, не получавшие ХТ с целью циторедукции до гапло-ТГСК, в 23 (69,7%) случаях развили клинику оРТПХ: I степень отмечена у 6 (18,2%) больных, у 17 (51,5%) с проявлениями II-IV степени. Пациенты, у которых гапло-ТГСК была выполнена после ХТ в 10 случаях развили оРТПХ: у 4 (12,1%) пациентов наблюдали I степень, у 6 (18,2%) II-IV степень ($p=0,3$).

Возраст не оказал значимого влияния на частоту развития оРТПХ ($p=0,5$). У 15 (45,5%) пациентов младше 9 лет наблюдались клинические проявления иммунологической реакции. В 4 (12,1%) случаях отмечалось развитие оРТПХ I степени и у 11 (33,4%) больных РТПХ достигла II-IV степени. У реципиентов, старше 9 лет при проведении гапло-ТГСК проявления оРТПХ были в 18 (54,5%) случаях: у 6 (18,1%) человек соответствовали I степени оРТПХ, у 12 (36,4%) – II-IV степени.

Факт восстановления лимфоцитов до уровня $0,3 \times 10^9/\text{л}$ к 30 дню после гапло-ТГСК статистически не повлиял на частоту развития оРТПХ в группе детей и подростков с резистентным течением ОЛ ($p=0,5$). У 16 (48,5%) пациентов, восстановивших уровень лимфоцитов, диагностировали проявления оРТПХ: с развитием симптомов I степени – 5 (15,2%) человек, у 11 (33,3%) с II-IV степенью. Клинические проявления оРТПХ в группе больных, не восстановивших лимфоциты до уровня $0,3 \times 10^9/\text{л}$ к 30 дню, отмечались у 19 (57,6%) пациентов, с

проявлениями I степени у 14 (42,4%), у 5 (15,2%) наблюдались II-IV степень. Сводные данные о частоте развития ОРТПХ и факторах, на нее влияющих, представлены в таблице 11.

Таблица 11. Факторы и частота развития ОРТПХ после гапло-ТГСК у детей и подростков с резистентными формами ОЛ.

Фактор	Частота развития %	Значение p
Общая частота ОРТПХ в группе 71,7%		
I степень 30,3%		
II-IV степень 69,7%		
Профилактика ОРТПХ		
АТГАМа/Кэмпаса	84,8	
I степень	18,2	
II-IV степень	66,6	
ЦФ	15,1	0,00
I степень	12,1	
II-IV степень	3	
Диагноз		
ОЛЛ	71,4	
I степень	17,9	
II-IV степень	53,5	0,3
ОМЛ	72,3	
I степень	27,8	
II-IV степень	44,7	
Донор		
Мать	81,8	
I степень	24,2	
II-IV степень	57,6	0,05
Отец	18,2	
I степень	6	
II-IV степень	12,2	

Продолжение. Таблица 11. Факторы и частота развития ОРТПХ после гапло-ТГСК у детей и подростков с резистентными формами ОЛ.

Фактор	Частота развития %	Значение p
Источник ГСК:		
КМ+ПСКК	48,5	0,03
I степень	12,1	
II-IV степень	36,4	
КМ	51,5	
I степень	18,2	
II-IV степень	33,3	
Без ХТ до гапло-ТГСК	69,7	0,3
I степень	18,2	
II-IV степень	51,5	
ХТ до гапло-ТГСК	30,3	
I степень	12,1	
II-IV степень	18,2	
Возраст реципиента		
Младше 9 лет	45,5	0,5
I степень	12,1	
II-IV степень	33,4	
Старше 9 лет	54,5	
I степень	18,1	
II-IV степень	36,4	
Восстановление лимфоцитов до уровня $0,3 \times 10^9/\text{л}$ к Д+30	48,5	0,5
I степень	15,2	
II-IV степень	33,3	
Не восстановление лимфоцитов до уровня $0,3 \times 10^9/\text{л}$	57,6	
I степень	42,4	
II-IV степень	15,2	

Таким образом, на частоту и выраженность клинических проявлений ОРТПХ повлияли следующие факторы: способ фармакологической профилактики ОРТПХ – применение ЦФ в ранний период на Д+3 и Д+4 достоверно снижает частоту и выраженность иммунологической реакции ($p=0,00$); при использовании гапло-ГСК от матери возрастает частота и степень выраженности ОРТПХ ($p=0,05$); применение стимулированного Г-КСФ неманипулированного КМ не увеличивает частоту и выраженность ОРТПХ.

Признаки хронической РТПХ имелись у 11 (23,9%) человек, 10 больных развили распространенную форму, 1 пациент локальную.

В анализируемой группе больных тяжелые проявления ОРТПХ и хронической наблюдались с одинаковой частотой – 27,3% и 23,9% соответственно.

Инфекционные осложнения.

Учитывая выраженность иммуносупрессивной терапии и высокую предлеченность больных, неотъемлемым осложнением гапло-ТГСК являлись инфекции. В группе анализируемых больных у 34 (60,7%) реципиентов гапло-ГСК развились инфекционные осложнения. В раннем посттрансплантационном периоде (до Д+100) были диагностированы следующие: комбинированная инфекция – поражение аспергиллезом легких и реактивация цитомегаловируса (ЦМВ) у 14 (41,2%) больных, аспергиллез легких в 12 (35,3%) случаях, с реактивацией ЦМВ 4 (11,8%) человека, катетер-ассоциированная инфекция подтверждена у 3 (8,8%), токсоплазмоз головного мозга - 1 (2,9%) пациент.

При анализе частоты развития инфекционных осложнений в зависимости от проводимой профилактики ОРТПХ получено, что в группе больных, после использования АТГАМа/Кэмпас у 25 (73,5%) человек развились осложнения, при применении ЦФ у 9 (50%) реципиентов, включая рективацию ЦМВ-инфекции. Статистической достоверности влияния используемой профилактики ОРТПХ на частоту развития инфекционных осложнений у данной группы больных не получено ($p=0,2$).

Структура инфекционных осложнений в группе стандартной профилактики ОРТПХ была следующей: комбинированная инфекция – поражение аспергиллезом легких и реактивация цитомегаловируса (ЦМВ) у 10 (40%) больных, аспергиллез легких в 10 (40%) случаях, с реактивацией ЦМВ 3 (12%) человека, катетер ассоциированная инфекция подтверждена у 2 (8%).

Анализ группы больных с введением ЦФ после гапло-ТГСК показал следующее: комбинированная инфекция – поражение аспергиллезом легких и реактивация ЦМВ – 3 (33,3%) реципиента, аспергиллез легких развился у 2 (22,3%) больных, реактивация ЦМВ – 3 (33,3%) случая и катетер ассоциированная инфекция диагностирована у 1 (11,1%) больного.

Сводные данные по структуре инфекционных осложнений представлены в таблице 12. Структура инфекционных осложнений в зависимости от проводимой профилактики ОРТПХ в таблице 13.

Таблица 12. Структура инфекционных осложнений после гапло-ТГСК у детей и подростков с резистентными формами ОЛ.

Структура	Кол-во больных (n=34)	% значение
Грибковая инфекция+ЦМВ	14	41,2
Аспергиллез легких	12	35,3
Реактивация ЦМВ	4	11,8
Катетер ассоциированная инфекция	3	8,8
Токсоплазмоз головного мозга	1	2,9

Таблица 13. Структура инфекционных осложнений после гапло-ТГСК у детей и подростков с резистентными формами ОЛ в зависимости от используемой профилактики оРТПХ (p=0,2).

Структура	ЦФ		АТГАМ/Кэмпас	
	Кол-во больных (n=9)	% значение (50)	Кол-во больных (n=25)	% значение (73,5)
Грибковая инфекция+ЦМВ	3	33,3	10	40
Аспергиллез легких	2	22,3	9	36
Реактивация ЦМВ	3	33,3	3	12
Катетер ассоциированная инфекция	1	11,1	2	8
Токсоплазмоз головного мозга	-	-	1	4

Рецидивы.

Из 56 пациентов у 22 (39,3%) больных было зарегистрировано развитие рецидива/прогрессии ОЛ с медианой наступления 134,5 дня после гапло-ТГСК (Д+17 – Д+555). При анализе факторов, повлиявших на возврат болезни были получены следующие результаты: в группе больных с ОЛЛ 14 (43,6%) человек развили рецидив по сравнению с 8 (33,4%) пациентами с ОМЛ (p=0,4). Пациенты, трансплантированные без предшествующей ХТ развили рецидив в 17 (41,5%) случаях по сравнению с 5 (33,3%) пациентами, получивших ХТ перед началом РК (p=0,2).

У 11 (55%) пациентов, восстановивших лимфоциты до уровня $0,3 \times 10^9/\text{л}$ к Д+30 отмечался возврат болезни, у 9 (34,6%) наблюдались рецидивы ОЛ без

восстановления лимфоцитов до вышеуказанного уровня ($p=0,4$). Не оказал значимого влияния на частоту развития рецидива способ заготовки ГСК: в 13 (39,4%) случаях наблюдали возврат ОЛ у больных, получивших Г-КСФ праймированным неманипулированный КМ, у 9 (39,1%) пациентов при использовании комбинированного трансплантата ($p=0,2$).

Пациенты, получившие в посттрансплантационном периоде один из видов терапии имели рецидивы в 6 (28,6%) случаях по сравнению с 16 (45,7%) пациентами, не имевшими терапии ($p=0,1$).

Не было отмечено влияния донора на развитие посттрансплантационных рецидивов ($p=0,5$). Так, при использовании ГСК от матери у 15 (36,6%) больных зарегистрирован рецидив ОЛ и у 7 (46,7%) реципиентов, трансплантированных от отца/брата. В возрастной группе младше 9 лет и старше 9 лет частота рецидивов была одинаковой: 11 пациентов (37,9%) и 11 (37,9%) соответственно ($p=0,5$).

В нашем исследовании применение ЦФ в качестве профилактики оРТПХ в раннем периоде достоверно не увеличило частоту рецидивов по сравнению с группой АТГАМ/Кэмпас: 5 (27,8%) человек и 17 (44,4%) соответственно ($p=0,2$).

Наличие клинических проявлений оРТПХ достоверно не повлияло на количество рецидивов: в группе больных, развивших оРТПХ у 17 (51,5%) реципиентов отмечался возврат болезни по сравнению с 5 (38,5%) без признаков оРТПХ ($p=0,3$). Влияние на уровне тенденции ($p=0,06$) отмечено при наличии у больных хронической РТПХ. Однако в нашем исследовании, определено отрицательное влияние хронической РТПХ. Так, пациенты с признаками хронической РТПХ в 8 (72,7%) случаях из 11 развили рецидив по сравнению с 14 (40%) из 35 не имевших проявления хронической РТПХ. Вероятнее всего, это связано с необходимостью усиления базовой иммуносупрессивной терапии в связи с развитием у 10 из 11 пациентов распространенной формы хронической РТПХ, что повлекло за собой ослабление иммунологической реакции, в том числе реакции «трансплантат против лейкоза». Частота развития рецидивов

после гапло-ТГСК и анализируемые факторы представлены в таблице 14.

Таблица 14. Факторы и частота развития посттрансплантационных рецидивов после гапло-ТГСК у детей и подростков с резистентными формами ОЛ.

Общее число посттрансплантационных рецидивов 22 (39,3%)			
Фактор	Кол-во больных (n)	% значение	Значение p
ОЛЛ	14	43,6	0,4
ОМЛ	8	33,4	
Циторедуктивная ХТ+	5	33,3	0,2
Циторедуктивная ХТ-	17	41,5	
Восстановление лимфоцитов до уровня $0,3 \times 10^9/\text{л}$	11	52,4	0,4
Не восстановление лимфоцитов до уровня $0,3 \times 10^9/\text{л}$	9	34,6	
Посттрансплантационная терапия+	6	28,6	0,1
Посттрансплантационная терапия-	16	45,7	
Комбинция Г-КСФ праймированного КМ и ПСКК (позитивная селекция CD34^+ CliniMACS)	9	39,1	0,2
Г-КСФ праймированный неманипулированный КМ	13	39,4	

Продолжение. Таблица 14. Факторы и частота развития посттрансплантационных рецидивов после гапло-ТГСК у детей и подростков с резистентными формами ОЛ.

Фактор	Кол-во больных (n)	% значение	Значение p
Гаплоидентичный донор:			
Мать	15	36,6	0,5
Отец	7	46,7	
Возраст:			
Младше 9 лет	11	37,9	0,5
Старше 9 лет	11	37,9	
Применение в профилактике оРТПХ:			
АТГАМа/Кэмпаса	17	44,7	0,2
ЦФ	5	27,8	
Клинические проявления оРТПХ+	17	51,5	0,3
Клинические проявления оРТПХ-	5	38,5	
Клинические проявления хрРТПХ+	8	72,7	0,06
Клинические проявления хрРТПХ-	14	40	

Основная причина смерти – рецидивы 20 (35,7%) человек. До 100-го дня – 6 (15,8%) пациентов, после 100-го дня – 14 (36,8%) реципиентов. Частота развития рецидивов с учетом конкурирующих рисков (трансплантационная летальность) представлены на рисунке (рис. 38).

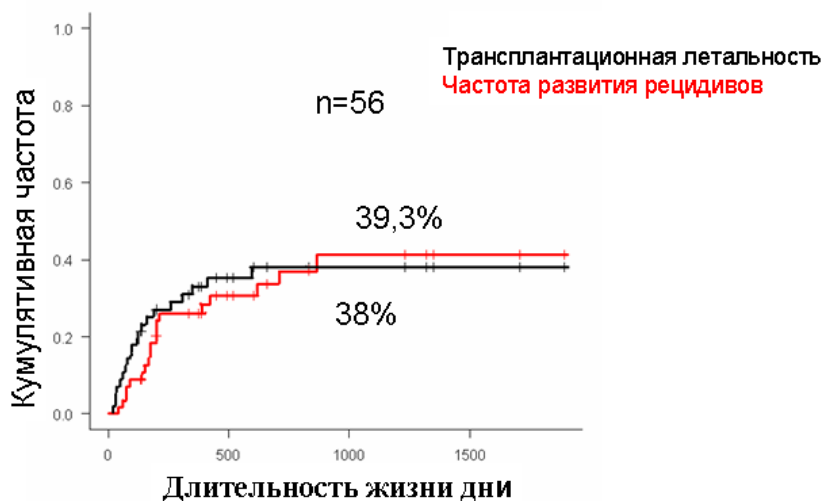


Рисунок 38. Кумулятивная частота развития рецидивов и трансплантационная летальность у детей и подростков с резистентным течением ОЛ после гаплогенотипирования (log-rang 0,07).

Отрицательное влияние на вероятность развития рецидива на уровне тенденции ($p=0,06$) отмечено при наличии у больных распространённой формой хронической РТПХ: пациенты с признаками хронической РТПХ в 8 (72,7%) случаях из 11 развили рецидив по сравнению с 14 (40%) из 35 не имевших проявлений хронической РТПХ. Характер других осложнений, в том числе инфекционных, частота рецидива не имел различий при сравнении различных параметров, связанных с реципиентом, донором, особенностями выполнения гаплогенотипирования.

ГЛАВА 6 ОБСУЖДЕНИЕ

При проведении алло-генотипирования, в том числе от гаплогенотипического донора, наивысшая эффективность показана у пациентов, находившихся в ремиссии заболевания. Однако далеко не всегда это представляется возможным, при этом количество детей и подростков, имеющих прогрессию заболевания или рецидив, не имеющих шансов на изменение течения заболевания на фоне стандартной химиотерапии достаточно велико. Преодоление лекарственной резистентности у

этих больных невозможно путем интенсификации доз цитостатических препаратов, сопровождающееся увеличением токсичности, без иммуноадаптивного воздействия, наблюдаемого при введении ГСК аллогенного донора. Несомненные преимущества трансплантации от гаплоидентичного донора не вызывают сомнения – скорость получения гапло-ГСК, возможность дополнительной заготовки трансплантата в нужное время и отсутствие выраженных экономических затрат.

С 90-х годов 20-го столетия гапло-ТГСК была сопряжена с высоким риском неприживления гаплоидентичного «ex vivo» Т-деплементированного трансплантата и тяжелой оРТПХ при использовании нативного трансплантата из-за большого количества Т-клеток, распознающих I и II класс антигенов большой системы гистосовместимости человека (Reisner Y, Hagin D, Martelli MF 2011). В нашем исследовании частота первичного неприживления гаплоидентичного трансплантата составила 17,9% и была обусловлена резистентным течением болезни на момент гапло-ТГСК, что сравнимо с описанными ныне результатами американских и китайских исследователей (Martelli M.F, Ianni M.Di, Ruggeri L., et al. 2014). Несмотря на резистентное течение, 82,1% пациентов достигли приживления гапло-трансплантата с достижением ремиссии. Начиная с 2000 года, публикуются работы по применению комбинированного гапло-трансплантата, способного вызвать приживление и ремиссию ОЛ у больных, отнесенных к «salvage» группе (Aversa F., Martelli M., et al. 2005, Aversa F., Reisner Y. et al. 2008, Bethge W.A., Faul C., et al. 2008, Burroughs L.M., O'Donnell P.V., et al. 2008, Di Bartolomeo P., Santarone S. et al. 2010, Chang Y. J., Zhao X. Y., et al. 2013, Martelli MF, Di Ianni M, Ruggeri L, et al. 2014, Chang Y. J., Huang X. J. 2014, Fuji S. 2015, Gao L., Zhang C., et al. 2015).

Учитывая полученные данные при однофакторном анализе на 3-х летнюю ОВ при ОМЛ статистически достоверно повлияли следующие факторы: возраст на момент гапло-ТГСК ($p=0,001$), способ заготовки гапло-трансплантата ($p=0,05$), факт применения одного из вариантов терапии в посттрансплантационном периоде (ХТ, ХТ+ИДЛ или ИДЛ) ($p=0,03$), отмечалось различие на уровне

тенденции у пациентов, циторедуктивная ХТ которым была проведена и больными без ХТ перед гапло-ТГСК ($p=0,09$). Для детей и подростков с ОЛЛ достоверно значимыми были следующие факторы: применение циторедуктивной ХТ перед началом РК ($p=0,01$), применение в посттрансплантационном периоде одного из вариантов терапии (ХТ, ХТ+ИДЛ или ИДЛ) ($p=0,00$) и восстановление уровня лимфоцитов к 30-му дню после трансплантации до $0,3 \times 10^9/\text{л}$ ($p=0,01$). Наши результаты не противоречат литературным данным, опубликованным ранее (Chang YJ, Zhao XY, Xu LP, et al 2013; Chang Y-J, Zhao X-Y, Huang X-J.2014).

По результатам нашего исследования 3-х летняя ОВ после гапло-ТГСК при резистентном течении ОМЛ у детей и подростков с медианой наблюдения в два года – 37,5%, при ОЛЛ с медианой наблюдения в три года – 31,3%. По данным литературы 15-летнее наблюдение за пациентами, получившими гапло-ТГСК, показывают БРВ на уровне 43% при ОМЛ и 30% при ОЛЛ. Пациенты, получившие гапло-ТГСК в клинике НИИ ДОГиТ им. Р.М.Горбачевой ПСПб им. акад. И.П.Павлова при ОМЛ с медианой наблюдения 2 года имели БРВ 40,9%, при ОЛЛ с медианой наблюдения в 3 года 33,3%. Эти результаты соответствуют международным.

Реципиенты, трансплантировавшиеся после циторедуктивной ХТ имели достоверно более высокую 3-х летнюю ОВ по сравнению с больными, получившими гапло-ТГСК: ОМЛ – 57,1% и ОЛЛ – 62,5% против 29,4% и 20,8% соответственно ($p=0,09$ и $p=0,01$). Эти результаты сравнимы с результатами европейских исследователей, где общая выживаемость больных, трансплантированных в ремиссии заболевания составила 50%, а у реципиентов с рецидивом острого лейкоза не превышала 10% (Aversa F. Et al. 2005).

Лучшие результаты гапло-ТГСК у детей неоднократно публиковались европейскими, американскими и китайскими исследователями (Liu H-D, Xu L-P, Liu K-Y, Wang Y, Zhang X-H et al. 2013; Adriana S, Valeria CG, Roseane G, et al. 2013; Sawada A., Shimizu M., Isaka K., et al. 2014). В ходе нашего анализа пациенты младше 9 лет имели достоверно более высокую 3-х летнюю ОВ по сравнению со старшей возрастной группой. Ведущей причиной неудач в старшей

возрастной группе была трансплантационная летальность – 12 человек (52,2%).

Основной проблемой при выполнении гапло-ТГСК является создание состояния высокой степени иммунологической толерантности, что позволяет преодолеть барьер гистосовместимости. Возможные пути преодоления - иммуноаблативный режим кондиционирования, выполнение Т-клеточной деплеции трансплантата, индукция иммунной толерантности введением Г-КСФ донору до заготовки ГСК и циклофосфана реципиенту в Д+3, +4 после гапло-ТГСК.

Выбор способа заготовки гапло-трансплантата остается ключевым моментом в создании вышеуказанного состояния, ввиду зависимости результатов и осложнений от клеточного состава трансплантата. Учитывая это с 2009 года в клинике НИИ ДОГиТ им.Р.М.Горбачевой мы выполнили сравнение 2-х источников трансплантата – Г-КСФ праймированного неманипулированного КМ и КСФ-праймированного неманипулированного КМ в комбинации с CD 34 + -клетками ПСКК после Т-клеточной деплеции. По результатам проведенного анализа, 3-х летняя ОВ достоверно отличается у больных, получивших комбинированный трансплантат (Г-КСФ праймированный неманипулированный КМ + стимулированные ПСКК с CD34+ селекция – CliniMacs) по сравнению с трансплантатом из неманипулированного стимулированного Г-КСФ КМ – 58,3% против 16,7% ($p=0,05$) в группе пациентов с ОМЛ. При ОЛЛ этого различия не наблюдали – 38,1% и 18,2% ($p>0,05$), что, вероятно, было связано с малочисленностью данной группы. Этот эффект может быть обусловлен более быстрым иммунным восстановлением при использовании нативного гапло-трансплантата по сравнению с трансплантатом, полученным после Т-клеточной деплецией «ex vivo».

В нашем исследовании частота развития III-IV степени оРТПХ не превышала 27%, что соответствует литературным данным (Martelli M.F, Ianni M.Di, Ruggeri L., et al. 2014; Chang YJ , Zhao XY , Xu LP , et al. 2013; Chang Y-J, Zhao X-Y, Huang X-J, 2014; Ciurea SO, Mulanovich V, Saliba RM, et al. 2012) и может быть связано с применением в раннем периоде после гапло-ТГСК с целью

индукции толерантности циклофосфаном на Д+3 и Д+4 (Luznik L, O'Donnell PV, Symons HJ et al. 2008; Adriana S, Valeria CG, Roseane G, et al. 2013; Raiola AM, Dominiotto A, Ghiso A, et al. 2013), введением Г-КСФ гапло-донорам перед миелоэкспузией, что приводит к модификации иммунного ответа - уменьшению реактивности Т-клеток на фоне изменения баланса между Th1 и Th2 (Martelli M.F, Ianni M.Di, Ruggeri L., et al. 2014; Liu D.-H., Zhao X.-S., Chang Y.-J., Liu Y.-K. et al. 2011). Фармакологическая профилактика оРТПХ дополнена использованием новых препаратов (ингибитор m-TOR – рапамицин). Кроме того, у пациентов с ОЛЛ в нашем исследовании доказано влияние факта восстановления лимфоцитов до уровня $0,3 \times 10^9/\text{л}$ к 30-му дню после гапло-ТГСК ($p=0,00$) на 3-х летнюю ОВ, что может уменьшать частоту инфекционных осложнений (Chang YJ , Zhao XY , Xu LP , et al. 2013; Chang Y-J, Zhao X-Y, Huang X-J, 2014).

Статистически значимо лучшие показатели 3-х летней ОВ были в группе больных, получивших один из вариантов терапии в посттрансплантационном периоде как при ОМЛ, так и при ОЛЛ: 66,7% и 75% против 20% и 5% соответственно ($p=0,03$ и $p=0,00$). В одном из последних ретроспективных исследований китайских ученых более высокая общая выживаемость после гапло-ТГСК была связана с профилактическим введением донорских лимфоцитов ($p=0,002$) (Wang Y. et al. 2012).

Частота развития оРТПХ в нашем исследовании не превышала 71,7%, тяжелые степени (III-IV) составили 27,3%. При этом, с одинаковой частотой наблюдали клинические проявления в группе больных, получивших Г-КСФ праймированный неманипулированный трансплантат и комбинированный трансплантат 51,5% и 48,5% соответственно. В работах китайских исследователей этот показатель достигает 80% (Lu D.P., 2006, Liu D.-H., 2011, Luo Y., 2014, Li G., 2015, Luo R., 2015).

Дискутабельным остается вопрос выбора гапло-донора, какова необходимость анализа KIR-системы, что возможно, имеет более существенное значение при использовании манипулированного гапло-трансплантата. Китайские исследователи из Пекинского института гематологии провели ретроспективный

анализ 1256 гапло-ТГСК, выполненных с мая 2002 по февраль 2013 года. Исследование посвящено выбору лучшего гапло-донора, по результатам которого предпочтение было отдано более молодым донорам мужского пола (отцам), что достоверно улучшало ОВ и снижало смертность не связанную с рецидивом. Использование сиблинов с ненаследуемыми материнскими антигенами помогает снизить частоту развития выраженной оРТПХ (Wang Y, Chang Y-J, Xu L-P, Liu K-Y, Liu D-H, Zhang X-H, Chen H et al. 2014). В нашем исследовании не было получено достоверного влияния типа донора (мать или отец/брат). Однако, отмечено более частое развитие оРТПХ: в 81,8% случаев при гапло-ТГСК от матери, где 57,6% реципиентов развили оРТПХ II-IV степени по сравнению с 18,2% наблюдений оРТПХ после гапло-ТГСК от отца/брата ($p=0,05$). Развитие клинически значимой степени оРТПХ всегда требует усиления проводимой базовой ИСТ, что может увеличивать частоту инфекционных осложнений и посттрансплантационных рецидивов вследствие возможного влияния этих препаратов на степень выраженности иммунологической реакции РТПЛ.

Основной проблемой в группе пациентов, трансплантированных вне ремиссии заболевания, остаются рецидивы. По европейским данным частота рецидивов у такой группы больных достигает 50% (Martelli MF, Di Ianni M, Ruggeri L, et al. 2014). В нашем исследовании этот показатель равен 39,3%. Несмотря на имеющиеся данные о снижении вероятности развития рецидива ОЛ у пациентов, имеющих признаки хронической РТПХ, в нашем исследовании отмечается отрицательное влияние на уровне тенденции ($p=0,06$) наличия хронической РТПХ, что, вероятно, может быть связанное с ослаблением РТПЛ на фоне терапии этого осложнения путем усиления базовой ИСТ. Ввиду высокой клинической важности, данный факт требует дальнейшего изучения.

Инфекционные осложнения развились у 60,7% реципиентов после гапло-ТГСК. Спектр инфекционных осложнений не имел особенностей по сравнению с алло-ТГСК от совместимого родственного или неродственного доноров. Полученные результаты свидетельствуют в пользу отсутствия особенностей реконституции иммунитета в нашем исследовании в зависимости от вариантов

режима кондиционирования и способов заготовки гапло-трансплантата, влияние этих факторов отмечено во многих исследованиях (Martelli MF, Di Ianni M, Ruggeri L, et al. 2014; Chang YJ, Zhao XY, Xu LP, et al. 2013; Chang Y-J, Zhao X-Y, Huang X-J. 2014; Shimoni A. 2013; Ciurea SO, Mulanovich V, Saliba RM, et al. 2012). Восстановление иммунитета при гапло-ТГСК, несомненно, имеет особенности, связанные с формированием иммунной системы соответственно возрасту, зависит от скорости восстановления Т-лимфоцитов донора в тимусе реципиента. Этот показатель важен не только в развитии инфекционных осложнений, но также вероятности развития рецидива ОЛ и может быть оценен на основании количественного анализа Т-рецепторных эксцизионных колец (TREC) в лимфоцитах периферической крови (Clave E., 2013).

При многофакторном анализе не оказали влияния на 3-х летнюю ОВ у прогностически неблагоприятных вариантах острых лейкозов у детей следующие факторы, имевшие статистическую значимость при однофакторном анализе – наличие циторедуктивной ХТ до гапло-ТКМ ($p=0,02$), режим кондиционирования ($p=0,06$), способ заготовки ГСК ($p=0,03$), используемый донор ($p=0,37$), совместимость по полу пар донор-реципиент ($p=0,44$), клеточность трансплантата по CD34+/кг и CD3+/кг ($p=0,13$ и $p=0,38$), способ профилактики ОРТПХ ($p=0,44$).

При этом, на основании проведенного многофакторного анализа создана прогностическая модель с включением четырех факторов, значимо повлиявших на 3-х летнюю ОВ пациентов: восстановление лимфоцитов до уровня $0,3 \times 10^9/\text{л}$ к 30-му дню после гапло-ТГСК ($p=0,07$), факт приживления трансплантата ($p=0,01$), возраст пациента на момент гапло-ТГСК ($p=0,00$) и факт применения одного из вариантов терапии в периоде после гапло-ТГСК ($p=0,00$). Учитывая полученные нами результаты, складывается впечатление о необходимости при проведении гапло-ТГСК у пациентов с прогностически неблагоприятными вариантами ОЛ у детей включения рекомендаций применения одного из методов терапии (ХТ, ИДЛ или ХТ+ИДЛ) после Д+100 гапло-ТГСК.

Таким образом, данные нашего исследования свидетельствуют о высокой

эффективности алло-ТГСК от гаплоидентичного донора у детей с прогностически неблагоприятными вариантами острых лейкозов.

ВЫВОДЫ

1 Аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток от гаплоидентичного донора, выполненная в рецидиве острого лейкоза и первичной химиорезистентности, позволяет достигнуть 3-х летней общей выживаемости у 33% детей, при этом в равной степени эффективна у больных с острым лимфобластным и миелобластным лейкозом – 37,5% и 31,3% соответственно.

2 Общую 3-х летнюю выживаемость пациентов с ОЛЛ повышает проведение циторедуктивной химиотерапии до алло-ТГСК от гаплоидентичного донора – 62,5% и 28,8%, а также применение одного из вариантов терапии после трансплантации – 75% и 5% при ОЛЛ (ХТ±ИДЛ), 66,7% и 20% при ОМЛ (ИДЛ±гипометилирующий препарат) соответственно с/без терапии.

3 Совокупность факторов, включающих возраст до 9 лет ($p=0,01$), приживление трансплантата ($p=0,01$), восстановление лимфоцитов до уровня $0,3 \times 10^9/\text{л}$ к Д+30 ($p=0,01$) и применение терапии после трансплантации ($p=0,03$), являются определяющими в оценке долгосрочного прогноза на ранних этапах после алло-ТГСК от гаплоидентичного донора у детей с рецидивом острого лейкоза.

4 Основным осложнением алло-ТГСК от гаплоидентичного донора является оРТПХ, которая составила 71,7%. Частота оРТПХ зависит от пола донора (4,5 раза увеличивается при выборе матери в качестве донора ($p=0,05$)). Применение циклофосфана в Д+3, Д+4 после трансплантации достоверно снижает ($p=0,00$) риск оРТПХ.

5 Общая выживаемость пациентов после алло-ТГСК сопоставима при использовании Г-КСФ праймированного костного мозга от гаплоидентичного донора и комбинированного трансплантата – Г-КСФ праймированный костный мозг + CD34+ клетки, полученные в результате позитивной селекции периферических стволовых клеток крови

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Применение гапло-ТГСК неманипуллированного праймированного костного мозга является эффективным методом лечения детей и подростков с резистентным течением и рецидивом ОЛ, позволяющим добиться приживления трансплантата и ремиссии, у больных, где программная ХТ исчерпала свои возможности. Введение циклофосфана в качестве профилактики оРТПХ позволяет в значительной степени снизить частоту развития оРТПХ, не увеличивает число инфекционных осложнений, тем самым уменьшая длительность пребывания в стационаре. Одним из основных факторов, влияющих на ОВ после гапло-ТГСК, является применение посттрансплантационной терапии, которую с целью сохранения ремиссии заболевания следует начинать с 100 дня после гапло-ТСК. С целью подготовки к гапло-ТГСК стоит рассматривать применение новых препаратов в режимах ХТ в качестве «бридж-терапии»: блинатумомаба (би-специфическое моноклональное АТ Т-клеток CD19/CD3), клофарабина, гемтузумаба.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- Алло-ТГСК** – аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток
- АЛГ** – антилимфоцитарный глобулин
- АТГ** – антитимоцитарный глобулин
- БРВ** – безрецидивная выживаемость
- Гапло-ТГСК** – гаплоидентичная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток
- ГСК** – гемопоэтические стволовые клетки
- Г-КСФ** – гранулоцитарный колониестимулирующий фактор
- ИДЛ** – инфузия донорских лимфоцитов
- КМ** – костный мозг
- МАК** – миелоаблативный режим кондиционирования
- ОВ** – общая выживаемость
- ОЛ** – острый лейкоз
- ОМЛ** – острый миелобластный лейкоз
- ОЛЛ** – острый лимфобластный лейкоз
- oРТПХ** – острая реакция «трансплантат против хозяина»
- ПСКК** – периферические стволовые клетки крови
- РИК** – режим кондиционирования сниженной интенсивности
- РТПХ** – реакция «трансплантат против хозяина»
- РК** – режим кондиционирования
- Сиро** – сиролimus
- Такро** – такролимус
- ХТ** – химиотерапия
- ЦСА** – циклоспорин А
- ЦФ** – циклофосфан
- ЦМВ** – цитомегаловирус
- HLA-система** – большой комплекс гистосовместимости
- m-TOR** – ингибитор «мишени рапамицына млекопитающих»
- НК** – клетки натуральные киллеры

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Афанасьев, Б.В. Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток крови. / Б.В. Афанасьев, Л.С. Зубаровская // Детская онкология. Руководство. – 2002. - С-Петербург. – стр. 90-108.
2. Афанасьев, Б.В. Аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток у детей: настоящее, проблемы, перспективы. / Б.В. Афанасьев, Л.С. Зубаровская, И.С. Моисеев // Российский журнал детской гематологии и онкологии. 2015. № 2. С. 28-42.
3. 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. 70-85.
4. Бондаренко, С.Н. Эффективность аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток с миелоаблативным режимом и режимом кондиционирования со сниженной интенсивностью у детей и подростков с острым миелобластным лейкозом. / С.Н. Бондаренко, С.В. Разумова, Н.В. Станчева, Е.В. Семёнова, О.А. Слесарчук, А.Л. Алянский, Ю.Г. Федюкова, О.В. Паина, А.С. Боровкова, П.В. Кожокарь, Б.И. Смирнов, Л.С. Зубаровская, Б.В. Афанасьев // Онкопедиатрия. 2015. Т. 2. № 4. С. 396-403.
5. Боровкова, А.С. Результаты аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток с режимом кондиционирования сниженной интенсивности доз у пациентов с синдромом Гурлер. / А.С. Боровкова, Н.В. Станчева, С.В. Разумова, О.В. Паина, П.В. Кожокарь, А.А. Рац, А.В. Козлов, Ю.Г. Федюкова, Е.В. Семенова, Л.С. Зубаровская, Б.В. Афанасьев // Российский журнал детской гематологии и онкологии. 2015. Т. 2. № 3. С. 51-57.
6. Боровкова, А.С. Результаты неродственной трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток с режимом кондиционирования сниженной интенсивности доз у детей с болезнями накопления. / А.С. Боровкова, Н.В. Станчева, А.А. Рац, Т.А. Быкова, С.В. Разумова, П.В. Кожокарь, О.В. Паина, Е.В. Семенова, Ю.Г. Федюкова, Л.С. Зубаровская, Б.В. Афанасьев // Гематология и трансфузиология. 2014. Т. 59. № S1. С. 34.

7. Балашов, Д.Н. Факторы риска цитомегаловирусной инфекции у пациентов после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток. / Д.Н. Балашов, П.Е. Трахтман, Е.В. Скоробогатова, Ю.В. Скворцова, И.П. Шипицына, А.А. Масчан // Онкогематология. 2010. № 4. С. 20-26.
8. Волкова, А.Г. Роль бронхоскопии в диагностике инвазивного аспергиллеза легких у детей после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток. / А.Г. Волкова, М.О. Попова, К.А. Екушов, И.Р. Зиннатуллин, И.Ю. Николаев, Т.С. Богомолова, С.М. Игнатъева, Б.И. Смирнов, Л.С. Зубаровская, Н.Н. Клишко, Б.В. Афанасьев // Российский журнал детской гематологии и онкологии. 2015. № 2. С. 72-76.
9. Голощапов, О.В. Фекальный кальпротектин - новый количественный биомаркер острой и хронической реакции "трансплантат против хозяина" с вовлечением кишечника после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток. / О.В. Голощапов, В.Н. Вавилов, Л.С. Зубаровская, И.В. Казанцев, Ю.Г. Васильева, Р.В. Клементьева, А.Л. Алянский, В.В. Байков, О.В. Паина, Е.В. Семенова, Б.В. Афанасьев // Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика. 2011. Т. 4. № 1. С. 31-37.
10. Гиндина, Т.Л. Сложные хромосомные нарушения у больных с посттрансплантационными рецидивами острых лейкозов: клинические и теоретические аспекты. / Т.Л. Гиндина, Н.Н. Мамаев, С.Н. Бондаренко, Е.В. Семенова, Е.Н. Николаева, М.Е. Власова, Н.В. Станчева, О.А. Слесарчук, В.Н. Вавилов, Е.В. Морозова, А.Л. Алянский, Б.В. Афанасьев // Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика. 2015. Т. 8. № 1. С. 69-77.
11. Долгополов, И.С. Случай из практики. Гаплоидентичная трансплантация на фоне режима кондиционирования со сниженной интенсивностью для лечения резистентного диссеминированного рецидива саркомы Юинга. / И.С. Долгополов, Р.С. Равшанова, Р.М. Проценко, В.К. Бояршинов, Л.Ю. Андреева,

Г.Л. Менткевич // Детская онкология. 2003. № 3. С. 41-43.

12. Климко, Н.Н. Первый в России опыт эффективного применения позаконазола для лечения рефрактерного тнвазивного аспергиллеза и профилактики его рецидива при проведении цитостатической терапии и трансплантации костного мозга у ребенка с острым лейкозом. / Н.Н. Климко, Б.В. Афанасьев, А.С. Колбин, Э.Г. Бойченко, Н.И. Зубаровская // Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика. 2008. Т. 1. № 4. С. 347-355.

13. Лисуков, И.А. Использование ромиплостима в терапии тромбоцитопений после аллогенной трансплантации костного мозга. / И.А. Лисуков, О.С. Успенская, А.Д. Кулагин, С.Н. Бондаренко, Т.А. Рудакова, О.А. Слесарчук, Б.В. Афанасьев // Онкогематология. 2012. № 1. С. 29-35.

14. Мамаев, Н.Н. Молекулярный мониторинг течения острых миелоидных лейкозов по уровню экспрессии гена WT1 после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток. / Н.Н. Мамаев, А.В. Горбунова, И.М. Бархатов, Я.В. Гудожникова, Т.Л. Гиндина, В.А. Катерина, Е.В. Волчков, А.Л. Алянский, Е.В. Бабенко, О.А. Слесарчук, Н.В. Станчева, С.Н. Бондаренко, Б.В. Афанасьев // Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика. 2015. Т. 8. № 3. С. 309-320.

15. Мамаев, Н.Н. Острые миелоидные лейкозы с транслокацией t(7;21)(P22;Q22), делецией 5Q, экспрессией CD56 и гемофагоцитарным синдромом: собственное клиническое наблюдение и обзор литературы. / Н.Н. Мамаев, Т.Л. Гиндина, Э.Г. Бойченко, А.В. Горбунова, В.М. Кравцова, Н.В. Станчева, П.В. Кожокар, О.В. Паина, Л.С. Зубаровская, Б.В. Афанасьев // Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика. 2014. Т. 7. № 2. С. 201-205.

16. Масчан, М.А. Деплеция альфа/бета-Т-лимфоцитов – надежная платформа для развития трансплантации гемопоэтических стволовых клеток от

- гаплоидентичных доноров. / М.А. Масчан // Российский журнал детской гематологии и онкологии. 2015. Т. 2. № 3. С. 34-38.
17. Мамаев, Н.Н. Аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток при остром лимфобластном лейкозе с транслокацией t(12;21)(p13;q22). / Н.Н. Мамаев, Е.В. Семенова, Н.В. Станчева, В.А. Катерина, И.М. Бархатов, А.В. Евдокимов, Э.Г. Бойченко, Т.Л. Гиндина, В.М. Кравцова, Л.С. Зубаровская, Б.В. Афанасьев // Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика. 2014. Т. 7. № 3. С. 327-334.
18. Мамаев, Н.Н. Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток при остром миелоидном лейкозе с транслокацией t(8;21)(q22;q22). / Н.Н. Мамаев, А.В. Горбунова, Т.Л. Гиндина, И.М. Бархатов, С.Н. Бондаренко, М.Ю. Аверьянова, О.В. Пирогова, О.В. Голощапов, Е.В. Кондакова, Б.В. Афанасьев // Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика. 2013. Т. 6. № 4. С. 439-444.
19. Рац, А.А. Влияние источника гемопоэтических стволовых клеток на результаты трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток у детей и подростков с миелодиспластическим синдромом. / А.А. Рац, Н.В. Станчева, Е.В. Семенова, Е.В. Морозова, Т.А. Быкова, К.А. Екушов, Ю.Г. Федюкова, П.В. Кожокар, М.М. Смиреникова, Л.С. Зубаровская, Б.В. Афанасьев // Гематология и трансфузиология. 2014. Т. 59. № S1. С. 59.
20. Румянцев, А.Г. Детская гематология. / А.Г. Румянцев, А.А. Масчан, Е.В. Жуковская, В.Л. Айзенберг, Д.Н. Балашов, Д.Ш. Биккулова, В.В. Вдовин, Н.Н. Володин, В.Г. Демихов, Е.В. Демихова, М.А. Евдокимова, П.А. Жарков, О.Н. Журина, Н.И. Зозуля, Н.В. Инякова, А.И. Карачунский, Н.В. Клипинина, К.Г. Копылов, Ж.А. Кузминова, Э.В. Кумирова и др. // Сборник клинических рекомендаций. Москва, 2015.
21. Савченко, В.Г. Трансплантация костного мозга в онкогематологии. / В.Г. Савченко // Фундаментальные исследования и клиническая практика. 2010. Т.

3. №4. С. 410-411.

22. Субботина, Н.Н. Гаплоидентичная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток у детей с острыми миелоидными лейкозами: эволюция метода и собственные данные. / Н.Н. Субботина, И.С. Долгополов, А.В. Попа, В.К. Бояршинов, Р.И. Пименов, Г.Л. Менткевич // Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика. 2014. Т. 7. № 2. С. 131-136.

23. Субботина, Н.Н. Некоторые аспекты трансплантации костного мозга у пациентов с крайне неблагоприятным прогнозом острого лимфобластного лейкоза: обзор литературы и собственное наблюдение. / Н.Н. Субботина, А.В. Попа, И.С. Долгополов, В.К. Бояршинов, Р.И. Пименов, В.В. Дайлидите, Г.Л. Менткевич // Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика. 2015. Т. 8. № 3. С. 331-336.

24. Станчева, Н.В. Дислипидемия и метаболический синдром у детей и подростков после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток. / Н.В. Станчева, Е.В. Семенова, А.С. Боровкова, С.В. Разумова, П.В. Кожокар, А.А. Рац, К.А. Екушев, А.В. Козлов, Ю.Г. Федюкова, О.В. Паина, А.Я. Гудкова, Л.С. Зубаровская, Б.В. Афанасьев // Российский журнал детской гематологии и онкологии. 2015. № 2. С. 43-49.

25. Семенова, Е.В. Лечение рефрактерных форм острого лимфобластного лейкоза у детей и подростков: реиндукция ремиссии с последующей аллогенной трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток. / Е.В. Семенова, Н.В. Станчева, С.Н. Бондаренко, В.Н. Вавилов, Д.А. Багге, О.В. Паина, С.В. Разумова, А.С. Боровкова, Т.А. Быкова, А.А. Рац, Л.С. Зубаровская, Б.В. Афанасьев // Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика. 2013. Т. 6. № 1. С. 53-58.

26. 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, А.А. Сипол, О.В. Паина, О.А. Слесарчук, И.М. Бархатов, Л.С. Зубаровская, Б.В. Афанасьев // Онкогематология. 2011. № 4. С. 19-27.

27. Aversa, F. Fourth International Workshop on Haploidentical Transplants, Naples, Italy, 8–10 July, 2004. / F. Aversa, Z.N. Berneman, F. Locatelli, M.F. Martelli, Y. Reisner, A. Tabilio et al. // *Blood Cells Mol Dis* 2004; 33: 159–175.

28. Amrolia, P.J. Allorestricted cytotoxic T cells specific for human CD45 show potent antileukemic activity. / P.J. Amrolia, S.D. Reid, L. Gao, et al. // *Blood*. 2003;101(3):1007-1014.

29. Anurathapan, U. Hematopoietic stem cell transplantation for homozygous β -thalassemia and β -thalassemia/hemoglobin E patients from haploidentical donors. / U. Anurathapan, S. Hongeng, S. Pakakasama // *Bone Marrow Transplant*. 2016 Feb 15. doi: 10.1038/bmt.2016.7

30. Anasetti, C. Effect of HLA incompatibility in marrow transplantation from unrelated and HLA-mismatched related donors. / C. Anasetti, J.A. Hansen // *Transfus Sci* 1994; 15: 221-230.

31. Ash, R.C. Bone marrow transplantation from related donors other than HLA-identical siblings: effect of T cell depletion. / R.C. Ash, M.M. Horowitz, R.P. Gale, D.W. van Bekkum, J.T. Casper, E.C. Gordon-Smith et al. // *Bone Marrow Transplant* 1991; 7: 443–452.

32. Aversa, F. Successful engraftment of T-cell-depleted haploidentical ‘three- loci’ incompatible transplants in leukemia patients by addition of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor- mobilized peripheral blood progenitor cells to bone marrow inoculum. / F. Aversa, A. Tabilio, A. Terenzi, A. Velardi, F. Falzetti, C. Giannoni et al. // *Blood* 1994; 84: 3948–3955.

33. Aversa, F. Full haplotype-mismatched hematopoietic stem-cell transplantation: A Phase II Study in Patients With acute leukemia at High Risk of relapse. / F. Aversa, A. Terenzi, A. Tabilio, F. Falzetti, A. Carotti, S. Ballanti, R. Felicini, F. Falcinelli, A.

- Velardi, L. Ruggeri, T. Aloisi, P. Saab Jean, A. Santucci, K. Perruccio, P.M. Martelli, C. Mecucci, Y. Reisner, M.F. Martelli // *J Clin Oncol.* 2005; 23:3447-3454.
34. Aversa, F. The haploidentical option for high-risk haematological malignancies. / Y. Reisner, M.F. Martelli // *Blood Cells Mol Dis.* 2008;40(1):8-12.
35. Aversa, F. Setting the standard in T cell depleted haploidentical transplantation and beyond. / F. Aversa // *Best Pract Res Clin Haematol.* 2011;24(3):325-329.
36. Amrolia, P.J. Allorestricted cytotoxic T cells specific for human CD45 show potent antileukemic activity. / P.J. Amrolia, S.D. Reid SD, L. Gao, et al. // *Blood.* 2003;101(3):1007-1014.
37. Adriana, S. Haploidentical hematopoietic stem cell transplantation with reduced intensity conditioning, T-cell replete grafts and post-transplant cyclophosphamide in pediatrics. / S. Andriana, C.G. Valeria, G. Roseane, et al. // *Blood* 2013; 122:5510.
38. Ballen, K.K. The great debate: haploidentical or cord blood transplant. / K.K. Ballen, T.R. Spitzer // *Bone Marrow Transplant.* 2011;46(3):323-329.
39. Baron, F. Unrelated cord blood transplantation for adult patients with acute myeloid leukemia: higher incidence of acute graft-versus-host disease and lower survival in male patients transplanted with female unrelated cord blood - a report from Eurocord, the Acute Leukemia Working Party, and the Cord Blood Committee of the Cellular Therapy and Immunobiology Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. / F. Baron, M. Labopin, A. Ruggeri et al // *J Hematol Oncol.* 2015 Oct 6;8(1):107
40. Bozdech, M.J. Transplantation of HLA-haploidentical T-cell-depleted marrow for leukemia: addition of cytosine arabinoside to the pretransplant conditioning prevents rejection. / M. J. Bozdech, H. M. Sondel, M. E. Trigg et al. // *Exp Hematol.* 1985;13(11):1201-1210.
41. Bertaina, A. HLA-haploidentical stem cell transplantation after removal of $\alpha\beta^+$ T and B cells in children with nonmalignant disorders. / A. Bertaina, P. Merli, S. Rutella et al. // *Blood.* 2014 Jul 31;124(5):822-6. doi: 10.1182/blood-2014-03-563817. Epub 2014 May 28.
42. Barrett, A. John. Understanding and harnessing the graft-versus-leukaemia

- effect. / A. John Barrett // *British Journal of Haematology*, 142, 877–888.
43. Beatty, P.G. Marrow transplantation from related donors other than HLA-identical siblings. / P. G. Beatty, R. A. Clift, E. M. Mickelson, B. B. Nisperos, N. Flournoy, P. J. Martin et al. // *N Engl J Med* 1985; 313: 765–771.
44. Buckley, R. H. Hematopoietic stem-cell transplantation for the treatment of severe combined immunodeficiency. / R. H. Buckley, S. E. Schiff, R. I. Schiff, L. Markert, L.W. Williams, J. L. Roberts et al. // *N Engl J Med* 1999; 340: 508–516.
45. Bachar-Lustig, E. Megadose of T cell-depleted bone marrow overcomes MHC barriers in sublethally irradiated mice. / E. Bachar-Lusting, N. Rachamim, H. W. Li, F. Lan, Y. Reisner // *Nat Med* 1995;1: 1268–1273.
46. Bethge, W. A. Haploidentical allogeneic hematopoietic cell transplantation in adults using CD3/CD19 depletion and reduced intensity conditioning: an update. / W. A. Bethge, C. Faul, M. Bornhauser et al. // *Blood Cells Mol Dis*. 2008;40(1):13-19.
47. Bader, P. Rapid immune recovery and low TRM in haploidentical stem cell transplantation in children and adolescence using CD3/CD19 depleted stem cells. / P. Bader, J. Soerensen, A. Jarisch et al. // *Best Pract Res Clin Haematol*. 2011;24(3):331-337.
48. Bonini, C. HSV-TK gene transfer into donor lymphocytes for control of allogeneic graft-versus-leukemia. / C. Bonini, G. Ferrari, S. Verzeletti et al. // *Science*. 1997;276(5319):1719-1724.
49. Brunstein, C. G. Infusion of ex vivo expanded T regulatory cells in adults transplanted with umbilical cord blood: safety profile and detection kinetics. / C. G. Brunstein, J. S. Miller, Q. Cao et al. // *Blood*. 2011;117(3):1061-1070.
50. Brodsky, R.A. Reduced intensity HLA-haploidentical BMT with post transplantation cyclophosphamide in nonmalignant hematologic diseases. / R. A. Brodsky, L. Luznik, J. Bolanos-Meade, M. S. Leffell, R. J. Jones, E. J. Fuchs // *Bone Marrow Transplant*. 2008;42(8):523-527.
51. Billingham, R. E. Actively acquired tolerance of foreign cells. / R. E. Billingham, L. Brent, P. B. Medawar // *Nature*. 1953;172:603-606.
52. Burroughs, L. M. Comparison of outcomes of HLA-matched related, unrelated,

- or HLA-haploidentical related hematopoietic cell transplantation following nonmyeloablative conditioning for relapsed or refractory Hodgkin lymphoma. / L. M. Burroughs, P. V. O'Donnell, B. M. Sandmaier, B. E. Storer, L. Luznik, H. J. Symons et al. // *Biol Blood Marrow Transplant* 2008; 14: 1279–1287.
53. Bruinsma Van der Horst, I.E. Influence of non_inherited maternal HLA – DR antigens on susceptibility to rheumatoid arthritis. / Van der I.E. Horst Bruinsma, J.M.W. Hazes // *Ann. Rheum. Dis.* – 1998. – V. 57. – P. 672-675.
54. Bohana-Kashtan, O. Selective reduction of graft-versus-host disease-mediating human T cells by ex vivo treatment with soluble Fas ligand. / O. Bohana-Kashtan, S. Morisot, R. Hildreth, C. Brayton, H. I. Levitsky, C. I. Civin // *J Immunol.* 2009;183(1):696-705.
55. Chen, X. Rapid immune reconstitution after a reduced-intensity conditioning regimen and a CD3-depleted haploidentical stem cell graft for pediatric refractory haematological malignancies. / X. Chen, G. A. Hale, R. Barfield, E. Benaim, W. H. Leung, J. Knoules et al. // *Br J Haematol* 2006; 135: 524-532.
56. Chen, S. H. Effect of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor on T-lymphocyte function and the mechanism of this effect. / S. H. Chen, X. Li, X. J. Huang // *Int J Hematol.* 2004;79:178-184.
57. Chang, Y. J. Expression profiles of adhesion molecules on naive T cells in bone marrow grafts of healthy donors treated with granulocyte colony-stimulating factor. / Y. J. Chang, X. Y. Zhao, M. R. Huo, X.J. Huang // *Transpl Immunol.* 2009;21:228-233.
58. Ciceri, F. A survey of fully haploidentical hematopoietic stem cell transplantation in adults with high-risk acute leukemia: a risk factor analysis of outcomes for patients in remission at transplantation. / F. Ciceri, M. Labopin, F. Aversa et al. // *Blood.* 2008;112(9):3574-3581.
59. Chaleff, S. A large-scale method for the selective depletion of alphabeta T lymphocytes from PBSC for allogeneic transplantation. / S. Chaleff, M. Otto, R. C. Barfield et al. // *Cytherapy.* 2007;9(8):746-754.
60. Comoli, P. T-cell lines specific for peptides of adenovirus hexon protein and

devoid of alloreactivity against recipient cells can be obtained from HLA-haploidentical donors. / P. Comoli, M. W. Schilham, S. Basso et al. // J Immunother. 2008;31(6):529-536.

61. Comoli, P. T cell therapy of Epstein-Barr virus and adenovirus infections after hemopoietic stem cell transplant. / P. Comoli, S. Basso, M. Labirio, F. Baldanti, R. Maccario, F. Locatelli // Blood Cells Mol Dis. 2008; 40(1):68-70.

62. Chang, Y. J. Early lymphocyte recovery predicts superior overall survival after unmanipulated haploidentical blood and marrow transplant for myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia evolving from myelodysplastic syndrome. / Y. J. Chang, X. Y. Zhao, L. P. Xu et al. // Leuk Lymphoma 2013; 54 : XXX – XXX .

63. Chang, Y. J. Immune Reconstitution Haploidentical Hematopoietic Stem Cell Transplantation. / Y. J. Chang, X. Y. Zhao, X. J. Huang // Biol Blood Marrow Transplant. 2014; 20: 440-449.

64. Cornelissen, J. J. Hematopoietic stem cell transplantation for patients with AML in first complete remission. / J. J. Cornelissen, D. Blaise // Blood. 2016 Jan 7;127(1):62-70. doi: 10.1182/blood-2015-07-604546. Epub 2015 Dec 10.

65. Chen, J. Combination of a haploidentical SCT with an unrelated cord blood unit: a single-arm prospective study. / J. Chen, R. X. Wang, F. Chen et al. // Bone Marrow Transplant. 2014 Feb;49(2):206-11.

66. Chang, Y.J. Haploidentical stem cell transplantation for the treatment of leukemia: current status. / Y. J. Chang, Y. Wang, X. J. Huang // Expert Rev Hematol. 2014 Oct;7(5):635-47.

67. Chang Y. J. Haploidentical SCT: the mechanisms underlying the crossing of HLA barriers. / Y. J. Chang, X. J. Huang // Bone Marrow Transpl. 2014; Jul;49(7):873-879.

68. Clave, E. Thymic function recovery after unrelated donor cord blood or T-cell depleted HLA-haploidentical stem cell transplantation correlates with leukemia relapse. / E. Clave, D. Lisini, C. Douay // Front Immunol. 2013 Mar 4;4:54.

69. Castagna, L. Tacrolimus compared with cyclosporine A after haploidentical T-cell replte transplantation with post-infusion cyclophosphamide. / L. Castagna, S. Bramandi, S.

Furst et al. // *Bone Marrow Transplant*. 2015; 1-4, doi:10.1038/bmt.2015.289.

70. Curran, K. J. Enhancing Antitumor Efficacy of Chimeric Antigen Receptor T Cells through Constitutive CD40L Expression. / K. J. Curran, B. A. Seinstra, R. J. Brentjens et al. // *Molecular Therapy* (2015); 23 4, 769–778.

71. Drobyski, W. R. Superior survival associated with transplantation of matched unrelated versus one-antigen mismatched unrelated or highly human leukocyte antigen-disparate haploidentical family donor marrow grafts for the treatment of hematologic malignancies: establishing a treatment algorithm for recipients of alternative donor grafts. / W. R. Drobyski, J. Klein, N. Flomenberg, D. Pietryga, D. H. Vesole, D. A. Margolis et al. // *Blood* 2002; 99: 806–814.

72. Davies, J. K. Effective control of mismatched alloreactivity via ex vivo alloantigen-specific co-stimulatory blockade does not significantly impact pathogen-specific immunity. / J. K. Davies, G. Gorgun, L. M. Nadler, E. C. Guinan // *ASH Annual Meeting Abstracts* 2006; 108: 3177.

73. Davies, J. Donor-derived T cells can be rendered hyporesponsive to alloantigen without loss of pathogen or tumor immune responses. / J. Davies, D. Yuk, L. Nadler, E. Guinan // *ASH Annual Meeting Abstracts* 2007; 110: 771.

74. Davies, J. In vivo expansion of CD4+foxp3+ regulatory T cells may contribute to control of acute GVHD after HLA-mismatched alloantigenized HSCT. / J. Davies, D. Yuk, L. Brennan, L. Nadler, E. Guinan // *Biol Blood Marrow Transplant* 2008; 14: 18.

75. Di Bartolomeo, P. Unmanipulated bone marrow transplantation from haploidentical related donor for patients with high-risk hematological malignancies [abstract]. / P. Di Bartolomeo, S. Santarone, G. De Angelis et al. // *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)*. 2010:2350.

76. Davies, J. K. Outcome of alloantigenized haploidentical bone marrow transplantation after ex vivo costimulatory blockade: results of 2 phase 1 studies. / J. K. Davies, J. G. Gribben, L. L. Brennan, D. Yuk, L. M. Nadler, E. C. Guinan // *Blood*. 2008;112(6):2232-2241.

77. Di Ianni, M. Tregs prevent GVHD and promote immune reconstitution in HLA-

- haploidentical transplantation. / M. Di Ianni, F. Falzetti, A. Carotti et al. // Blood. 2011;117(14):3921-3928.
78. Deng, X. R. Effect of graft-versus-host disease on relapse and survival in 100 patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. / X. R. Deng, H. Y. Ren, X. N. Cen, L. H. Wang et al.
79. Dvorak, C. C. A trial of alemtuzumab adjunctive therapy in allogeneic hematopoietic cell transplantation with minimal conditioning for severe combined immunodeficiency. / C. C. Dvorak, B. N. Horn, J. M. Puck et al. // *Pediatr Transplant*. 2014 Sep; 18(6):609-16.
80. Edinger, M. CD4+ CD25+ regulatory T cells preserve graft-versus-tumor activity while inhibiting graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. / M. Edinger, P. Hoffmann, J. Ermann et al. // *Nat Med*. 2003;9(9):1144-1150.
81. Di Stasi, A. Similar transplantation outcomes for acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome patients with haploidentical versus 10/10 human leukocyte antigen-matched unrelated and related donors. / A. Di Stasi, D. Milton, L. Poon et al. // *Biol Blood Marrow Transplant*. 2014 Dec;20(12):1975-81.
82. Eshhar, Z. Adoptive cancer immunotherapy using genetically engineered designer T-cells: first steps into the clinic. / Z. Eshhar // *Curr Opin Mol Ther*. 2010;12(1):55-63.
83. Franzke, A. G-CSF as immune regulator in T cells expressing the G-CSF receptor: implications for transplantation and autoimmune diseases. / A. Franzke, W. Piao, J. Lauber et al. // *Blood*. 2003;102:734-739.
84. Fagioli, F. Allogeneic stem cell transplantation for children with acute myeloid leukemia in second complete remission. / F. Fagioli, M. Zecca, F. Locatelli et al. // *J Pediatr Hematol Oncol*. 2008 Aug; 30(8): 575-83
85. Feuchtinger, T. Adoptive transfer of pp65-specific T cells for the treatment of chemorefractory cytomegalovirus disease or reactivation after haploidentical and matched unrelated stem cell transplantation. / T. Feuchtinger, K. Opherk, W. A. Bethge et al. // *Blood*. 2010;116(20):4360-4367.
86. Fuji, S. Haploidentical related peripheral blood stem cell transplantation as salvage

transplantation in patients with graft failure. / S. Fuji // International medicine. 2015; 54: 2709-2710.

87. Finke, J. Prognostic factors affecting outcome after allogeneic transplantation for hematological malignancies from unrelated donors: results from a randomized trial. / J. Finke, C. Schmoor, W. A. Bethge, H. D. Ottinger, M. Stelljes, A. R. Zander A.R. et al. // Biol Blood Marrow Transplant. 2012 Nov; 18(11):1716-26.

88. Gur, H. Immune regulatory activity of CD34⁺ progenitor cells: evidence for a deletion-based mechanism mediated by TNF-alpha. / H. Gur, R. Krauthgamer, E. Bachar-Lustig et al. // Blood. 2005;105(6): 2585-2593.

89. Gur, H. Tolerance induction by mega-dose hematopoietic progenitor cells: expansion of veto cells by short-term culture of purified human CD34⁺ cells. / H. Gur, R. Krauthgamer, A. Berrebi et al. // Blood. 2002; 99(11):4174-4181.

90. Gerdemann, U. Generation of multivirus-specific T cells to prevent/treat viral infections after allogeneic hematopoietic stem cell transplant. / U. Gerdemann, J. F. Vera, C. M. Rooney, A. M. Leen // J Vis Exp. 2011;(51):pii:273651.

91. Ge, X. CD134-allodepletion allows selective elimination of alloreactive human T cells without loss of virus-specific and leukemia-specific effectors. / X. Ge, J. Brown, M. Sykes, V. A. Boussiotis // Biol Blood Marrow Transplant. 2008;14(5):518-530.

92. Godfrey, W. R. Ex vivo depletion of alloreactive cells based on CFSE dye dilution, activation antigen selection, and dendritic cell stimulation. / W. R. Godfrey, M. R. Krampf, P. A. Taylor, B. R. Blazar // Blood. 2004;103(3): 1158-1165.

93. Gonzalez-Vicent, M. Allogeneic hematopoietic transplantation using haploidentical donor vs unrelated cord blood donor in pediatric patients: a single-center retrospective study. / M. Gonzalez-Vicent, B. Molina, M. Andio'n et al. // Eur J Haematol. 2011;87(1):46-53.

94. Gaballa, S. A two-step haploidentical versus a two-step matched related allogeneic myeloablative peripheral blood stem cell transplantation. / S. Gaballa, N. Palmisiano, O. Alpdogan // BBMT. 2015; article in press.

95. Gao, L. Favorable outcome of haploidentical hematopoietic stem cell

transplantation in Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia a multicenter study in Southwest China. / L. Gao, C. Zhang et al. // *Journal of Hematology & Oncology*. 2015. – 8; 90. DOI 10.1186/s13045-015-0186-5

96. Gluckman, E. Allogeneic transplantation strategies including haploidentical transplantation in sickle cell disease. / E. Gluckman // *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2013; 2013:370-6.

97. Ghiso, A. DLI after haploidentical BMT with post-transplant CY. / A. Ghiso, A. M. Raiola, F. Gualandi et al. // *Bone Marrow Transplant*. 2015 Jan;50(1):56-61. doi: 10.1038/bmt.2014.217. Epub 2014 Oct 13.

98. Godder, K.T. Partially mismatched related-donor bone marrow transplantation for pediatric patients with acute leukemia: younger donors and absence of peripheral blasts improve outcome. / K. T. Godder, L. J. Hazlett, S. H. Abhyankar, K. Y. Chiang, N. P. Christiansen, K. D. Bridges et al. // *J Clin Oncol* 2000; 18: 1856–1866.

99. Guinan, E.C. Transplantation of anergic histoincompatible bone marrow allografts. / E. C. Guinan, V. A. Boussiotis, D. Neuberg, L. L. Brennan, N. Hirano, L. M. Nadler et al. // *N Engl J Med* 1999; 340: 1704–1714.

100. Henslee-Downey, P.J. Combined in vitro and in vivo T lymphocyte depletion for the control of graft-versus-host disease following haploidentical marrow transplant. / P. J. Henslee-Downey, R. S. Parrish, J. S. Macdonald et al. // *Transplantation*. 1996;61(5):738-745.

101. Henslee-Downey, P. J. Use of partially mismatched related donors extends access to allogeneic marrow transplant. / P. J. Henslee-Downey, S. H. Abhyankar, R. S. Parrish, A. R. Pati, K. T. Godder, W. J. Neglia et al. // *Blood* 1997; 89: 3864-3872.

102. Hsu, K. C. Improved outcome in HLA-identical sibling hematopoietic stem-cell transplantation for acute myelogenous leukemia predicted by KIR and HLA genotypes. / K. C. Hsu, C. A. Keever-Taylor, A. Wilton et al. // *Blood*. 2005;105:4878-4884.

103. Henslee, P. J. T cell depletion of HLA and haploidentical marrow reduces graft-versus-host disease but it may impair a graft-versus-leukemia effect. / P. J. Henslee, J.

- S. Thompson, E. H. Romond, M. A. Doukas, M. Metcalfe, M. E. Marshall et al. // *Transplant Proc* 1987; 19: 2701–2706.
104. Handgretinger, R. Megadose transplantation of purified peripheral blood CD34⁺ progenitor cells from HLA-mismatched parental donors in children. / R. Handgretinger, T. Klingebiel, P. Lang et al. // *Bone Marrow Transplant.* 2001;27(8):777-783.
105. Handgretinger, R. Transplantation of TcR $\alpha\beta$ /CD19 Depleted Stem Cells From Haploidentical Donors: Robust Engraftment and Rapid Immune Reconstitution In Children with High Risk Leukemia. / R. Handgretinger, P. Lang, T. F. Feuchtinger et al. // Session: 711. Cell Collection and Processing: Graft Characterization and Manipulation December 13, 2011. 1005
106. Handgretinger, R. Haploidentical transplantation: the search for the best donor. / R. Handgretinger // *Blood.* 2014 Aug 7;124(6):827-8. doi: 10.1182/blood-2014-06-582460.
107. Haque, T. Allogeneic cytotoxic T-cell therapy for EBV-positive posttransplantation lymphoproliferative disease: results of a phase 2 multicenter clinical trial. / T. Haque, G. M. Wilkie, M. M. Jones et al. // *Blood.* 2007;110(4):1123-1131.
108. Hartwig, U. F. Depletion of alloreactive T cells via CD69: implications on antiviral, antileukemic and immunoregulatory T lymphocytes. / U. F. Hartwig, M. Nonn, S. Khan, R. G. Meyer, C. Huber, W. Herr // *Bone Marrow Transplant.* 2005;37(3):297-305.
109. 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;196(3):389-399.
110. Hagin, D. Haploidentical bone marrow transplantation in primary immune deficiency: stem cell selection and manipulation. / D. Hagin, Y. Reisner Y et. al. // *Immunol Allergy Clin North Am.* 2010;30(1):45-62.
111. Huang, X. J. The superiority of haploidentical related stem cell transplantation

over chemotherapy alone as postremission treatment for patients with intermediate- or high-risk acute myeloid leukemia in first complete remission. / X. J. Huang, H. H. Zhu, Y. J. Chang et al. // *Blood*, 2012 (119), NUMBER 23.

112. Huang, X. A novel approach to human leukocyte antigen-mismatched transplantation in patients with malignant hematological disease. / X. Huang, W. Han, L. Xu et al. // *Chin Med J*. 2004;117(12):1778-1785.

113. Huang X. J. Unmanipulated HLA-Mismatched/Haploidentical Blood and Marrow Hematopoietic Stem Cell Transplantation. / X. J. Huang, Y. J. Chang *Biol Blood Marrow Transplant* 17:197-204, 2011.

114. Huang H. J. Haploidentical hematopoietic stem cell transplantation without in vitro T-cell depletion for the treatment of hematological malignancies. / H. J. Huang, D. H. Liu, K. Y. Liu et al. // *Bone Marrow Transplantation* (2006) 38, 291–297.

115. Huang X. J. Current status of haploidentical stem cell transplantation for leukemia. / X. J. Huang // *Journal of Hematology & Oncology* 2008, 1:27

116. Ichinohe, T. Long-term fetomaternal microchimerism: nature's hidden clue for alternative donor hematopoietic cell transplantation? / T. Ichinohe, E. Maruya, H. Saji // *Int J Hematol*. 2002;76:229-237.

117. Ichinohe, T. Feasibility of HLA-haploidentical hematopoietic stem cell transplantation between noninherited maternal antigen (NIMA)-mismatched family members linked with long-term fetomaternal microchimerism. / T. Ichinohe, T. Uchiyama, C. Shimazaki et al. // *Blood*, 1 December 2004; (104) Number 12: 3821-3828

118. Im, H. J. Excellent outcome of haploidentical hematopoietic stem cell transplantation in children and adolescents with acquired severe aplastic anemia. / H. J. Im, K. N. Koh, E. S. Choi // *Biol Blood Marrow Transplant*. 2013 May;19(5):754-9

119. Jun, H. X. In vivo induction of T-cell hyporesponsiveness and alteration of immunological cells of bone marrow grafts using granulocyte colony-stimulating factor. / H. X. Jun, C. Y. Jun, Z. X. Yu // *Haematologica*. 2004;89:1517-1524.

120. Jun, H. X. A direct comparison of immunological characteristics of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF)-primed bone marrow grafts and G-CSF-mobilized

- peripheral blood grafts. / H. X. Jun, C. Y. Jun, Z. X. Yu // *Haematologica*. 2005;90:715-716.
121. Jester, S. Haploidentical stem cell transplantation in two children with mucopolysaccharidosis VI: clinical and biochemical outcome. / S. Jester, J. Larsson, E. A. Eklund et al. // *Orphanet J Rare Dis*. 2013 Sep 5; 8:134. doi: 10.1186/1750-1172-8-134.
122. Jones, R. J. Assessment of aldehyde dehydrogenase in viable cells. / R. J. Jones, J. P. Barber, M. S. Vala et al. // *Blood*. 1995; 85(10):2742-2746.
123. Jaiswal, S. R. Haploidentical Peripheral Blood Stem Cell Transplantation with Post-Transplantation Cyclophosphamide in Children with Advanced Acute Leukemia with Fludarabine-, Busulfan-, and Melphalan-Based Conditioning. / S. R. Jaiswal, A. Chakrabarti, S. Chatterjee et al. // *Biol Blood Marrow Transplant*. 2016 Mar;22(3):499-504. doi: 10.1016/j.bbmt.2015.11.010. Epub 2015 Nov 21.
124. Kernan, N. A. Graft rejection in recipients of T-cell-depleted HLA-nonidentical marrow transplants for leukemia: identification of host-derived antidonor alloreactive T lymphocytes. / N. A. Kernan, N. Flomenberg, B. Dupont, R. J. O'Reilly // *Transplantation*. 1987;43(6):842-847.
125. Kanda, Y. In vivo alemtuzumab enables haploidentical human leukocyte antigen-mismatched hematopoietic stem cell transplantation without ex vivo graft manipulation. / Y. Kanda, K. Oshima, Y. Asano-Mori et al. // *Transplantation*. 2005;79(10):1351-1357.
126. Kawai, T. HLA mismatched renal transplantation without maintenance immunosuppression. / T. Kawai, A. B. Cosimi, T. R. Spitzer et al. // *N Engl J Med*. 2008;358(4):353-361.
127. Kongtim, P. Haploidentical hematopoietic stem cell transplantation as platform for post-transplant cellular therapy. / P. Kongtim, D. Lee, L. Cooper et al. // *BBMT*. 2016, article in press.
128. Klingebiel, T. Results and factors influencing outcome after fully haploidentical hematopoietic stem cell transplantation in children with very high-risk acute lymphoblastic leukemia: impact of center size. An analysis on behalf of the Acute

Leukemia and Pediatric Disease Working Parties of the European Blood and Marrow Transplant Group. / T. Klingebiel, J. Cornish, M. Labopin et al. // *Blood*.2010;115(17):3437-3446.

129. Lang, P. Transplantation of a combination of CD133+ and CD34+ selected progenitor cells from alternative donors. / P. Lang, P. Bader, M. Schumm, T. Feuchtinger, H. Einsele, M. Fuhrer et al. // *Br J Haematol* 2004; 124: 72-79.

130. Leung, W. Determinants of antileukemia effects of allogeneic NK cells. / W. Leung, R. Iyengar, V. Turner et al. // *J Immunol*. 2004;172:644-650.

131. Leung, W. Comparison of killer Ig-like receptor genotyping and phenotyping for selection of allogeneic blood stem cell donors. / W. Leung, R. Iyengar, B. Triplett et al. // *J Immunol*. 2005;174:6540-6545.

132. Lehnert, S. Amplification of the graft-versus-host reaction by cyclophosphamide: dependence on timing of drug administration. / S. Lehnert, W. B. Rybka // *Bone Marrow Transplant*. 1994;13:473-477.

133. Luznik, L. Durable engraftment of major histocompatibility complex-incompatible cells after nonmyeloablative conditioning with fludarabine, low dose total body irradiation, and posttransplantation cyclophosphamide. / L. Luznik, S. Jalla, L. W. Engstrom, R. Iannone, E. J. Fuchs // *Blood*. 2001;98:3456-3464.

134. Luznik, L. Posttransplantation cyclophosphamide facilitates engraftment of major histocompatibility complex-identical allogeneic marrow in mice conditioned with low-dose total body irradiation. / L. Luznik, L. W. Engstrom, R. Iannone, E. J. Fuchs // *Biol Blood Marrow Transplant*. 2002;8:131-138.

135. Luznik, L. HLA-haploidentical bone marrow transplantation for hematologic malignancies using nonmyeloablative conditioning and high-dose, posttransplantation cyclophosphamide. / L. Luznik, P. V. O'Donnell, H. J. Symons, A. R. Chen, M. S. Leffell, M. Zahurak et al. // *Biol Blood Marrow Transplant* 2008; 14: 641–650.

136. Lapidot, T. Enhancement by dimethyl myleran of donor type chimerism in murine recipients of bone marrow allografts. / T. Lapidot, A. Terenzi, T. S. Singer, O. Salomon, Y. Reisner // *Blood*. 1989;73(7):2025-2032.

137. Lang, P. Long-term outcome after haploidentical stem cell transplantation in

- children. / P. Lang, J. Greil, P. Bader et al. // *Blood Cells Mol Dis*. 2004;33(3):281-287
138. Locatelli, F. Haploidentical hemopoietic stem cell transplantation for the treatment of high risk leukemias: how NK cells make the difference. / F. Locatelli, D. Pende, R. Maccario, M. C. Mingari, A. Moretta, L. Moretta // *Clin Immunol*. 2009;133(2):171-178.
139. Lankester, A. C. Immunotherapy in the context of hematopoietic stem cell transplantation: the emerging role of natural killer cells and mesenchymal stromal cells. / A. Lankester, L. M. Ball, P. Lang, R. Handgretinger // *Pediatr Clin North Am*. 2010;57(1):97-121.
140. Lask, A. Ex vivo generated donor central memory CD8 T cells, previously shown to enhance engraftment of allogeneic bone marrow, also exhibit significant GVL activity without causing GVHD in an in vivo B cell lymphoma model [abstract]. / A. Lask, E. Ophir, N. Or-Geva et al. // *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)*. 2010:424.
141. Liu, D. H. The impact of graft composition on clinical outcomes in pediatric patients undergoing unmanipulated HLA-mismatched/haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. / D. Liu, X. S. Zhao, Y. J. Chang, Y. K. Liu et al. // *Pediatr Blood Cancer* 2011;57:135-141.
142. Luo ,Y. T-cell-replete haploidentical HSCT with low-dose anti-T-lymphocyte globulin compared with matched sibling HSCT and unrelated HSCT. / Y. Luo, X. Haowen, L. Xiaoyu et al. // *Blood*. 2014; 124(7):2735-2743.
143. Li, G. Favorable outcome of haploidentical hematopoietic stem cell transplantation in Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia: a multicenter study in Southwest China. / G. Li, Z. Cheng, G. Lei et al. // *J.Hematology&Oncology*. 2015; 8:90.
144. Li, X. H. Reduced intensity conditioning, combined transplantation of haploidentical hematopoietic stem cells and mesenchymal stem cells in patients with severe aplastic anemia. / X. H. Li, C. J. Gao, W. M. Da // *PLoS One*. 2014 Mar 3;9(3): e89666. doi: 10.1371/journal.pone.0089666. eCollection 2014.

145. Luo, R. Tumorable haploidentical cell transplantation for treatment of hematologic malignancy in children. / R. Luo, W. Da, X. Zhang et al. // 2015; 1-2. doi:10.1038/bmt.2015.260.
146. Luo, Y. T-cell replete haploidentical HSCT with low-dose anti-T-lymphocyte globulin compared with matched sibling HSCT and unrelated HSCT. / Y. Luo, H. Xiao, X. Lai et al. // Blood. 2014 Oct 23;124(17):2735-43. doi: 10.1182/blood-2014-04-571570. Epub 2014 Sep 11.
147. Luo, X. H. Improving cytomegalovirus-specific T cell reconstitution after haploidentical stem cell transplantation. / X. H. Luo, Y. J. Chang, X. J. Huang // J Immunol Res. 2014;2014:631951. doi: 10.1155/2014/631951.
148. Lu, D. P. Conditioning including antithymocyte globulin followed by unmanipulated HLA-mismatched/haploidentical blood and marrow transplantation can achieve comparable outcomes with HLA-identical sibling transplantation. / D. P. Lu, L. Dong, T. Wu et al. // Blood. 2006 Apr 15;107(8):3065-73. Epub 2005 Dec 27.
149. Locatelli, F. Negative depletion of α/β + T cells and of CD19+ B lymphocytes: a novel frontier to optimize the effect of innate immunity in HLA-mismatched hematopoietic stem cell transplantation. / F. Locatelli, A. Bauquet, G. Palumbo et al. // Immunol Lett. 2013 Sep-Oct;155(1-2):21-3.
150. Michallet, M. Long-term outcome after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for advanced stage acute myeloblastic leukemia: a retrospective study of 379 patients reported to the Société Française de Greffe de Moelle (SFGM). / M. Michallet, X. Thomas, J. P. Vernant et al. // Bone Marrow Transplant. 2000 Dec; 26(11): 1157-1163.
151. Marek, A. The impact of T-cell depletion techniques on the outcome after haploidentical hematopoietic SCT. / A. Marek, M. Atern, Y. Chalandon et al. // Bone Marrow Transplant. 2014 Jan;49(1):55-61.
152. Montagna, D. Single cell cloning of human, donor-derived antileukemia T-cell

- lines for in vitro separation of graft-vs-leukemia effect from graft-vs-host reaction. / D. Montagna, L. Daudt, F. Locatelli et al. // *Cancer Res.* 2006;66:7310-7316.
153. Molitor, M. L. Immunobiology of exposure to non-inherited maternal antigens. / M. Molitor, W. J. Burlingham // *Front Biosci* 2007; 12: 3302–3311.
154. Mayumi, H. Cyclophosphamide induced immunological tolerance: an overview. / H. Mayumi, M. Umesue, K. Nomoto // *Immunobiology.*1996;195:129-139.
155. Mayumi, H. Drug-induced tolerance to allografts in mice. XII. The relationships between tolerance, chimerism, and graft-versus-host disease. / H. Mayumi, K. Himeno, K. Tanaka, N. Tokuda, J. L. Fan, K. Nomoto // *Transplantation.* 1987;44:286-290.
156. Mehta, J. Bone marrow transplantation from partially HLA mismatched family donors for acute leukemia: single-center experience of 201 patients. / J. Mehta, S. Singhal, A. P. Gee, K. Y. Chiang, K. Godder, F. F. Rhee et al. // *Bone Marrow Transplant* 2004; 33: 389–396.
157. Morris, E. S. Stem cell mobilization with G-CSF analogs: a rational approach to separate GVHD and GVL? / E. S. Morris, K. P. MacDonald, G. R. Hill // *Blood.* 2006;107:3430-3435.
158. Mapara, M.Y. Donor lymphocyte infusions mediate superior graft-versus-leukemia effects in mixed compared to fully allogeneic chimeras: a critical role for host antigen-presenting cells. / M. Y. Mapara, Y. M. Kim, S. P. Wang, R. Bronson, D. H. Sachs, M. Sykes // *Blood* 2002; 100: 1903–1909.
159. Munchel, A. T. Treatment of hematological malignancies with nonmyeloablative, HLA-haploidentical bone marrow transplantation and high dose, post-transplantation cyclophosphamide. / A. T. Muchel, Y. L. Kasamon, E. J. Fuchs // *Best Pract Res Clin Haematol.* 2011;24(3):359-368.
160. Munchel, A. Nonmyeloablative, HLA-haploidentical bone marrow transplantation with high dose, post-transplantation cyclophosphamide. / A. Munchel, C. Kesserwan, H. J. Symons et al. // *Pediatr Rep.* 2011;3(suppl 2):43-47.
161. Miller, R. G. An immunological suppressor cell inactivating cytotoxic T-lymphocyte precursor cells recognizing it. / R. G. Miller // *Nature.*

1980;287(5782):544-546.

162. Moretta, A. Human NK cells: from HLA class I-specific killer ig-like receptors to the therapy of acute leukemias. / A. Moretta, F. Locatelli, L. Moretta // *Immunol Rev.* 2008;224:58-69

163. Martins, S. L. Functional assessment and specific depletion of alloreactive human T cells using flow cytometry. / S. L. Martins, L. S. John, R. E. Champlin et al. // *Blood.* 2004;104(12):3429-3436.

164. Martelli, M.F. “Designed” grafts for HLA-haploidentical stem cell transplantation. / M. F. Martelli, M. Di. Ianni, L. Ruggeri, A. Pierini, F. Falzetti, A. Carotti, A. Terenzi, Y. Reisner, F. Aversa, B. Falini, A. Velardi // *Blood* 2014; 123 (7): 967-973.

165. Martelli, M. F. HLA-haploidentical transplantation with regulatory and conventional T-cell adoptive immunotherapy prevents acute leukemia relapse. / M. F. Martelli, M. Di Ianni, L. Ruggeri et al. // *Blood* 2014;124: 638–644.

166. Miller, J. S. Successful adoptive transfer and in vivo expansion of human haploidentical NK cells in patients with cancer. / J. S. Miller, Y. Soignier, A. Panoskaltsis-Mortari et al. // *Blood.* 2005;105(8):3051-3057.

167. Millan, M. T. Mixed chimerism and immunosuppressive drug withdrawal after HLA-mismatched kidney and hematopoietic progenitor transplantation. / M. T. Millan, J. A. Shizuru, P. Hoffmann et al. // *Transplantation.*2002;73(9):1386-1391.

168. Maschan, M. TCR-alpha/beta and CD19 depletion and treosulfan-based conditioning regimen in unrelated and haploidentical transplantation in children with acute myeloid leukemia. / M. Maschan, L. Shelikhova, M. Ilushina et al. // *Bone Marrow Transplant.* 2016; 1-7, doi:10.1038/bmt.2015.343.

169. Martinez, A. N-natural killer cell can exert a graft-vs-tumor effect in haploidentical stem cell transplantation for pediatric solid tumors. / A. Martinez, I. de Prada Vicente, L. Fernandez et al. // *Exp.Hematology.* 2012; 40: 882-891.

170. Mehta, R. S. Post-transplantation cyclophosphamide versus conventional graft-versus-host disease prophylaxis in mismatched unrelated donor haematopoietic

cell transplantation. / R. S. Mehta, R. M. Saliba, J. Chen et al. // *Br J Haematol*. 2016 Mar 7. doi: 10.1111/bjh.13977. [Epub ahead of print]

171. Moiseev, I. S. Graft-versus-host disease prophylaxis in unrelated peripheral blood stem cell transplantation with post-transplantation cyclophosphamide, tacrolimus and mycophenolate mofetil. / I. S. Moiseev, O. V. Pirogova, A. L. Alyanski, E. B. Babenko, T. L. Gindina, E. I. Darskaya, O. A. Slesarchuk, S. N. Bondarenko, B. V. Afanasyev // *Biol Blood Marrow Transplant*. 2016 Mar 9. pii: S1083-8791(16)00153-1. doi: 10.1016/j.bbmt.2016.03.004. [Epub ahead of print]

172. Nguyen, V. H. The impact of regulatory T cells on T-cell immunity following hematopoietic cell transplantation. / V. H. Nguyen, S. Shashidhar, D. S. Chang et al. // *Blood*. 2008;111(2):945-953.

173. Nguyen, V. H. In vivo dynamics of regulatory T-cell trafficking and survival predict effective strategies to control graft-versus-host disease following allogeneic transplantation. / V. H. Nguyen, R. Zeiser, D. L. daSilva et al. // *Blood*. 2007;109(6):2649-2656.

174. Ochiai, N. Successful non-T-cell depleted HLA haplo-identical 3-loci mismatched hematopoietic stem cell transplantation from mother to son based on the fetomaternal microchimerism in chronic myelogenous leukemia. / N. Ochiai, C. Shimazaki, S. Fuchida et al. // *Bone Marrow Transplant*. 2002;30:793-796.

175. Owens, A. H. The effect of cytotoxic drugs on graft-versus-host disease in mice. / A. H. Owens, G. W. Santos // *Transplantation*. 1971;11(4):378-382.

176. Ophir, E. Induction of tolerance to bone marrow allografts by donor-derived host nonreactive ex vivo-induced central memory CD8 T cells. / E. Ophir, Y. Eidelstein, R. Afik, E. Bachar-Lustig, Y. Reisner // *Blood*. 2010;115(10):2095-2104.

177. Owen, R. D. Immunogenetic consequences of vascular anastomoses between bovine twins. / R. D. Owen // *Science*. 1945;102(2651):400-401.

178. O'Reilly, R. J. HLA nonidentical T cell depleted marrow transplants: a comparison of results in patients treated for leukemia and severe combined immunodeficiency disease. / R. J. O'Reilly, C. Keever, N. A. Kernan, J. Brochstein, N. Collins, N. Flomenberg et al. // *Transplant Proc* 1987; 19: 55–60.

179. Oevermann, L. KIR B haplotype donors confer a reduced risk for relapse after haploidentical transplantation in children with ALL. / L. Oevermann, S. U. Michaelis, M. Mezger // *Blood*. 2014 Oct 23;124(17):2744-7. doi: 10.1182/blood-2014-03-565069. Epub 2014 Aug 12.
180. Powles, R. L. Mismatched family donors for bone-marrow transplantation as treatment for acute leukaemia. / R. L. Powles, G. R. Morgenstern, H. E. Kay, T. J. McElwain, H. M. Clink, P. J. Dady et al. // *Lancet* 1983; 1: 612–615.
181. Pelot, M. R. Lymphohematopoietic graft-vs-host reactions can be induced without graft-vs-host disease in murine mixed chimeras established with a cyclophosphamide-based nonmyeloablative conditioning regimen. / M. R. Pelot, D. A. Pearson, K. Swenson, G. Zhao, J. Sachs, Y. G. Yang et al. // *Biol Blood Marrow Transplant* 1999; 5: 133–143.
182. Peters, C. Stem-Cell Transplantation in Children With Acute Lymphoblastic Leukemia: A Prospective International Multicenter Trial Comparing Sibling Donors With Matched Unrelated Donors - The ALL-SCT-BFM-2003 Trial. / C. Peters, M. Schappe, T. Klingebiel et al. // *J Clin Oncol* 33:1265-1274. 2015 by American Society of Clinical Oncology
183. Peccatori, J. In-vivo T-reg generation by rapamycin-mycophenolate-ATG as a new platform for GvHd prophylaxis in T-cell repleted unmanipulated haploidentical peripheral stem cell transplantation: results in 59 patients”. / J. Peccatori, D. Clerici, A. Forcina, M. Bernardi, R. Crocchiolo, C. Messina, M. Noviello, S. Mastaglio, F. Giglio, S. Malato, M.T. Lupo Stanghellini, S. Markteli, A. Assanelli, M. Battaglia, A. Ferraro, S. Rossini, M.E. Bernardo, A. Bondanza, M.G. Roncarolo, C. Bonini, F. Locatelli, F. Ciceri // *Bone Marrow Transplantation* (2010) 45, Supplement 2, March 2010.
184. Prigozhina, T. B. Permanent and specific transplantation tolerance induced by a nonmyeloablative treatment to a wide variety of allogeneic tissues: I. induction of tolerance by a short course of total lymphoid irradiation and selective elimination of the donor specific host lymphocytes. / T. B. Prigozhina, O. Gurevitch, J. Zhu, S. Slavin // *Transplantation*. 1997; 63(10):1394-1399.

185. Perruccio, K. Transferring functional immune responses to pathogens after haploidentical hematopoietic transplantation. / K. Perruccio, A. Tosti, E. Burchielli et al. // *Blood*. 2005;106(13):4397-4406.
186. Perruccio, K. Photodynamic purging of alloreactive T cells for adoptive immunotherapy after haploidentical stem cell transplantation. / K. Perruccio, F. Topini, A. Tosti et al. // *Blood Cells Mol Dis*. 2008;40(1):76-83.
187. Porter, D. L. Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia. / D. L. Porter, B. L. Levine, M. Kalos, A. Bagg, C. H. June // *N Engl J Med*. 2011;365(8):725-733.
188. Park, B. G. Reconstitution of lymphocyte subpopulations after hematopoietic stem cell transplantation: comparison of hematologic malignancies and donor types in event-free patients. / B. G. Park, C. J. Park, S. Jang et al. // *Leuk Res*. 2015 Dec;39(12):1334-41.
189. Peters, C. Transplantation of highly purified peripheral blood CD34+ cells from HLA-mismatched parental donors in 14 children: evaluation of early monitoring of engraftment. / C. Peters, S. Matthes-Martin, G. Fritsch, W. Holter, T. Lion, V. Witt et al. // *Leukemia* 1999; 13: 2070-2078.
190. Polishchuk, V. 5-Azacitidine Monotherapy Followed by Related Haploidentical Hematopoietic Stem Cell Transplantation Achieves Durable Remission in a Pediatric Patient With Acute Undifferentiated Leukemia Refractory to High-Dose Chemotherapy. / V. Polishchuk, S. Khazal, G. Berulava, M. Roth, K. M. Mahadeo // *Pediatr Blood Cancer*. 2016 Feb 23. doi: 10.1002/pbc.25948. [Epub ahead of print].
191. Peng, H. Suppression of NRF2-ARE activity sensitizes chemotherapeutic agent-induced cytotoxicity in human acute monocytic leukemia cells. / H. Peng, H. Wang, M. Andersen et al. // *Toxicol Appl Pharmacol*, 2016 Feb 1; 292: 1-7.
192. van Rood, J. J. Effect of tolerance to noninherited maternal antigens on the occurrence of graft-versus-host disease after bone marrow transplantation from a parent or an HLA-haploidentical sibling. / J. J. van Rood, F. R. Loberiza, M. J. Zhang et al. // *Blood*.2002;96:1572-1577.

193. Rocha, V. Clinical use of umbilical cord blood hematopoietic stem cells. / V. Rocha, E. Gluckman // *Biol Blood Marrow Transplant*. 2006 Jan;12(1 Suppl 1):34-41.
194. Ribera, J. M. Profile of blinatumomab and its potential in the treatment of relapsed/refractory acute lymphoblastic leukemia. / J. Ribera, A. Ferrer et al. // *Onco Targets Ther*. 2015; 8: 1567–1574.
195. Ruggeri, L. Donor natural killer cell allorecognition of missing self in haploidentical hematopoietic transplantation for acute myeloid leukemia: challenging its predictive value. / L. Ruggeri, A. Mancusi, M. Capanni et al. // *Blood* 2007 110: 433-440.
196. Ruggeri, L. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. / L. Ruggeri, M. Capanni, E. Urbani et al. // *Science* 2002;295:2097-2100.
197. Ruggeri, L. Donor natural killer cell allorecognition of missing self in haploidentical hematopoietic transplantation for acute myeloid leukemia: challenging its predictive value. / L. Ruggeri, A. Mancusi, M. Capanni et al. // *Blood*. 2007;110:433-440.
198. Rizzieri, D. A. Partially matched, nonmyeloablative allogeneic transplantation: clinical outcomes and immune reconstitution. / D. A. Rizzieri, L. P. Koh, G. D. Long, C. Gasparetto, K. M. Sullivan, M. Horwitz et al. // *J Clin Oncol* 2007; 25: 690–697.
199. Reisner, Y. Bone marrow transplantation across HLA barriers by increasing the number of transplanted cells. / Y. Reisner, M. F. Martelli // *Immunol Today*. 1995;16(9):437-440.
200. Reisner, Y. Haploidentical hematopoietic transplantation current status and future perspectives. / Y. Reisner, D. Hagin, M. F. Martelli // *Blood*. 2011;118(23):6006-6016.
201. Reisner, Y. Demonstration of clonable alloreactive host T cells in a primate model for bone marrow transplantation. / Y. Reisner, I. Ben-Bassat, D. Douer, A. Kaploon, E. Schwartz, B. Ramot // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986;83(11):4012-4015.
202. Rachamim, N. Tolerance induction by “mega-dose” hematopoietic transplants:

- donor-type human CD34 stem cells induce potent specific reduction of host anti-donor cytotoxic T lymphocyte precursors in mixed lymphocyte culture. / N. Rachamin, J. Gan, H. Segall et al. // *Transplantation*. 1998;65(10): 1386-1393.
203. Raiola, A. Unmanipulated haploidentical bone marrow transplantation and posttransplantation cyclophosphamide for hematologic malignancies after myeloablative conditioning. / A. Raiola, A. Dominietto, A. Ghiso et al. // *Biol Blood Marrow Transplant*. 2013; 19:117–122.
204. Reisner, Y. Transplantation for severe combined immunodeficiency with HLA-A, B, D, DR incompatible parental marrow cells fractionated by soybean agglutinin and sheep red blood cells. / Y. Reisner, N. Kapoor, D. Kirkpatrick et al. // *Blood*. 1983;61(2):341- 348.
205. Raiola, A. Unmanipulated haploidentical BMT following non-myeloablative conditioning and post-transplantation CY for advanced Hodgkin's lymphoma. / A. Raiola, A. Dominietto, R. Varaldo et al. // *Bone Marrow Transplant*. 2014 Feb;49(2):190-4. doi: 10.1038/bmt.2013.166. Epub 2013 Nov 4.
206. Symons, H. J. Hematopoietic SCT from partially HLA-mismatched (HLA-haploidentical) related donors. / H. J. Symons, E. J. Fuchs // *Bone Marrow Transplantation* (2008) 42,365–377.
207. Szydlo, R. Results of allogeneic bone marrow transplants for leukemia using donors other than HLA identical siblings. / R. Szydlo, J. M. Goldman, J. P. Klein, R. P. Gale, R. C. Ash, F. H. Bach et al. // *J Clin Oncol* 1997; 15: 1717–1777.
208. Schumm, M. Isolation of highly purified autologous and allogeneic peripheral CD34+ cells using the CliniMACS device. / M. Schumm, P. Lang, G. Taylor, S. Kuci, T. Klingebiel, H. J. Buhring et al. // *J Hematother* 1999; 8: 209-218.
209. Sykes, M. Mixed lymphohaemopoietic chimerism and graft-versus-lymphoma effects after non-myeloablative therapy and HLA-mismatched bone-marrow transplantation. / M. Sykes, F. Preffer, S. McAfee, S. L. Saidman, D. Weymouth, D. M. Andrews et al. // *Lancet* 1999; 353: 1755–1759.
210. Spitzer, T. R. Haploidentical stem cell transplantation: the always present but overlooked donor. / T. R. Spitzer // *Hematology* 2005; 2005: 390–395.

211. Shin, H. J. Rapamycin and IL-2 reduce lethal acute graft-versus-host disease associated with increased expansion of donor type CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells. / H. J. Shin, J. Baker, D. B. Leveson-Gower, A. T. Smith, E. I. Sega, R. Robert S. Negrin // *Blood*, 2011; 118 (8).
212. Santos, G. W. Cyclosporine plus methylprednisolone versus cyclophosphamide plus methylprednisolone as prophylaxis for graft-versus-host disease: a randomized double-blind study in patients undergoing allogeneic marrow transplantation. / G. W. Santos, P. J. Tutschka, R. Brookmeyer et al. // *Clin Transplant*. 1987;1:21-28.
213. Stern, M. Survival after T cell-depleted haploidentical stem cell transplantation is improved using the mother as donor. / M. Stern, L. Ruggeri, A. Mancusi et al. // *Blood*. 2008;112(7):2990-2995.
214. Stuehler, C. Selective depletion of alloreactive T cells by targeted therapy of heat shock protein 90: a novel strategy for control of graft-versus-host disease. / C. Stuehler, S. Mielke, M. Chatterjee et al. // *Blood*. 2009;114(13):2829-2836.
215. Sawada, A. Feasibility of HLA-Haploidentical Hematopoietic Stem Cell Transplantation with posttransplantation cyclophosphamide for advanced pediatric malignancies. / A. Sawada, M. Shimizu, K. Isaka, K. Higuchi, A. Mayumi, Y. Yoshimoto, H. Kikuchi et al. // *Pediatric Hematology Oncology*. 2014; 31: 754-764.
216. Shimoni, A. Haploidentical stem-cell transplant: the challenge of immune reconstitution. / A. Shimoni // *Leukemia and Lymphoma*, 2013.
217. Solomon, S. R. Myeloablative Conditioning with PBSC Grafts for T Cell-Replete Haploidentical Donor Transplantation Using Posttransplant Cyclophosphamide. / S. Solomon, M. Solh, L. E. Morris et al. // *Adv Hematol*. 2016;2016:9736564. doi: 10.1155/2016/9736564. Epub 2016 Jan 21.
218. Sun, Y. Treatment of childhood leukemia with haploidentical stem cell transplantation using parent as donor: a single study of 111 cases. / Y. Sun, J. Xiao, Z. H. Li et al. // *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. 2015; 19: 4379-4384.
219. Trigg, M. E. Low rejection rate when using unrelated or haploidentical donors for children with leukemia undergoing marrow transplantation. / M. E. Trigg, R.

- Gingrich, N. Goeken et al. // *Bone Marrow Transplant*. 1989;4(4):431-437.
220. Tamaki, S. Superior survival of blood and marrow stem cell transplants given maternal grafts over recipients given paternal grafts. / S. Tamaki, T. Ichinohe, K. Matsuo et al. // *Bone Marrow Transplant*. 2001;28:375-380.
221. Trenado, A. Recipienttype specific CD4+ CD25+ regulatory T cells favor immune reconstitution and control graft-versus-host disease while maintaining graft-versus-leukemia. / A. Trenado, F. Charlotte, S. Fisson et al. // *J Clin Invest*. 2003;112(11):1688-1696.
222. Talano, J. A. Hematopoietic stem cell transplantation for sickle cell disease: state of the science. / J. A. Talano, M. S. Cairo // *Eur J Haematol*. 2015 May;94(5):391-9. doi: 10.1111/ejh.12447. Epub 2014 Oct 10.
223. Tischer, J. Second haematopoietic SCT using HLA-haploidentical donors in patients with relapse of acute leukaemia after a first allogeneic transplantation. / J. Tischer, N. Engel, S. Fritsch et al. // *Bone Marrow Transplant*. 2014 Jul;49(7):895-901.
224. Tian, H. Haploidentical hematopoietic stem cell transplant in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. / H. Tian, L. Liu , J. Chen et al. // *Leuk.Lymphoma*. 2016; 57(4): 835-841.
225. Volpi, I. Postgrafting administration of granulocyte colony-stimulating factor impairs functional immune recovery in recipients of human leukocyte antigen haplotype mismatched hematopoietic transplants. / I. Volpi, K. Perruccio, A. Tosti et al. // *Blood*. 2001;97(8):2514-2521.
226. Wahid, S. Comparison of Reduced-Intensity and Myeloablative Conditioning Regimens for Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Patients with Acute Myeloid Leukemia and Acute Lymphoblastic Leukemia: A Meta-Analysis. / S. Wahid, F. Abdul, N. A. Ismail, M. R. Mohd-Idris et al. // *Stem Cells Dev*. 2014 Nov 1; 23(21): 2535-2552.
227. Wehler, T. C. Targeting the activation-induced antigen CD137 can selectively deplete alloreactive T cells from antileukemic and antitumor donor T-cell lines. / T. C. Wehler, M. Nonn, B. Brandt et al. // *Blood*. 2007;109(1):365-373.

228. Wang Y, Liu DH, Xu LP, et al. Superior graft-versus-leukemia effect associated with transplantation of haploidentical compared with HLA-identical sibling donor grafts for high-risk acute leukemia: an historic comparison. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2011;17(6):821-830.
229. Wang, Y. Prevention of relapse using granulocyte CSF-primed PBPCs following HLA-mismatched/haploidentical, T-cell-replete hematopoietic SCT in patients with advanced-stage acute leukemia: a retrospective risk-factor analysis. / Y. Wang, D. H. Liu, L. P. Xu, X. J. Huang et al. // *Bone Marrow Transplant.* 2012 Aug;47(8):1099-104.
230. Wang, Y. Who is the best donor for a related HLA haplotype-mismatched transplant? / Y. Wang, Y. J. Chang, L. P. Xu, K. Y. Liu, D. H. Liu, X. H. Zhang, H. Chen et al. // *Blood* 2014; 124: 843-850.
231. Xia, C. Q. Drug Efflux Transporters and Multidrug Resistance in Acute Leukemia: Therapeutic Impact and Novel Approaches to Mediation. / C. Q. Xia, P. G. Smith // *Mol. Pharmacol* 82: 1008-1021, 2012
232. Yesilipek, M. Haploidentical hematopoietic stem cell transplantation with post-transplant high-dose cyclophosphamide in high-risk children: A single-center study. / M. Yesilipek, V. Uygun, G. Karasu et al. // *Pediatr. Transplant.* 2015. Dec 28: doi:10.1111/petr.12658.
233. Zangi, L. Tolerance induction by immature dendritic cells is mediated by distinct MHC dependent and independent mechanisms: a novel role for perforin, granzyme A and toll like receptor 7 [abstract]. / L. Zangi, Y. Edelshtein, Y. Klionsky et al. // *Blood.* 2009; 114: Abstract 65.
234. Zangi, L. Deletion of cognate CD8 T-cells by immature dendritic cells: a novel role for perforin, Granzyme A, TREM-1 and TLR7. / L. Zangi, Y. Klionsky, L. Yarimi et al. // *Blood First Edition Paper*, prepublished online July 9, 2012
235. Zuckerman, T. Alternative donor transplantation in acute myeloid leukemia: which source and when? / T. Zuckerman, J. M. Rowe // *Curr Opin Hematol.* 2007;14:152-161.
236. Zhang, Y. Comparison of haploidentical stem cell transplantation and

immunosuppressive therapy for the treatment of acquired severe aplastic anemia in pediatric patients. / Y. Zhang, Z. Guo, X. Liu et al. // A.J.Ther. 2016

237. Zeidan, A. M. HLA-haploidentical donor lymphocyte infusions for patients with relapsed hematologic malignancies after related HLA-haploidentical bone marrow transplantation. / A. M. Zeidan, P. M. Forde, H. Symons et al. // Biol Blood Marrow Transplant. 2014 Mar;20(3):314-8.