

# ГЕМАТОЛОГИЯ ТРАНСФУЗИОЛОГИЯ

Восточная Европа

[www.recipe.by](http://www.recipe.by)

2019, том 5, №4

Основан в 2015 г.

## Беларусь

### Учредители:

УП «Профессиональные издания»;  
ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии»;  
ГУ «Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий»;  
ГУ «Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии»

### Журнал зарегистрирован

Министерством информации Республики Беларусь.  
Свидетельство № 1763 от 27 апреля 2015 г.

### Адрес редакции:

220049, Минск, ул. Кнорина, 17.  
Тел.: +375 (17) 322 16 77, (17) 322 16 78,  
e-mail: [gemtrans@recipe.by](mailto:gemtrans@recipe.by)

**Директор** Евтушенко Л.А.  
**Заместитель главного редактора**  
Глушук В.А.  
**Руководитель службы рекламы и маркетинга** Коваль М.А.  
**Технический редактор** Нухин Д.В.

## Украина

### Учредители:

Национальная медицинская академия последипломного образования имени П.Л. Шупика;  
УП «Профессиональные издания»

### Журнал зарегистрирован

Государственной регистрационной службой Украины 02 ноября 2015 г.  
Свидетельство КВ № 21667-1567Р

### Офис в Украине:

ООО «Профессиональные издания. Украина»  
04116, Киев, ул. Старокиевская, 10-г, сектор «В», офис 201

### Контакты:

Тел.: +38 (044) 33 88 704, +38 (094) 910 17 04,  
e-mail: [reklama\\_id@ukr.net](mailto:reklama_id@ukr.net)

## Россия

### Учредители:

ООО «Вилин»

### Журнал зарегистрирован

Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций (Роскомнадзор) 18 сентября 2015 г.  
Свидетельство ПИ № ФС77-63514

### Офис в России:

ООО «Вилин»

214006, Смоленск, пст Пасово.  
Тел./факс +7 920 301 00 19,  
e-mail: [volkov@para-la-oro.com](mailto:volkov@para-la-oro.com)

Электронная версия журнала доступна на сайте [gemtrans.recipe.by](http://gemtrans.recipe.by), в Научной электронной библиотеке eLibrary.ru, в базе данных East View, в электронной библиотечной системе IPRbooks.

В Украине подписка оформляется через офис ООО «Профессиональные издания. Украина».

В Беларуси подписка оформляется через каталог РУП «Белпочта»: индивидуальный индекс - 00315, ведомственный индекс - 003152.

Журнал выходит 1 раз в 3 месяца.

Цена свободная.

Подписано в печать: 06.12.2019.

Тираж (Беларусь) 500 экз.

Тираж (Украина) 1000 экз.

Тираж (Россия) 3500 экз.

Заказ №

Формат 70×100 1/16. Печать офсетная

**Отпечатано** в типографии ФЛП Нестерова Л.О.

Тел.: +380682262444

© «Гематология. Трансфузиология. Восточная Европа»

Авторские права защищены. Любое воспроизведение материалов издания возможно только с письменного разрешения редакции с обязательной ссылкой на источник.

© УП «Профессиональные издания», 2019

© Оформление и дизайн: УП «Профессиональные издания», 2019



Насыщенная научная программа, охватившая практически весь спектр сложнейших вопросов детской онкологии, гематологии и иммунологии, позволила сделать мероприятие действительно масштабным и полезным для специалистов. Сообщения докладчиков базировались как на данных последних мировых исследований, так и собственных результатах, сопровождаясь представлением клинических случаев из практики.

В ходе прошедшей конференции были четко обозначены существующие проблемы и пути их решения в клинической практике. Реализация поставленных задач позволит повысить уровень медицинской помощи, снизив токсичность используемых методов и улучшив тем самым качество жизни у пациентов. Безусловно, прозвучавшие результаты проведенных исследований внесут определенный вклад в будущее онкологии.

Выражаем благодарность Татьяне Алексеевне Угловой за помощь в подготовке материала.

М.В. Игнатенко.



УДК 616-006.446-085.37-053.2

Алейникова О.В., Наумович М.Г., Баровская Ю.А., Вашкевич Е.П., Матвеев М.А., Мигас А.А., Исайкина Я.И., Мишкова О.А., Пунько А.В., Шман Т.В.  
Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии, Минск, Беларусь

Aleinikova O., Naumovich M., Barovskaya Y., Vashkevich E., Matveenko M., Migas A., Isaikina Y., Mishkova O., Punko A., Shman T.  
Republican Scientific-Practical Center of Pediatric Oncology, Hematology and Immunology, Minsk, Belarus

## Применение естественных киллерных клеток в иммунотерапии гемобластозов у детей Natural Killer Cells in Immunotherapy of Hematological Malignancies in Children

### Резюме

Благодаря использованию интенсивных риск-адаптированных режимов химиотерапии (ХТ), совершенствованию процедуры трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК), а также улучшению сопроводительной терапии современные стратегии лечения острого миелобластного лейкоза (ОМЛ) у детей привели к увеличению общей выживаемости до 70% в странах с высоким уровнем развития. Однако достижение предела интенсификации ХТ требует от исследователей разработки новых подходов для дальнейшего улучшения результатов терапии гемобластозов, а в частности ОМЛ, и увеличения выживаемости у детей. Адоптивная иммунотерапия с использованием естественных киллерных (ЕК) клеток является весьма перспективным подходом, применяемым для достижения данной цели. В свое исследование мы включили пациентов с острым миелобластным лейкозом и другими диагнозами, которые получали лечение согласно утвержденным клиническим протоколам и были рандомизированы в группу с иммунотерапией ЕК-клетками. Получение ЕК-клеток для проведения иммунотерапии осуществлялось двумя разными способами для оценки их эффективности: методом иммуномагнитной селекции и экспансии на фидерных клетках. Десять пациентов (средний возраст на момент исследования 8,8 года (диапазон 2-20 лет) получили иммунотерапию ЕК-клетками без наблюдения существенных побочных эффектов. Критерием оценки эффективности ЕК-клеточной терапии стал уровень минимальной остаточной болезни (МОБ). Для 80% пациентов было выявлено достоверное снижение уровня МОБ. 70% пациентов, получивших иммунотерапию ЕК-клетками, в настоящее время живы и находятся в ремиссии. Такие результаты дают нам основание полагать, что иммунотерапия ЕК-клетками безопасна и хорошо переносится пациентами, но для дальнейшей оценки ее эффективности необходимо продолжить исследование.

**Ключевые слова:** острый миелобластный лейкоз (ОМЛ), адоптивная иммунотерапия, естественные киллерные (ЕК) клетки, иммуномагнитная селекция, экспансия на фидерных клетках, минимальная остаточная болезнь (МОБ).

Abstract

Due to the use of intensive risk-adapted chemotherapy (CT), the improvement of hematopoietic stem cell transplantation (HSCT), and the improvement of supportive therapy, modern treatment strategies for acute myeloid leukemia (AML) in children led to increase of overall survival of up to 70% for high-income countries. However, reaching the limit of CT intensification requires researchers to develop new approaches to further improve the results of therapy of hematological malignancies and especially AML and increase survival rates in children. Adoptive immunotherapy using natural killer (NK) cells is a very promising approach used to achieve this goal. In our study, we included patients with acute myeloid leukemia (AML) and other diagnoses, who received treatment, according to the approved clinical protocols and were randomized to a group with NK-cells immunotherapy. Obtaining NK-cells for immunotherapy was carried out in two different ways to evaluate their effectiveness: immunomagnetic selection and expansion on feeder cells. Ten patients (median of age at the time of the study was 8.8 years (range - 2-20 years) received immunotherapy with NK-cells without observation of significant side effects. The level of minimal residual disease (MRD) was used as a criterion for assessment of the effectiveness of NK-cell therapy. For 80% of patients, a significant decrease of the level of MRD was revealed; 70% of patients, who received immunotherapy with NK-cells are currently alive and in remission. Such results give us the reason to suppose that immunotherapy with NK-cells is safe and well tolerated by patients, but to assess its effectiveness, it is necessary to continue the study.

**Keywords:** acute myeloid leukemia (AML), adoptive immunotherapy, natural killer (NK) cells, immunomagnetic selection, expansion on feeder cells, minimal residual disease (MRD).

■ ВВЕДЕНИЕ

В последние три десятилетия достигнуты значительные успехи терапии детей с онкогематологической патологией, причем выживаемость при злокачественных заболеваниях лимфоидной системы, таких как острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ), ходжкинская (ХЛ) и неходжкинские лимфомы (НХЛ), достигла 90% [1]. Современные стратегии лечения острого миелоидного лейкоза (ОМЛ) также привели к улучшению общей выживаемости до 70% в странах с высоким уровнем развития [2]. Этому способствовало использование интенсивных риск-адаптированных режимов химиотерапии (ХТ) [3], совершенствование процедуры трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) [4, 5], улучшение сопроводительной терапии [6]. Однако на сегодняшний день становится понятным, что достигнут предел в интенсификации ХТ и необходимы новые подходы для дальнейшего улучшения результатов терапии ОМЛ у детей.

Одним из перспективных новых методов лечения гемобластозов у детей является клеточная терапия генно-модифицированными Т-лимфоцитами (CAR-T) [7] и адоптивная иммунотерапия с использованием естественных киллерных (ЕК) клеток.

В отличие от Т-клеток, ЕК-клетки не нуждаются в предварительной сенсibilизации для того, чтобы элиминировать опухолевые клетки, при этом они могут регулировать цитотоксичность посредством комплекса взаимодействий поверхностных рецепторов ЕК-клеток и их специфических лигандов, экспрессируемых на поверхности клеток-мишеней. Поверхностные иммуноглобулиноподобные рецепторы



(KIR2DL1, KIR2DL2/3 и KIR3DL1) позволяют донорским ЕК-клеткам демонстрировать антилейкемический эффект в том случае, если у реципиента отсутствуют родственные лиганды HLA класса I. Такой эффект был продемонстрирован как в доклинических, так и в клинических испытаниях, при этом у пациентов не развивалась реакция «трансплантат против хозяина» (РТПХ) [8].

Количество и активность ЕК-клеток ассоциированы с прогностическими показателями для некоторых злокачественных гематологических заболеваний [9]. Так, например, присутствие ЕК-клеток в костном мозге пациентов с ОЛЛ, обнаруженное при диагностике, ассоциировано с лучшим ответом на терапию и высоким шансом выхода в ремиссию. Также преобладание ЕК-клеток с сильным эффекторным фенотипом при диагностике обычно связывают с контролем заболевания после проведения лечения. Количество ЕК-клеток и их функции также тесно связаны с тяжестью протекания и прогностическими показателями при детских НХЛ, хроническом лимфобластном лейкозе и диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфоме.

Приблизительно у одной трети детей с ОМЛ развивается рецидив заболевания, несмотря на применение риск-адаптивной интенсивной мультиагентной химиотерапии (с ТГСК или без нее). В этой связи необходим поиск новых методов терапии, позволяющих достичь увеличения показателей излечения одновременно с уменьшением токсичности терапии [10].

Первым доказательством терапевтического эффекта применения ЕК-клеток при ОМЛ стало исследование, проведенное с привлечением 57 взрослых пациентов. Двадцати пациентам из этой выборки была проведена гаплоидентичная трансплантация от KIR-HLA-несовместимого\* донора - и ни один из этих пациентов в дальнейшем не столкнулся с рецидивом заболевания [11].

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Разработка технологии лечения онкогематологических заболеваний у детей с помощью ЕК-клеток, полученных различными методами.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование было включено 10 пациентов, которые были разделены на две группы.

В первую группу вошли шесть (P1-P6) пациентов с первичным острым миелоидным лейкозом (ОМЛ), для которых ЕК-клетки были получены методом иммуномагнитной селекции. Пациенты этой группы получали лечение по протоколу ОМЛ-ММ-2014, относились к промежуточной группе риска и были рандомизированы в группу с иммунотерапией ЕК-клетками. Пациенты получали 4 курса полихимиотерапии и иммунотерапию ЕК-клетками.

\* KIR - killer cell immunoglobulin-like receptor - иммуноглобулиноподобный рецептор ЕК-клеток, HLA - human leukocyte antigen - человеческие лейкоцитарные антигены.

Во вторую группу вошли 4 пациента (P7-P10) с различными диагно-  
зами, для которых ЕК-клетки получали с помощью экспансии на фидер-  
ных клетках (FD21).

Для лучшей персистенции донорских ЕК-клеток необходимо про-  
ведение циторедуктивного кондиционирования. Перед введением ЕК-  
клеток режим кондиционирования для пациентов P1-P6, P7 и P10 вклю-  
чал: циклофосфамид 60 мг/кг в течение 1 часа внутривенно (день -7);  
флюдарабин 25 мг/м²/день 30-минутной внутривенной инфузией (день  
с -6 по -2). Пациенты P8 и P9 получали индивидуальные блоки химиоте-  
рапии. В день 0 осуществлялось введение ЕК-клеток путем внутривен-  
ной болюсной инфузии.

Активация ЕК-клеток для трех пациентов (P1-P3) проводилась in vitro  
с помощью интерлейкина-2 (ронколейкина, «НПК «БИОТЕХ», Россия) в  
течение 18-72 часов в дозе 1 тыс. Ед/мл. ЕК-клетки для пациентов P4-  
P10 активировались in vivo путем подкожного введения ронколейкина  
в дозе 1 миллион МЕ/м² ежедневно, начиная с дня -1 (всего 6 инъекций).  
Подробная характеристика пациентов, включенных в исследование, от-  
ражена в табл. 1.

Во всех случаях ЕК-клетки получали от гаплоидентичного донора.  
Оптимальным является ЕК-аллореактивный донор. Определение ал-  
лореактивности ЕК-клеток проводили согласно Missing self модели:  
донорские ЕК-клетки считали аллореактивными, если отсутствовали  
соответствующие лиганды на клетках реципиента при наличии ингиби-  
торных KIR на донорских ЕК-клетках [12]. Для процедуры выбора донора  
по критерию ЕК-аллореактивности анализировали результаты типиро-  
вания HLA по I классу для донора и реципиента, а также определяли экс-  
прессию KIR-рецепторов на ЕК-клетках донора методами полимеразной

Таблица1  
Характеристика пациентов, получивших терапию ЕК-клетками

	№	Возрас т, годы	Пол	Диагноз	Цитогенетическое, молекулярно-генетическое исследование
Группа 1	P1	3	Муж.	ОМЛ М4	46,XY,del(9)(q11q21)inc[8]; NRAS NM_002524:c.289G>A
	P2	4	Муж.	ОМЛ М4	46, XY [20]
	P3	7	Муж.	ОМЛ М5	46, XY, -13, +mar, inc[4]/ 46,XY[11]
	P4	12	Жен.	ОМЛ М2	46,XX [1];RPN1-EVI1 положительный
	P5	13	Муж.	ОМЛ М2	46, XY, del(9)(q13q22)[6]/ 46, XY[1]
	P6	15	Муж.	ОМЛ М2	46,XY,?del(13)(p11)[5]/46,XY[25]
Группа 2	P7	19	Жен.	Лимфома Ходжкина, первично- рефрак- терное течение	НД
	P8	7	Муж.	Лейкоз Беркитта, молекулярн. рецидив	46,XY, trp(1)(q25q32),t(8;14)(q24.1;q32),add(15)(p11) [6]/ 46,XY,t(8;14)(q24.1;q32)[1]/46,XY[1].
	P9	2	Жен.	ОЛЛ рец2	46,XX,t(4;11)(q21.3;q23),der(10)t(1;10)(q21;q25)[5]/ 46,XX,idem,inc[2]/ 46,XX,t(4;11)(q21.3;q23),der(14)t(1;14)(q23;p 11)[3]/ 46,XY,del(13)(p11)[5] "Hematol ogy, Transfusiology, Eastern Europe", 2019, volume 5, № 4
	P10	4	Муж.	ОМЛ М2	45,X, - Y,t(8;21)(q22;q22)[12]/46,XY,t(8;21)(q22;q22)[3]



цепной реакции и проточной цитофлуориметрии (согласно инструкции  
МЗ Республики Беларусь «Метод подбора ЕК-аллореактивного донора  
для проведения гаплоидентичных трансплантаций гемопоэтических  
стволовых клеток» № 174-1110 от 16.03.2011).

Получение ЕК-клеток

Для первой группы пациентов для получения ЕК-клеток исполь-  
зовали иммуномагнитный метод. Селекция ЕК-клеток проводилась из  
клеточного продукта лимфофереза в один или два этапа. Первый этап -  
деплеция Т-клеток, второй - селекция ЕК-клеток с помощью коммер-  
ческих наборов фирмы Miltenyi Biotec на аппарате Clinimacs (Miltenyi  
Biotec, Германия).

Для второй группы ЕК-клетки получали с использованием получен-  
ной нами ранее генетически модифицированной линии К-562, экспрес-  
сирующей молекулы 4-1BBL и рекомбинантный мембранно-связанный  
интерлейкин-21 (К-562-4-1BBL+МИЛ-21) по методике, предложенной  
С. J. Denman с соавт. [13]. Так, экспансию и активацию ЕК-клеток осущест-  
вляли путем культивирования мононуклеарных клеток перифериче-  
ской крови доноров в присутствии облученных при 100 Гр фидерных  
клеток К-562-4-1BBL+МИЛ-21 и интерлейкина-2 в дозе 50 или 100 МЕ/мл  
в полной среде RPMI-1640. Стимуляцию мононуклеарных клеток с ис-  
пользованием фидерных клеток проводили на 0-й и 7-й день. Медиана  
продолжительности экспансии составила 21 день (15-30 дней). Крите-  
риями качества клеточного продукта были: процентное содержание  
ЕК- (CD3-CD56+) и Т- (CD3+) клеток, отсутствие химерного транскрипта  
BCR-ABL, характерного для фидерных клеток, роста уровня экспрессии  
генов с-Мус и hTERT и отсутствие бактериальной контаминации. Акти-  
вацию ЕК-клеток определяли по поверхностной экспрессии антигенов  
CD69, NKp44 и уровню прямой цитотоксической активности против не-  
модифицированной линии К-562.

Определение химеризма. Анализ химеризма проводился методом  
InDel -ПЦР. Использовали панель праймеров, предложенную М. Alizadeh  
et al. [14], разработанную на основе биаллельных коротких InDel поли-  
морфизмов. Первоначально донора и реципиента генотипировали по  
20 аллель-специфическим маркерам. Аллели считали информативны-  
ми, если они были позитивными для реципиента и негативными для  
донора, или наоборот. Аллели считали позитивными, если значение Ct  
было в пределах 20-26, и негативными, если отсутствовала амплифика-  
ция. Постановка реакции осуществлялась в триплетах для контрольно-  
го гена ALB и информативных аллелей реципиента.

Для оценки безопасности и токсичности иммунотерапии ЕК-  
клетками была проведена оценка числа перелитых трансфузионных  
сред (эритроцитарной массы, тромбоконцентрата), а также нежела-  
тельных явлений, наблюдавшихся во время лечения. Нежелательные  
явления оценивали по шкале токсичности СТСАЕ (Common Terminology  
Criteria for Adverse Events) версия 4.0. Результаты лечения для пациентов  
определены на 01.11.2019 г.

Для математической обработки и статистического анализа данных  
использовали программы Microsoft Excel и Statistica 6.0. Результаты  
представлены в виде средних значений ± SEM (стандартная ошибка



среднего значения). Оценку достоверности различий между независимыми группами проводили с помощью U-теста Манна - Уитни. Для сравнения двух величин, выраженных в процентах, использовали  $\chi^2$  тест, для парных сравнений применяли Sign тест. Результаты считали достоверными при  $p \leq 0,05$ .

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

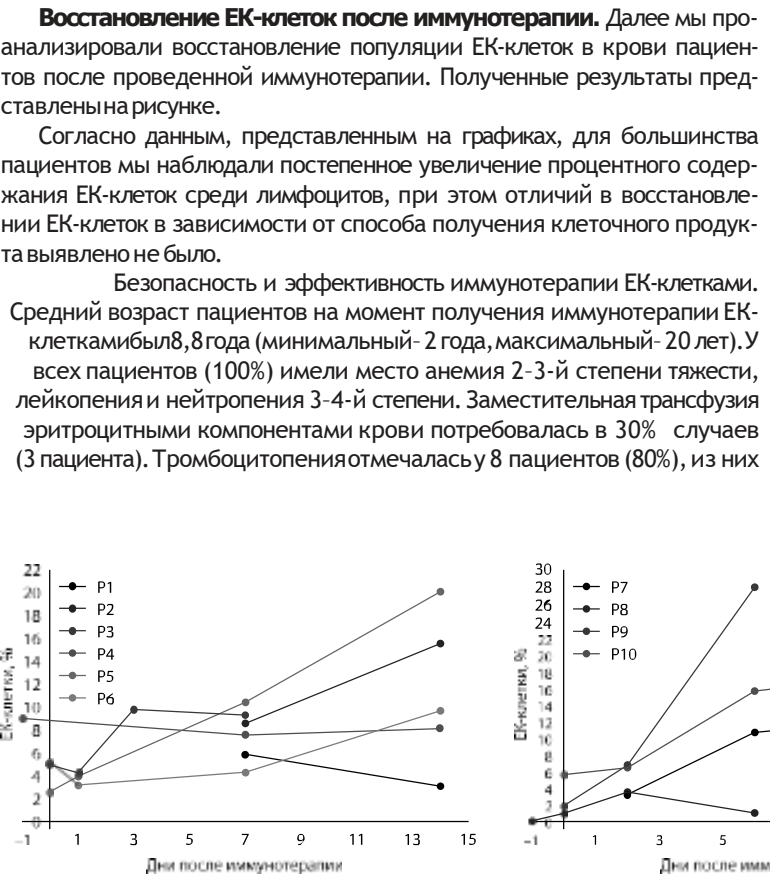
**Характеристика клеточного продукта.** Для проведения иммунотерапии ЕК-клетки получали двумя различными способами: методом иммуномагнитной селекции с помощью коммерческих наборов (группа 1) и методом экспансии (группа 2), где в качестве стимуляторов использовались полученные нами ранее клетки фидерной клеточной линии K-562-4-1BBL+МИЛ-21 [15]. Общая характеристика клеточного продукта, используемого для проведения иммунотерапии, представлена в табл. 2. Согласно представленным в табл. 2 данным видно, что использование двух технологий получения ЕК-клеток позволяет получить клеточный продукт с высокой степенью очистки (содержание ЕК-клеток в

Таблица 2  
Характеристика клеточного продукта для двух групп пациентов

Пациенты		Процедура	Донор	Аллореак- тивность	Чистота ЕК-клеток, %	Доза ЕК-клеток ×10 <sup>6</sup> /kg	Доза Т-клеток ×10 <sup>6</sup> /kg	Химериз- м на +2- й день, %
Группа 1	P1	CD3 депле- ция CD56 селек- ция	Мать	Нет	92,4	18,6	0,44	НД
	P2	CD3 депле- ция CD56 селек- ция	Отец	Есть, C2-	91	20	1,6	НД
	P3	CD3 депле- ция CD56 селек- ция	Мать	Есть, C2- \Bw4-	83,9	4,5	0,75	0
	P4	CD56 селек- ция	Мать	Есть, C2-	55	4,2	36	0
	P5	CD3 депле- ция CD56 селек- ция	Отец	Есть, C2- \Bw4-	95,5	24	1	0
	P6	CD56 селек- ция	Отец	Есть, C2-	71	27,5	93	16,2
Среднее ± SEM					81,5±6,3	16,5±4,0	22,1±15,2	
Примеч- а	P7	Экспансия	Мать	Есть, C2-	96,7	20,0	6,0	0,11
	P8	Экспансия	Мать	Есть, C2-	96,8	68,8	20,0	1,45
	P9	Экспансия	Отец	Нет	96,0	45,8	15,3	НД
	P10	Экспансия	Отец	Нет	98,5	73,9	8,25	0,33
Среднее ± SEM					97,0±0,5	52,1±12,3	1,24±0,2	
Среднее ± SEM					"Hematology and Transfusiol	gy, 2019, 14(4), volume 5, № 4		



трансплантате более 80%). Однако при сравнении двух групп видно, что использование технологии экспансии позволило получить клеточный продукт с достоверно ( $p=0,009$ ) более высоким содержанием ЕК-клеток, чем при использовании иммуномагнитной селекции. В данном случае это можно объяснить использованием в двух случаях (P4 и P6) одноступенчатой процедуры очистки ЕК-клеток (только CD56 селекция без CD3 деплеции). Также при использовании технологии экспансии удалось достичь в среднем в три раза большей дозы ЕК-клеток ( $p=0,038$ ), чем при использовании иммуномагнитной технологии. Поскольку для получения ЕК-трансплантата использовались клетки от гаплоидентичного донора, низкое содержание Т-клеток в трансплантате являлось важным для предотвращения развития РТПХ. В литературе описаны единичные случаи острой РТПХ при использовании экспансированных аллогенных ЕК-клеток после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток [16]. При сравнении полученной дозы Т-клеток в двух группах пациентов с различными способами получения ЕК-клеток достоверных различий выявлено не было ( $p=0,47$ ).



Восстановление популяции ЕК-клеток в периферической крови после проведенной иммунотерапии

Таблица3  
Частотаразвития нежелательных явлений после проведения курса иммунотерапии ЕК-клетками

Показатели	Группа 1		Группа 2		Р
	N	%	n	%	
Всего пациентов	6	100	4	100	
Анемия 1-й и 2-й степени	3	50	1	25	ns
Анемия 3-й степени	3	50	3	75	ns
Лейкопения 3-й степени	1	16,6	0	0	ns
Лейкопения 4-й степени	5	83,3	4	100	ns
Нейтропения 3-й степени	2	33,3	0	0	ns
Нейтропения 4-й степени	4	66,6	4	100	ns
Тромбоцитопения 1-й и 2-й степени	3	50	0	0	ns
Тромбоцитопения 3-й и 4-й степени	2	33,3	3	75	ns
Фебрильная нейтропения	2	33,3	1	25	ns
Диарея 1-й и 2-й степени	1	16,6	0	0	ns
Мукозит 2-4-й степени	0	0	0	0	ns
Повышение печеночных ферментов 1-й и 2-й степени	3	50	2	50	ns
Повышение печеночных ферментов 3-й степени	0	0	0	0	ns
Повышение билирубина 2-й степени	0	0	0	0	ns

Примечание: ns - нет достоверности.

у 3 (37,5%) требовалась заместительная трансфузия тромбоконцентра- том. Фебрильная нейтропения имела место у 3 пациентов (30%). Ни в одном из наблюдений не было зафиксировано явлений мукозита, повы- шения уровня общего билирубина и повышения печеночных фермен- тов (выше 2-й степени). РТПХ не была отмечена ни у одного пациента. При сравнении вышеперечисленных явлений для двух групп пациентов статистическидостоверной разницы не выявлено(табл. 3).

Одним из критериев оценки эффективности ЕК-клеточной терапии стал уровень минимальной остаточной болезни. Нами выявлено до- стоверное снижение уровня МОБ после проведения иммунотерапии ЕК-клетками (p=0,02), для 7 из 9 пациентов уровень МОБ остается отри- цательнымпосле трансфузииЕК-клеток (табл.4).

Таблица4  
Показатели уровня минимальной остаточной болезни (МОБ) до и после проведения иммунотерапии ЕК-клетками

Пациент	МОБ перед трансфузией ЕК- клеток	Уровень МОБ по восстановлениюгемопозза
P1	8%	Менее 0,1%
P2	1,9%	Менее 0,1%
P3	0,9%	Менее 0,1%
P4	0,5%	Менее 0,01%
P5	Менее 0,1%	0,01%
P6	0,43%	Менее 0,1%
P7	НД	НД
P8	Отрицательный	Отрицательный
P9	НД	Менее 0,01%
P10	3×10 <sup>-5</sup>	Отрицательный



Таблица5  
Результаты леченияпациентов, включенных в исследование

Параметр	Группа 1	Группа 2	Р
Всего	N=6	N=4	
Смерть в индукции	0	0	ns
Без ответа	0	0	ns
Смерть в ремиссии	0	1 (25%)	ns
Вторая опухоль	1 (16,7%)	0	ns
Рецидив	1 (16,7%)	0	ns
ППР	4 (66,6%)	3 (75%)	ns

Результаты лечения для пациентов определены на 01.11.2019 г. Медиана наблюдения составила 2,67 года при максимальном сроке наблюдения 5,4 года. Среди исследуемых пациентов 7 (70%) живы и находятся в ремиссии (табл. 5).

У пациента P1 через 77 дней от момента трансфузии ЕК-клеток была диагностирована вторая опухоль, которая проявила резистентность к специальному лечению. Пациент умер без выхода в ремиссию. У пациента P5 был констатирован рецидив основного заболевания через 245 дней после иммунотерапии ЕК-клетками. Пациент умер после проведения ПХТ без выхода в ремиссию от инфекционных осложнений. У пациента P7 на момент введения ЕК-клеток имел место 4-й рецидив основного заболевания. После проведения иммунотерапии ЕК-клетками и последующей ПХТ была выполнена гапло-ТГСК. Пациент умерв ремиссииот инфекционныхосложнений.

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Можно предположить, что полученные нами данные свидетельству- ют о значительной роли ЕК-клеток в иммунотерапии гемобластозов у детей, особенновлечении ОМЛ. Ихиспользованиепродемонстрировало хорошую переносимость и безопасность. Выявлено достоверно значимое снижение минимальной остаточной болезни при ОМЛ после инфузии ЕК-клеток, что свидетельствует об их антилейкемической активности. Показано преимущество метода экспансии на фидерных клеточных линиях в отношении получения более высокой дозы ЕК клеток по сравнению с методом иммуномагнитной селекции. Для изучения влияния иммунотерапии ЕК-клетками на показатели долгосрочной выживаемоститребуетсяпродолжениеисследования.

■ ЛИТЕРАТУРА

1. Tsukimoto I.,TawaA.,Horibe K. (2009) Risk-stratified therapy and the intensive use of cytarabine improves the outcome in childhood acute myeloid leukemia: the AML99 trial from the Japanese Childhood AML Cooperative Study Group. *JCO*, no 27, pp. 4007-4013.
2. Rubnitz J.E.,Inaba H., Dahl G. (2010) Minimal residual disease-directed therapy for childhood acute myeloid leukaemia: results of the AML02 multicentre trial. *Lancet Oncol.*, no 11, pp.543-552.

3. Abrahamsson J., Forestier E., Heldrup J. (2011) Response-guided induction therapy in pediatric acutemyeloid leukemia with excellent remission rate. *JCO*, no 29, pp. 310-315.
4. Gibson B.E., Webb D.K., Howman A.J., De Graaf S.S., Harrison C.J., Wheatley K. (2011) United Kingdom Childhood Leukaemia Working Group and the Dutch Childhood Oncology Group. Results of a randomized trial in children with acute myeloid leukaemia: Medical Research Council AML12 trial. *Br J Haematol*, no 155, pp. 366-376.
5. Creutzig U., van den Heuvel-Eibrink M.M., Gibson B. (2012) AML Committee of the International BFM Study Group. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in children and adolescents: recommendations from an international expert panel. *Blood*, no 120, pp. 3187-3205.
6. Canner J., Alonzo T.A., Franklin J. (2013) Differences in outcomes of newly diagnosed acute myeloid leukemia for adolescent/young adult and younger patients: a report from the children's oncology group. *Cancer*, no 119, pp. 4162-4169.
7. Marcela V. Maus, Stephan A. Grupp, David L. Porter, Carl H. June (2014) Antibody-modified T cells: CARs take the front seat for hematologic malignancies. *Blood*, no 123, pp. 2625-2634.
8. Colucci F., Caligiuri M.A., Di Santo J.P. (2003) What does it take to make a natural killer? *Nat Rev Immunol*, no 3 (5), pp. 413-425.
9. Sullivan E.M., Jeha S., Kang G., Cheng C., Rooney B., Holladay M., Bari R., Schell S., Tuggle M., Pui C.H. (2014) NK cell genotype and phenotype at diagnosis of acute lymphoblastic leukemia correlate with postinduction residual disease. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.*, no 20, pp. 5986-5994.
10. Gams A.S., Alonzo T.A., Meshinchi S. (2014) Gemtuzumab ozogamicin in children and adolescents with de novo acute myeloid leukemia improves event-free survival by reducing relapse risk: results from the randomized phase III Children's oncology group trial AAML0531. *J Clin Oncol.*, no 32 (27), pp. 3021-32.
11. Ruggeri L. (2002) Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science*, no 295 (5562), pp. 2097-2100.
12. Leung W. (2011) Use of NK activity in cure by transplant. *Br J Haematology*, vol. 155, no 1, pp. 14-29.
13. Denman C.J., Senyukov V.V., Somanchi S.S. (2012) Membrane-bound IL-21 promotes sustained ex vivo proliferation of human natural killer cells. *PLoS One*, 7 (1): e30264. doi: 10.1371/journal.pone.0030264
14. Alizadeh M. (2002) Quantitative assessment of hematopoietic chimerism after bone marrow transplantation by real-time quantitative polymerase chain reaction. *Blood*, vol. 99, iss. 12, pp. 4618-4625.
15. Vashkevich E., Migas A., Matveenko M., Shman T., Meleshko A. (2018) The use of genetically modified feeder cell lines for the expansion of natural killer cells. *Russian Journal of Pediatric Hematology and Oncology*. Special edition, p. 115.
16. Shah N.N., Baird K., Delbrook C.P., Fleisher T.A., Kohler M.E., Rampertaap S., Lemberg K., Hurley C.K., Kleiner D.E., Merchant M.S., Pittaluga S., Sabatino M., Stroncek D.F., Wayne A.S., Zhang H., Fry T.J., Mackall C.L. (2015) Acute GVHD in patients receiving IL-15/4-1BBL activated NK cells following T-cell-depleted stem cell transplantation. *Blood*, no 125 (5), pp. 784-792.

Поступила/Received: 12.11.2019  
 Контакты/Contacts: [druglova@mail.ru](mailto:druglova@mail.ru)

УДК 616.61-089.843:612.112.94

Зыблева С.В., Зыблев С.Л.

Республиканский научно-практический центр радиационной медицины экологии человека, Гомель, Беларусь

Zybleva S., Zyblev S.

Republican Research and Practical Center of Radiation Medicine and Human Ecology, Gomel, Belarus

## Показатели CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> Т-лимфоцитов у пациентов с ранней дисфункцией почечного трансплантата

Indices CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> of T-lymphocytes in Patients with Early Allograft Dysfunction

### Резюме

**Цель.** Изучить показатели CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> даблнегативных Т-лимфоцитов у пациентов после пересадки почки с ранней дисфункцией почечного трансплантата.

**Материалы и методы.** Обследовано 199 реципиентов почечного трансплантата с терминальной стадией хронической болезни почек, которым выполнена трансплантация почки. Определяли уровень CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> даблнегативных Т-лимфоцитов, концентрацию креатинина, мочевины, цистатина С и В2-микроглобулина перед операцией, на 1-е, 3-и и 7-е сутки после трансплантации почки. Всех пациентов разделили на две группы: с первичной функцией трансплантата (ПФТ) и дисфункцией трансплантата (ДФТ) и изучили динамику Т-лимфоцитов, креатинина, мочевины, цистатина С и В2-микроглобулина в этих группах. Провели корреляционный анализ между значениями субпопуляций CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> даблнегативных Т-лимфоцитов и показателями биомаркеров функции почечного трансплантата у всех пациентов.

**Результаты и обсуждение.** По результатам исследования перед операцией у реципиентов группы ДФТ и ПФТ различий по уровню CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> Т-лимфоцитов не выявлено. Через 24 часа после трансплантации почки и до 7-х суток послеоперационного периода отмечен значимый рост данной субпопуляции Т-лимфоцитов в группе реципиентов ДФТ. С 3-х суток выявлены положительные корреляционные связи между CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> даблнегативными Т-лимфоцитами и уровнем креатинина, мочевины, цистатина С и В2-микроглобулина.

**Выводы.** Ранняя дисфункция почечного трансплантата характеризуется повышением уровня субпопуляций CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> даблнегативных Т-лимфоцитов. Измерение содержания данной субпопуляции Т-лимфоцитов может быть использовано в качестве дополнительного лабораторного признака нарушения функционирования почечного трансплантата.

**Ключевые слова:** CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> даблнегативные Т-лимфоциты, дисфункция трансплантата почки, цистатин С, В2-микроглобулин.

### Abstract

**Purpose.** To study the indices CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> of double negative T-lymphocytes in patients after kidney transplantation with early allograft dysfunction.

«Гематология. Трансфузиология. Восточная Европа», 2019, том 5, № 4