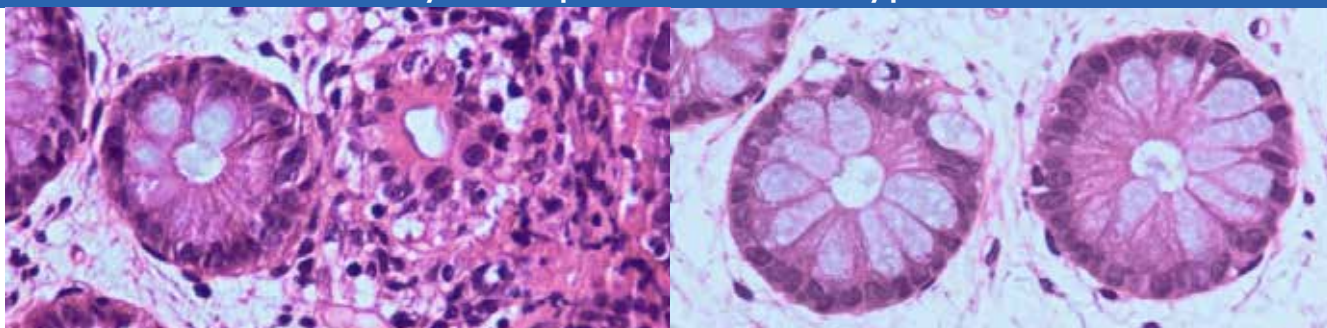


Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии

№ 2 | 23 | 2024

научно-практический журнал



Слизистая оболочка толстой кишки пациента с реакцией «трансплантат против хозяина». Из статьи Т.С. Шубиной и соавт., с. 90

14

Опыт аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток у детей с химиорезистентным острым миелоидным лейкозом

Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation outcomes in pediatric patients with refractory acute myeloid leukemia

26

Результаты трансплантации гемопоэтических стволовых клеток при различных первичных иммунодефицитах с гемофагоцитарным лимфогистиоцитозом

The results of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in primary immunodeficiencies with hemophagocytic lymphohistiocytosis

34

Сравнительный анализ применения *ex vivo* и *in vivo* деплеции лимфоцитов для трансплантации гемопоэтических стволовых клеток у детей со злокачественными заболеваниями системы крови

A comparison of *ex vivo* and *in vivo* T-cell depletion for hematopoietic stem cell transplantation in children with malignant blood disorders

48

Опыт изготовления гаплоидентичного клеточного продукта, обогащенного Т-регуляторными лимфоцитами

Experience in manufacturing a haploidentical biomedical cell product enriched with regulatory T-lymphocytes



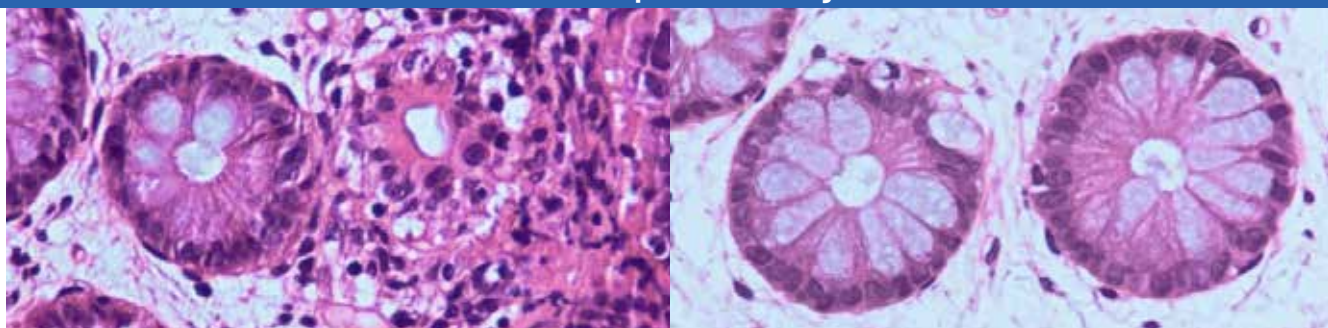
НАУКА —
ДЕТЯМ



Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology

№ 2 | 23 | 2024

scientific and practical journal



Colonic mucosa of a patient with graft-versus-host disease. From the article by T.S. Shubina et al., p. 90

14

Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation outcomes in pediatric patients with refractory acute myeloid leukemia

26

The results of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in primary immunodeficiencies with hemophagocytic lymphohistiocytosis

34

A comparison of *ex vivo* and *in vivo* T-cell depletion for hematopoietic stem cell transplantation in children with malignant blood disorders

48

Experience in manufacturing a haploidentical biomedical cell product enriched with regulatory T-lymphocytes



НАУКА —
ДЕТЯМ



A peer-reviewed open-access journal, is published 4 times a year by the Science for Children Foundation for Support and Development in Pediatric Hematology, Oncology and Immunology and Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology. Printed in the Russian Federation. The electronic version of the journal is available online at www.hemoncim.com

Information for Subscribers

Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology is published 4 times a year. You may subscribe to *Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology* using a subscription catalogue "Newspapers. Magazines" of Rospechat Agency, subscription index – 12914.

Subject area and/or specialty

An educational medium. An informational research and clinical medical journal featuring original research articles, literature reviews, lectures on relevant topics of pediatric hematology, oncology and immunopathology, and advertisements published in accordance with the Advertising Law of the Russian Federation.

Manuscript Submissions

Please submit your manuscript at http://www.hemoncim.com/authors_en.html. More information on manuscript submission is available at http://www.hemoncim.com/authors_en.html in corresponding sections.

Advertising

To place an advertisement or receive additional information, please contact us via e-mail: 9982222@gmail.com

Commercial Reprints

For commercial reprints, please contact us via e-mail: 9982222@gmail.com

Disclaimer

The Publisher and the Editors cannot be held responsible for errors or any consequences arising from the use of information contained in this journal. The ideas and opinions expressed do not necessarily reflect those of the Publisher and the Editors, neither does the publication of advertisements constitute any endorsement by the Publisher and Editors of the products advertised.

Indexing

The journal is indexed by *Scopus*, *Ulrich's Periodicals Directory* and *Russian Science Citation Index*.

Copyright

Copyright © 2024 by «Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology» («D. Rogachev NMRCPOI»). All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored, translated, or transmitted in any form or by any means without the prior permission in writing from the copyright holder.

Address for correspondence

Editorial office of *Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology*: 17 Vereyskaya St., Room 311–1, Moscow 121357, Russia

For further information on rights and permissions, please contact us via e-mail: 9982222@gmail.com

Рецензируемый журнал с открытым доступом, издается 4 раза в год фондом поддержки и развития в области детской гематологии, онкологии и иммунологии «Наука – детям» и федеральным государственным бюджетным учреждением «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Журнал печатается в Российской Федерации. Электронная версия журнала доступна на сайте: www.hemoncim.com

Информация для подписчиков

Журнал «Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии» выходит 4 раза в год. Вы можете подписаться на журнал «Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии» по каталогу «Газеты. Журналы» агентства «Роспечать», подписной индекс – 12914.

Примерная тематика и (или) специализация

Образовательное СМИ. Информационный научно-практический медицинский журнал, публикующий оригинальные исследования, обзоры литературы, лекции, посвященные актуальным вопросам детской гематологии, онкологии и иммунопатологии, рекламу в соответствии с законодательством Российской Федерации о рекламе.

Подача рукописей

Прислать рукопись можно по ссылке: http://www.hemoncim.com/authors_en.html. Ознакомиться с правилами подачи рукописей можно в соответствующих разделах на сайте: http://www.hemoncim.com/authors_en.html

Размещение рекламных материалов

По вопросам размещения рекламы обращайтесь в редакцию. E-mail: 9982222@gmail.com

Репринт

По вопросам репринта обращайтесь в редакцию. E-mail: 9982222@gmail.com

Дисклеймер

Издатель и редакция не несут ответственности за ошибки или последствия использования информации, публикуемой в данном журнале. Идеи и мнения автора могут не совпадать с точкой зрения издателя и редакции. Издатель и редакция не несут ответственности за содержание и качество размещенных в журнале рекламных материалов.

Индексирование

Журнал индексируется в *Scopus*, *Ulrich's Periodicals Directory* и *Российском индексе научного цитирования*.

Авторское право

© 2024 Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России). Все авторские права сохранены. Запрещается полная или частичная репродукция, хранение, перевод или передача опубликованных материалов в любом виде или любыми средствами без письменного разрешения владельца авторских прав.

Адрес для корреспонденции

Редакция журнала «Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии»: Россия, 121357, Москва, ул. Верейская, 17, пом. 311, комната 1

Для получения более подробной информации, касающейся авторских прав и разрешений, просим связаться с нами по электронной почте: 9982222@gmail.com

Founders

D. Rogachev NMRCPOI,
Science for Children Foundation for Support and Development in Pediatric Hematology, Oncology and Immunology.

Editorial office

Editor-in-Chief – G.A. Novichkova
Address: 17 Vereyskaya St., Room 311–1, Moscow 121357
Tel.: +7 (495) 287-65-70, ext. 5546
www.hemoncim.com
E-mail: journal@fnkc.ru
Advertising department: +7 (495) 211-04-82

The Journal is registered in the Federal Service for Supervision of Communications, Information Technology, and Mass Media.
Registration number is ПИ № ФС77–85163 on 27.04.2023.
The journal was founded in 2002.
It is published in Russian and English.
Distribution area: the Russian Federation, foreign countries.

Publisher

LLC «Science and education».
Address: 28 Podsosenskiy Lane, Bldg. 1, Moscow 101000

Printing office

LLC «Genius-Print».
Address: 3 Bldg. 19, Amurskaya St. Room 1, Moscow 107497

Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology. 2024
Vol. 23. No.2. Date of publication 27.06.2024
The circulation is 3000 copies. The price is free.

Учредители

ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России,
фонд поддержки и развития в области детской гематологии, онкологии и иммунологии «Наука – детям».

Редакция журнала

Главный редактор – Г.А. Новичкова
Адрес: 121357, Москва, ул. Верейская, 17, пом. 311, комната 1
Тел.: +7 (495) 287-65-70, доб. 5546
www.hemoncim.com
E-mail: journal@fnkc.ru
По вопросам рекламы: +7 (495) 211-04-82

Журнал зарегистрирован в Федеральной службе по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций.
Регистрационный номер ПИ № ФС77–85163 от 27.04.2023.
Журнал основан в 2002 году.
Языки издания: русский, английский.
Территория распространения: Российская Федерация, зарубежные страны.

Издатель

ООО «Наука и образование».
Адрес: 101000, Москва, Подсосенский пер., 28, стр. 1

Типография

ООО «Джениус-принт».
Адрес: 107497, Москва, ул. Амурская, 3, стр. 19, помещение 1

Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. 2024.
Том 23. №2. Дата выхода 27.06.2024
Тираж 3000 экз. Цена свободная.



Главный редактор

Новичкова Галина Анатольевна
доктор медицинских наук, профессор, Москва, Россия

Заместители главного редактора

Масчан Алексей Александрович
доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, Москва, Россия

Румянцев Александр Григорьевич
доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, Москва, Россия

Ответственный секретарь

Сметанина Наталия Сергеевна
доктор медицинских наук, профессор, Москва, Россия

Члены редколлегии

Алейникова Ольга Витальевна
доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент НАН,
Минск, Республика Беларусь

Балашов Дмитрий Николаевич
доктор медицинских наук, профессор, Москва, Россия

Белогурова Маргарита Борисовна
доктор медицинских наук, профессор, Санкт-Петербург, Россия

Варфоломеева Светлана Рафаэлевна
доктор медицинских наук, профессор, Москва, Россия

Володин Николай Николаевич
доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, Москва,
Россия

Демихов Валерий Григорьевич
доктор медицинских наук, профессор, Рязань, Россия

Кит Олег Иванович
доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН,
Ростов-на-Дону, Россия

Кулагин Александр Дмитриевич
доктор медицинских наук, профессор, Санкт-Петербург, Россия

Масчан Михаил Александрович
доктор медицинских наук, профессор, Москва, Россия

Минков Милен
доктор медицинских наук, профессор, Вена, Австрия

Пантелеев Михаил Александрович
доктор физико-математических наук, Москва, Россия

Паровичникова Елена Николаевна
доктор медицинских наук, профессор, Москва, Россия

Птушкин Вадим Вадимович
доктор медицинских наук, профессор, Москва, Россия

Решетов Игорь Владимирович
доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, Москва,
Россия

Трахтман Павел Евгеньевич
доктор медицинских наук, профессор, Москва, Россия

Цаур Григорий Анатольевич
доктор медицинских наук, Екатеринбург, Россия

Щербина Анна Юрьевна
доктор медицинских наук, профессор, Москва, Россия

Редакционный совет

Алексеева Е.И.
доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН,
Москва, Россия

Атауллаханов Ф.И.
доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН,
Москва, Россия

Вельте К.
профессор, Тюбинген, Германия

Виллих Н.
профессор, Мюнстер, Германия

Грачев Н.С.
доктор медицинских наук, Москва, Россия

Карачунский А.И.
доктор медицинских наук, профессор, Москва, Россия

Крыжановский О.И.
кандидат медицинских наук, Сан-Франциско, США

Липтон Дж.
профессор, Нью-Йорк, США

Мякова Н.В.
доктор медицинских наук, профессор, Москва, Россия

Накагавара А.
профессор, Чиба, Япония

Окс Г.
профессор, Сиэтл, США

Родригес-Галиндо К.
профессор, Мемфис, США

Самочатова Е.В.
доктор медицинских наук, профессор, Москва, Россия

Скокова Ю.В.
доктор медицинских наук, Тюбинген, Германия

Тер-Ованесов М.Д.
доктор медицинских наук, профессор, Москва, Россия

Фечина Л.Г.
кандидат медицинских наук, Екатеринбург, Россия

Чернов В.М.
доктор медицинских наук, профессор, Москва, Россия

Хамин И.Г.
кандидат медицинских наук, Москва, Россия

Хармс Д.
профессор, Киль, Германия

Хенце Г.
профессор, Берлин, Германия



Editor-in-Chief

Galina A. Novichkova
MD, DSc, Professor, Moscow, Russian Federation

Deputy Editors-in-Chief

Alexey A. Maschan
MD, DSc, Professor, Corresponding Member of the RAS, Moscow, Russian Federation

Alexander G. Rumyantsev
MD, DSc, Professor, Academician of the RAS, Moscow, Russian Federation

Executive Secretary

Nataliya S. Smetanina
MD, PhD, DSc, Professor, Moscow, Russian Federation

Members of the Editorial Board

Olga V. Aleynikova
MD, Corresponding Member of the NAS, Minsk, Republic of Belarus

Dmitry N. Balashov
MD, DSc, Professor, Moscow, Russian Federation

Margarita B. Belogurova
MD, DSc, Professor, Saint Petersburg, Russian Federation

Svetlana R. Varfolomeeva
MD, DSc, Professor, Moscow, Russian Federation

Nikolay N. Volodin
MD, DSc, Professor, Academician of the RAS, Moscow, Russian Federation

Valeriy G. Demikhov
MD, DSc, Professor, Ryazan, Russian Federation

Oleg I. Kit
MD, DSc, Professor, Corresponding Member of the RAS, Rostov-on-Don, Russian Federation

Alexander D. Kulagin
MD, DSc, Professor, Saint Petersburg, Russian Federation

Mikhail A. Maschan
MD, DSc, Professor, Moscow, Russian Federation

Mylen Minkov
MD, DSc, Professor, Vienna, Austria

Mikhail A. Panteleev
PhD, DSc, Moscow, Russian Federation

Elene N. Parovichnikova
MD, DSc, Professor, Moscow, Russian Federation

Vadim V. Ptushkin
MD, DSc, Professor, Moscow, Russian Federation

Igor V. Reshetov
MD, DSc, Professor, Academician of the RAS, Moscow, Russian Federation

Pavel E. Trakhtman
MD, DSc, Professor, Moscow, Russian Federation

Grigory A. Tzaur
MD, PhD, DSc, Ekaterinburg, Russian Federation

Anna Yu. Shcherbina
MD, PhD, DSc, Professor, Moscow, Russian Federation

Advisory Editors

Alekseeva E.I.
MD, DSc, Professor, Corresponding Member of the RAS, Moscow, Russia

Ataullakhanov F.I.
MD, DSc, Professor, Corresponding Member of the RAS, Moscow, Russia

Welte K.
Professor, Tübingen, Germany

Willich N.
Professor, Münster, Germany

Grachev N.S.
MD, DSc, Moscow, Russia

Karachunskiy A.I.
MD, DSc, Professor, Moscow, Russia

Kryzhanovsky O.I.
MD, San Francisco, USA

Lipton J.
Professor, New York, USA

Myakova N.V.
MD, DSc, Professor, Moscow, Russia

Nakagawara A.
Professor, Chiba, Japan

Ochs H.
Professor, Seattle, USA

Rodriguez-Galindo C.
Professor, Memphis, USA

Samochatova E.V.
MD, DSc, Professor, Moscow, Russia

Skokova Yu.V.
MD, DSc, Tübingen, Germany

Ter-Ovanesov M.D.
MD, DSc, Professor, Moscow, Russia

Fechina L.G.
MD, PhD, Yekaterinburg, Russia

Khamin I.G.
MD, Moscow, Russia

Harms D.
Professor, Kiel, Germany

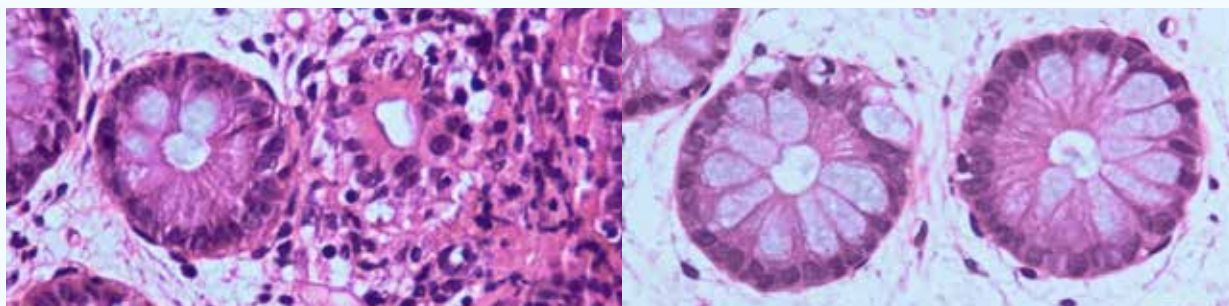
Henze G.
Professor, Berlin, Germany

Chernov V.M.
MD, DSc, Professor, Moscow, Russia

Содержание

© 2024 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, 2024, 23 (2)

Оформление обложки:



Слизистая оболочка толстой кишки пациента с реакцией «трансплантат против хозяина».
Из статьи Т.С. Шубиной и соавт., с. 90

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

- | | |
|---|----|
| <p>Опыт аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток у детей с химиорезистентным острым миелоидным лейкозом</p> <p>М.А. Илюшина, Л.Н. Шелихова, Д.А. Шашелева, М.А. Дунайкина, С.Л. Благов, Е.Е. Курникова, Д.С. Першин, И.И. Калинина, Я.О. Музалевский, А.С. Казаченок, В.В. Бриллиантова, Ю.В. Ольшанская, А.Н. Казакова, Е.А. Зеркаленкова, Д.Д. Байдильдина, Т.Д. Балашов, А.А. Масчан, М.А. Масчан</p> | 14 |
| <p>Результаты трансплантации гемопоэтических стволовых клеток при различных первичных иммунодефицитах с гемофагоцитарным лимфогистиоцитозом</p> <p>А.К. Идармачева, А.Л. Лаберко, Э.Р. Султанова, Л.Н. Шелихова, В.В. Бриллиантова, А.А. Масчан, Д.Н. Балашов, М.А. Масчан</p> | 26 |
| <p>Сравнительный анализ применения <i>ex vivo</i> и <i>in vivo</i> деплеции лимфоцитов для трансплантации гемопоэтических стволовых клеток у детей со злокачественными заболеваниями системы крови</p> <p>А.А. Власова, Л.В. Вахонина, Н.Г. Майшева, Д.Э. Клевакин, Д.Е. Костенко, А.А. Игуменцев, С.В. Боровских, Т.Ю. Вержбицкая, А.И. Пономарев, Ж.В. Пермикин, Г.А. Цаур, Л.Г. Фечина</p> | 34 |
| <p>Высокодозная химиотерапия с аутологичной трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток в лечении рецидивов медуллобластомы у детей</p> <p>А.Е. Сысоев, Л.И. Папуша, Е.А. Сальникова, А.В. Процветкина, А.А. Меришавян, И.Г. Вилесова, Г.В. Терещенко, А.И. Карачунский</p> | 40 |

- Опыт изготовления гаплоидентичного клеточного продукта, обогащенного Т-регуляторными лимфоцитами** 48
В.А. Ведмедская, Д.Е. Першин, М.С. Фадеева, Т.А. Созонова, Е.А. Малахова, Е.А. Кулаковская, О.Б. Лодоева, Э.Я. Мусаева, Я.О. Музалевский, А.С. Казаченок, Д.С. Осипова, Е.А. Бадрин, В.Е. Бельчиков, А.К. Мелькова, Л.Н. Шелихова, Д.Н. Балашов, М.А. Масчан
- Инотузумаб озогамицин в качестве “bridge”-терапии у детей с резистентным и рецидивирующим течением острого В-лимфобластного лейкоза перед аллогенной трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток** 60
О.В. Паина, Л.А. Цветкова, Ж.З. Рахманова, П.В. Кожокар, А.А. Осипова, А.В. Евдокимов, О.С. Епифановская, Т.Л. Гиндина, И.М. Бархатов, Е.В. Семенова, А.Д. Кулагин, Л.С. Зубаровская
- Применение тиотепы в кондиционировании с редуцированной токсичностью перед трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток при первичных иммунодефицитах** 71
Д.Н. Балашов, А.Л. Лаберко, Ю.В. Скворцова, А.П. Васильева, А.К. Идармачева, Э.Р. Султанова, Е.И. Гутовская, Л.Н. Шелихова, М.А. Масчан
- Оценка изменений состава тела у детей после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток с использованием метода разведения дейтерия и рентгеноденситометрии: результаты пилотного исследования** 78
Ю.А. Алымова, А.Ю. Вашура, А.И. Ефимова, С.Г. Руднев, В.М. Сенявин
- Эндоскопические критерии повреждения слизистой оболочки толстой кишки у детей с подозрением на острую реакцию «трансплантат против хозяина» после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток** 90
Т.С. Шубина, Д.Н. Балашов, М.М. Лохматов, И.В. Захаров, Д.С. Абрамов, Д.Г. Ахаладзе
- Опыт использования технологии трансплантации фекальной микробиоты для лечения кишечного синдрома различной этиологии после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток у детей** 98
Г.З. Серегин, Ю.А. Беспярых, А.В. Господарик, М.Ю. Кириллов, Л.В. Огнева, С.В. Жилина, Е.А. Бурцев, А.Е. Буря, И.О. Власова, М.Р. Журавель, Е.А. Журавель, В.В. Константинова, Б.М. Курманов, А.В. Лифшиц, М.В. Натрусова, А.Е. Донников, М.А. Масчан, Г.О. Бронин

Особенности течения новой коронавирусной инфекции у детей после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток

107

А.О. Верещагина, Г.Г. Солопова, Т.А. Быкова, М.О. Попова, Д.Н. Балашов, Н.В. Суворова, Е.В. Розанцева, П.А. Левин, Л.С. Зубаровская, Г.А. Новичкова

Осложнения высокодозной полихимиотерапии с последующей аутологичной трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток у детей с солидными злокачественными новообразованиями: опыт одного Центра

116

Т.З. Алиев, К.И. Киргизов, Е.Б. Мачнева, И.О. Костарева, К.А. Сергеенко, Д.С. Смирнова, Н.А. Бурлака, Ю.В. Лозован, И.Ю. Трушкова, А.Ю. Елфимова, К.В. Митраков, Т.И. Потемкина, М.Д. Малова, Р.Р. Фатхуллин, Н.Г. Степанян, О.А. Капкова, Г.Б. Сагоян, А.М. Сулейманова, Н.В. Матинян, Г.М. Муфтахова, А.П. Казанцев, О.М. Романцова, М.В. Рубанская, Т.Л. Ушакова, А.Д. Родина, В.В. Жогов, В.Ш. Ванесян, Ю.В. Скворцова, И.В. Казанцев, А.С. Слинин, Т.В. Горбунова, Т.Т. Валиев, В.Г. Поляков, С.Р. Варфоломеева

Сравнительная характеристика клеточного состава и функциональных свойств анти-CD19-биомедицинских клеточных продуктов, произведенных с помощью платформ CliniMACS Prodigy и G-Rex

128

Е.А. Малахова, Д.Е. Першин, В.А. Ведмедская, М.С. Фадеева, Е.А. Кулаковская, О.Б. Лодоева, Т.А. Созонова, Э.Я. Мусаева, Я.О. Музалевский, А.С. Казаченок, В.Е. Бельчиков, А.К. Мелькова, Л.Н. Шелихова, О.О. Молостова, Е.А. Бадрин, М.А. Масчан

Анализ морфометрических характеристик тромбоцитов методом электронной просвечивающей микроскопии

140

А.А. Кузнецова, И.И. Киреев, С.И. Обыденный

Метод фильтруемости эритроцитов в диагностике наследственного сфероцитоза

145

Д.С. Прудинник, Л.Д. Колева, Е.А. Бовт, Н.С. Кушнир, А.С. Суворова, И.А. Долгих, С.С. Шахиджанов, В.М. Витвицкий, Ф.И. Атауллаханов, Е.И. Синауридзе, С.А. Плясунова, Н.С. Сметанина

КЛИНИЧЕСКИЕ НАБЛЮДЕНИЯ

Аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток при рецидивах/рефрактерном течении неходжкинских лимфом

152

К.А. Сергеенко, К.И. Киргизов, Е.Б. Мачнева, Н.А. Бурлака, Т.И. Потемкина, К.В. Митраков, А.Ю. Елфимова, Д.С. Смирнова, М.Д. Малова, Ю.В. Лозован, Р.Р. Фатхуллин, Н.Г. Степанян, Т.З. Алиев, И.О. Костарева, Ю.В. Скворцова, А.В. Козлов, Н.А. Батманова, Н.В. Матинян, Т.В. Горбунова, Т.Т. Валиев, С.Р. Варфоломеева, Д.А. Евстратов, А.В. Пшонкин, М.Н. Корсантия, И.В. Фисюн, Д.В. Литвинов, Н.В. Мякова

ШКОЛА ПО ТРАНСПЛАНТАЦИИ И КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ

- Хроническая реакция «трансплантат против хозяина» после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток** 158
Ю.В. Скворцова

ШКОЛА ИММУНОЛОГА – МНЕНИЕ ЭКСПЕРТА

- Опыт проведения аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток у пациента с гипер-IgE-синдромом** 168
А.А. Базаев, С.Н. Козловская, А.П. Васильева, Ю.В. Скворцова, Д.Н. Балашов

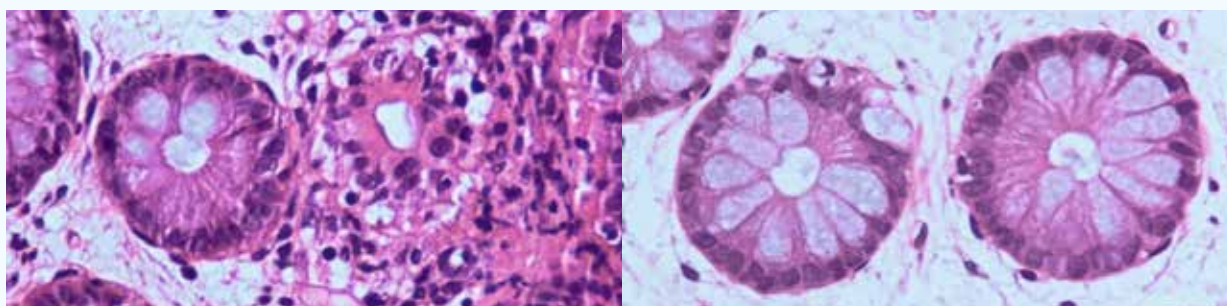
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

- Высокодозная полихимиотерапия с последующей аутологичной трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток в тандемном режиме у детей с нейробластомой группы высокого риска** 174
Д.С. Смирнова
- Экстракорпоральный фотоферез для лечения реакции «трансплантат против хозяина» после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток** 182
И.Б. Кумукова, Е.Е. Курникова, П.Е. Трахтман
- Структура гемостатического агрегата и оценка функциональной активности тромбоцитов методом проточной цитометрии** 192
А.Н. Баландина, А.Д. Купраш, Н.С. Никитин, Т.А. Коваленко, А.А. Игнатова, Ф.И. Атауллаханов, М.А. Пантелеев
- Структурно-функциональные свойства тромбомодулина** 198
Д.А. Блескин, Е.М. Кольцова, Д.Ю. Нечипуренко
- Апластическая анемия у детей: современная концепция дифференциальной диагностики** 208
О.В. Горонкова, А.В. Павлова, Е.В. Райкина
- Внутриклеточная сигнализация при феномене запрограммированной гибели нейтрофилов с появлением внеклеточных ДНК-ловушек при тромбообразовании** 222
А.Н. Свешникова, Е.А. Адаманская, Ю.-Д.Д. Коробкина, М.А. Пантелеев

Content

© 2024 «D. Rogachev NMRCPhOI», 2024, 23 (2)

Cover design:



Colonic mucosal of a patient with graft-versus-host disease.
From the article by T.S. Shubina et al., p. 90

ORIGINAL ARTICLE

Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation outcomes in pediatric patients with refractory acute myeloid leukemia 14

M.A. Ilyushina, L.N. Shelikhova, D.A. Shasheleva, M.A. Dunaykina, S.L. Blagov, E.E. Kurnikova, D.S. Pershin, I.I. Kalinina, Ya.O. Muzalevsky, A.S. Kazachenok, V.V. Brilliantova, Yu.V. Olshanskaya, A.N. Kazakova, E.A. Zerkalnikova, D.D. Baydildina, T.D. Balashov, A.A. Maschan, M.A. Maschan

The results of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in primary immunodeficiencies with hemophagocytic lymphohistiocytosis 26

A.K. Idarmacheva, A.L. Laberko, E.R. Sultanova, L.N. Shelikhova, V.V. Brilliantova, A.A. Maschan, D.N. Balashov, M.A. Maschan

A comparison of *ex vivo* and *in vivo* T-cell depletion for hematopoietic stem cell transplantation in children with malignant blood disorders 34

A.A. Vlasova, L.V. Vakhonina, N.G. Maisheva, D.E. Klevakin, D.E. Kostenko, A.A. Igumenshchev, S.V. Borovskikh, T.Yu. Verzhbitskaya, A.I. Ponomarev, Zh.V. Permikin, G.A. Tsaur, L.G. Fechina

High-dose chemotherapy with autologous hematopoietic stem cell transplantation in the treatment of recurrent medulloblastoma in children 40

A.E. Sysoev, L.I. Papusha, E.A. Salnikova, A.V. Protsvetkina, A.A. Merishavyan, I.G. Vilesova, G.V. Tereshchenko, A.I. Karachunskiy

Experience in manufacturing a haploidentical biomedical cell product enriched with regulatory T-lymphocytes 48

V.A. Vedmedskaya, D.E. Pershin, M.S. Fadeeva, T.A. Sozonova, E.A. Malakhova, E.A. Kulakovskaya, O.B. Lodoeva, E.Ya. Musaeva, Ya.O. Muzalevskii, A.S. Kazachenok, D.S. Osipova, E.A. Badrin, V.E. Belchikov, A.K. Melkova, L.N. Shelikhova, D.N. Balashov, M.A. Maschan

Inotuzumab ozogamicin as a bridging therapy to allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in children with refractory/relapsed B-cell acute lymphoblastic leukemia 60

O.V. Paina, L.A. Tsvetkova, Zh.Z. Rakhmanova, P.V. Kozhokar, A.A. Osipova, A.V. Evdokimov, O.S. Epifanovskaya, T.L. Gindina, I.M. Barkhatov, E.V. Semenova, A.D. Kulagin, L.S. Zubarovskaya

The use of thiotepa in reduced toxicity conditioning regimens before hematopoietic stem cell transplantation in primary immunodeficiencies	71
D.N. Balashov, A.L. Laberko, Yu.V. Skvortsova, A.P. Vasilieva, A.K. Idarmacheva, E.R. Sultanova, E.I. Gutovskaya, L.N. Shelikhova, M.A. Maschan	
Evaluation of body composition changes in children after hematopoietic stem cell transplantation using the deuterium dilution method and double-energy X-ray absorptiometry: results from a pilot study	78
Yu.A. Alymova, A.Yu. Vashura, A.I. Efimova, S.G. Rudnev, V.M. Senyavin	
Endoscopic criteria for colonic mucosal damage in children with suspected acute graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation	90
T.S. Shubina, D.N. Balashov, M.M. Lokhmatov, I.V. Zakharov, D.S. Abramov, D.G. Akhaladze	
Fecal microbiota transplantation for the treatment of intestinal diseases after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in children	98
G.Z. Seregin, Yu.A. Bespyatykh, A.V. Gospodarik, M.Yu. Kirillov, L.V. Ogneva, S.V. Zhilina, E.A. Burtsev, A.E. Burya, I.O. Vlasova, M.R. Zhuravel, E.A. Zhuravel, V.V. Konstantinova, B.M. Kurmanov, A.V. Lifshits, M.V. Natrusova, A.E. Donnikov, M.A. Maschan, G.O. Bronin	
The clinical course of the novel coronavirus disease in children after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation	107
A.O. Vereshchagina, G.G. Solopova, T.A. Bykova, M.O. Popova, D.N. Balashov, N.V. Suvorova, E.V. Rozanceva, P.A. Levin, L.S. Zubarovskaya, G.A. Novichkova	
Complications of high-dose chemotherapy followed by autologous hematopoietic stem cell transplantation in children with solid malignant neoplasms: a single-center experience	116
T.Z. Aliev, K.I. Kirgizov, E.B. Machneva, I.O. Kostareva, K.A. Sergeenko, D.S. Smirnova, N.A. Burlaka, Yu.V. Lozovan, I.Yu. Trushkova, A.Yu. Elfimova, K.V. Mitrakov, T.I. Potemkina, M.D. Malova, R.R. Fatkhullin, N.G. Stepanyan, O.A. Kapkova, G.B. Sagoyan, A.M. Suleymanova, N.V. Matinyan, G.M. Muftakhova, A.P. Kazantsev, O.M. Romantsova, M.V. Rubanskaya, T.L. Ushakova, A.D. Rodina, V.V. Zhogov, V.Sh. Vanesyan, Yu.V. Skvortsova, I.V. Kazantsev, A.S. Slinin, T.V. Gorbunova, T.T. Valiev, V.G. Polyakov, S.R. Varfolomeeva	
Comparative characterization of the cell composition and functional properties of anti-CD19 biomedical cell products manufactured using the CliniMACS Prodigy and G-Rex platforms	128
E.A. Malakhova, D.E. Pershin, V.A. Vedmedskaya, M.S. Fadeeva, E.A. Kulakovskaya, O.B. Lodoeva, T.A. Sozonova, E.Ya. Musaeva, Ya.O. Muzalevsky, A.S. Kazachenok, L.N. Shelikhova, O.O. Molostova, E.A. Badrin, M.A. Maschan	
A morphometric analysis of platelets using transmission electron microscopy	140
A.A. Kuznetsova, I.I. Kireev, S.I. Obydennyi	
Red blood cell filterability measurement in the diagnosis of hereditary spherocytosis	145
D.S. Prudinnik, L.D. Koleva, E.A. Bovt, N.S. Kushnir, A.S. Suvorova, I.A. Dolgikh, S.S. Shakhidjanov, V.M. Vitvitsky, F.I. Ataullakhanov, E.I. Sinauridze, S.A. Plyasunova, N.S. Smetanina	

CLINICAL OBSERVATION**Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for relapsed/refractory non-Hodgkin lymphomas** 152

K.A. Sergeenko, K.I. Kirgizov, E.B. Machneva, N.A. Burlaka, T.I. Potemkina, K.V. Mitrakov, A.Yu. Elfimova, D.S. Smirnova, M.D. Malova, Yu.V. Lozovan, R.R. Fatkhullin, N.G. Stepanyan, T.Z. Aliev, I.O. Kostareva, Yu.V. Skvortsova, A.V. Kozlov, N.A. Batmanova, N.V. Matinyan, T.V. Gorbunova, T.T. Valiev, S.R. Varfolomeeva

SCHOOL ON TRANSPLANTATION AND CELLULAR THERAPY**Chronic graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation** 158

Yu.V. Skvortsova

SCHOOL OF IMMUNOLOGY – EXPERT OPINION**A case of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in a patient with hyper-IgE syndrome** 168

A.A. Bazaev, S.N. Kozlovskaya, A.P. Vasilyeva, Yu.V. Skvortsova, D.N. Balashov

LITERATURE REVIEW**Tandem high-dose multiagent chemotherapy followed by autologous stem cell transplantation in children with high-risk neuroblastoma** 174

D.S. Smirnova

Extracorporeal photopheresis for the treatment of graft-versus-host disease after hematopoietic stem cell transplantation 182

I.B. Kumukova, E.E. Kurnikova, P.E. Trakhtman

The structure of hemostatic aggregate and the assessment of platelet functional activity using flow cytometry 192

A.N. Balandina, A.D. Kuprash, N.S. Nikitin, T.A. Kovalenko, A.A. Ignatova, F.I. Ataulakhanov, M.A. Pantelev

Structural and functional properties of thrombomodulin 198

D.A. Bleskin, E.M. Koltsova, D.Yu. Nechipurenko

Aplastic anemia in children: the current concept of differential diagnosis 208

O.V. Goronkova, A.V. Pavlova, E.V. Raykina

Intracellular signaling involved in the programmed neutrophil cell death leading to the release of extracellular DNA traps in thrombus formation 222

A.N. Sveshnikova, E.A. Adamanskaya, Yu.-D.D. Korobkina, M.A. Pantelev

© 2024 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ
им. Дмитрия Рогачева»
Минздрава России
Поступила 25.04.2024
Принята к печати 20.05.2024



EDN: YQKJIA

Контактная информация:

Илюшина Мария Александровна,
врач-гематолог отделения трансплантации
гемопозитических стволовых клеток №1
ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева»
Минздрава России
Адрес: 117997, Москва,
ул. Саморы Машела, 1
E-mail: maria.ilushina@gmail.com

DOI: 10.24287/1726-1708-2024-23-2-14-24

Опыт аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток у детей с химиорезистентным острым миелоидным лейкозом

М.А. Илюшина¹, Л.Н. Шелихова¹, Д.А. Шашелева¹, М.А. Дунайкина¹, С.Л. Благов¹,
Е.Е. Курникова¹, Д.С. Першин¹, И.И. Калинина¹, Я.О. Музалевский¹, А.С. Казаченок¹,
В.В. Бриллиантова¹, Ю.В. Ольшанская¹, А.Н. Казакова¹, Е.А. Зеркаленкова¹, Д.Д. Байдильдина¹,
Т.Д. Балашов², А.А. Масчан¹, М.А. Масчан¹

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии
и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, Москва

²Медицинский институт ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов им. Патриса Лумумбы»,
Москва

Известно, что наибольшей эффективностью трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) обладает у пациентов с острыми лейкозами, подошедших к ней в ремиссии. В данной работе проведен анализ когорты детей с химиорефрактерным острым миелоидным лейкозом (ОМЛ) в целях исследования результативности ТГСК у таких пациентов. Исследование одобрено независимым этическим комитетом и утверждено решением ученого совета НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева, проведено в соответствии с Хельсинкской декларацией. Все пациенты и/или их законные представители подписали информированное согласие на участие в исследовании. В данный ретроспективный анализ вошли 69 пациентов с химиорезистентным ОМЛ (неудача индукции ($n = 31$), рефрактерный рецидив ($n = 38$)), средний возраст 9,4 (1,1–22) года. Трансплантации проведены в период с февраля 2012 г. по январь 2020 г., медиана наблюдения составила 5,47 (1,9–8,9) года. Пятьдесят пациентов были трансплантированы от гаплоидентичных, 10 – от совместимых родственных, 9 – от совместимых неродственных доноров. Применялся режим кондиционирования на основе треоосульфана, второй препарат мелфалан или тиотепа. В 55 случаях выполнялась TCR $\alpha\beta^+$ /CD19 $^+$ -деплеция трансплантата по технологии CliniMACS, 11 пациентов получили нативный костный мозг, 2 – неродственную пуповинную кровь. В качестве профилактики рецидива заболевания после ТГСК 21 пациенту предложены курсы посттрансплантационной терапии: гипометилирующие препараты в сочетании с бортезомибом, а 48 – инфузии донорских лимфоцитов. Первичное приживление достигнуто у 66 из 69 пациентов (3 умерли до приживления). Полного химеризма к +30-му дню достигли 86% больных. Кумулятивная частота развития острой реакции «трансплантат против хозяина» II–IV степени составила 42%, хроническая реакция «трансплантат против хозяина» диагностирована у 17 пациентов. Среди всех случаев смертность, связанная с трансплантацией, составила 7,8%, кумулятивная частота рецидивов – 53%. Восстановление NK-клеток на +30-й день было связано со снижением частоты рецидивов, кумулятивный риск рецидива составил 76% у пациентов с абсолютным содержанием NK-клеток в крови меньше медианы против 43% у пациентов с содержанием NK-клеток выше медианы ($p = 0,013$). При медиане наблюдения 5,5 лет бессобытийная выживаемость составила $37 \pm 11\%$, общая выживаемость – $42 \pm 10\%$. В настоящем исследовании показано, что у детей с рефрактерным ОМЛ выполнение аллогенной ТГСК позволяет достичь клинко-гематологической ремиссии в 86% случаев и долгосрочной общей выживаемости около 40%. Среди факторов, влияющих на исход ТГСК, наиболее значимыми оказались размер остаточной популяции опухолевых клеток перед началом кондиционирования и содержание NK-клеток в крови на ранних сроках после ТГСК.

Ключевые слова: трансплантация гемопоэтических стволовых клеток, кондиционирование, острый миелоидный лейкоз, реакция «трансплантат против хозяина», NK-клетки

Илюшина М.А. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2024; 23 (2): 14–24. DOI: 10.24287/1726-1708-2024-23-2-14-24

© 2024 by «D. Rogachev NMRCPOI»

Received 25.04.2024

Accepted 20.05.2024

Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation outcomes in pediatric patients with refractory acute myeloid leukemia

М.А. Илюшина¹, Л.Н. Шелихова¹, Д.А. Шашелева¹, М.А. Дунайкина¹, С.Л. Благов¹, Е.Е. Курникова¹,
Д.С. Першин¹, И.И. Калинина¹, Я.О. Музалевский¹, А.С. Казаченок¹, В.В. Бриллиантова¹, Ю.В. Ольшанская¹,
А.Н. Казакова¹, Е.А. Зеркаленкова¹, Д.Д. Байдильдина¹, Т.Д. Балашов², А.А. Масчан¹, М.А. Масчан¹

¹The Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology of Ministry
of Healthcare of the Russian Federation, Moscow

²Medical Institute of the Patrice Lumumba Peoples' Friendship University of Russia, Moscow

Hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) is known to be most effective in cancer patients in remission. In this paper, we analyzed a cohort of children with refractory acute myeloid leukemia (AML) in order to study the effectiveness of HSCT in such patients. The study was approved by the Independent Ethics Committee and the Scientific Council of the Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology and was conducted in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki. All the patients and/or their legal representatives signed an informed consent form for participation in the study. Our retrospective analysis included 69 patients with refractory AML (induction failure ($n = 31$), refractory relapse ($n = 38$)) whose median age was 9.4 (1.1–22) years and who had undergone HSCT between February 2012 and January 2020, with the median follow-up of 5.47 (1.9–8.9) years. Fifty patients were transplanted from haploidentical donors, 10 – from matched related donors, 9 – from matched unrelated donors. All the patients received treosulfan-based conditioning and either melphalan or thiotepa. Fifty-five cases received TCR β /CD19 $^{+}$ -depleted HSCs (CliniMACS), 11 patients received native bone marrow and 2 – unrelated umbilical cord blood. For post-transplant relapse prevention, 21 patients were treated with hypomethylating agents in combination with bortezomib and 48 patients received modified donor lymphocyte infusions. Primary engraftment was achieved in 66 out of 69 patients (3 patients had died before engraftment). By Day +30, 86% of patients showed complete chimerism. The cumulative incidence of grade II–IV acute graft-versus-host disease was 42%, chronic graft-versus-host disease was diagnosed in 17 pts. In the entire cohort, transplant-related mortality was 7.8% and cumulative incidence of relapse was 53%. NK cell recovery by Day +30 was significantly associated with decreased incidence of relapse: patients whose absolute NK cell counts were below the median had a cumulative incidence of relapse of 76% versus 43% in patients with NK cell counts above the median ($p = 0.013$). At a median follow-up of 5.5 years, the event-free survival was $37 \pm 11\%$, and the overall survival was $42 \pm 10\%$. Remission was achieved in 86% of the patients, while long-term overall survival reached about 40%. Our findings suggest that allogeneic HSCT provides a reasonable chance of cure in children with refractory AML and creates a solid basis for further improvement. Tumor burden in the bone marrow before conditioning and early post-transplant NK cell counts in the blood were found to be the most significant prognostic factors in HSCT.

Key words: hematopoietic stem cell transplantation, conditioning, acute myeloid leukemia, graft-versus-host disease, NK cells

Ilyushina M.A., et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology 2024; 23 (2): 14–24.
DOI: 10.24287/1726-1708-2024-23-2-14-24

Острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) составляет около 15% в структуре детских лейкозов. Терапевтические программы со стратификацией риска, интенсификация протоколов лечения и совершенствование методов поддерживающей терапии способствуют постепенному улучшению клинических исходов у детей и подростков с ОМЛ. На данный момент 5-летняя выживаемость в когорте пациентов детского и подросткового возраста с диагнозом ОМЛ достигает 70% [1], тем не менее первично-рефрактерные и рефрактерные рецидивы ОМЛ остаются нерешенной проблемой детской онкологии. Более трети детей с ОМЛ не выходят в ремиссию или развивают рецидив, несмотря на лечение. Подходы к терапии при рецидивах ОМЛ у детей остаются предметом исследований [2]. Ключевым компонентом терапии при рецидивах и рефрактерных формах ОМЛ является трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК).

Общий подход к ТГСК при острых лейкозах основан на наблюдении, что оптимальные результаты достигаются при выполнении ТГСК в ремиссии. Идеальным условием считается отсутствие детектируемых опухолевых клеток в костном мозге при использовании высокочувствительных методов определения минимальной остаточной болезни (МОБ). Тем не менее выполнение ТГСК у пациентов с химиорезистентным лейкозом с морфологически детектируемой остаточной популяцией лейкоэмических клеток в костном мозге остается единственным терапевтическим подходом, сохраняющим шанс на долгосрочное выживание [3]. Использование ТГСК в качестве независимой куративной опции при химиорезистентных формах ОМЛ на сегодняшний день не закреплено рекомендациями, но в клинической практике часто оказывается единственным доступным вариантом «терапии спасения». Почти 30% 5-летняя выживаемость после ТГСК зафиксирована у детей с вторич-

но-рефрактерным ОМЛ в совместном исследовании Children's Oncology Group и Berlin–Frankfurt–Münster study group [4].

Под химиорезистентностью понимают отсутствие клинико-гематологической ремиссии по окончании 2 фаз индукции для пациентов с первично-рефрактерной формой ОМЛ или курса интенсивной химиотерапии, включающей флударабин, цитарабин и антрациклин для пациентов с рецидивом заболевания.

Выбор оптимального времени ТГСК при рефрактерных формах ОМЛ остается клинически сложным решением. Можно сказать, что продолжается поиск баланса между глубиной возможной ремиссии у пациента перед ТГСК и накопленной токсичностью высокодозных блоков химиотерапии: незавершенный курс химиотерапии повышает риск прогрессии/рецидива заболевания, однако накопленная токсичность может критически усугубить тяжелые жизнеугрожающие побочные эффекты трансплантации, особенно инфекционную токсичность. Критериев однозначно правильного, идеального момента проведения ТГСК таким пациентам на сегодняшний день нет. По данным литературы, показатели выживаемости после аллогенной ТГСК при рефрактерных формах ОМЛ, несмотря на использование миелоаблативных режимов кондиционирования, включая тотальное облучение тела, варьируют от 9 до 44% [1, 5].

Долгие годы на успех ТГСК отрицательно влиял ограниченный выбор источника стволовых клеток для пересадки: поиск HLA-совместимого донора занимал много времени и не всегда с оптимальным результатом. В последние 2 десятилетия широкое распространение получило проведение ТГСК от гаплоидентичного донора (наполовину совместимый близкий родственник пациента). Подход к выполнению аллогенной ТГСК на базе технологии имму-

Correspondence:

Maria A. Ilyushina,
a hematologist at Department of
Hematopoietic Stem Cell Transplantation
No. 1 at the Dmitry Rogachev National Medical
Research Center of Pediatric Hematology,
Oncology and Immunology of Ministry
of Healthcare of the Russian Federation
Address: 1 Samoy Mashela St.,
Moscow 117997, Russia
E-mail: maria.ilyushina@gmail.com

номагнитной деплеции нежелательных популяций лимфоцитов, разработанный в НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева, позволил существенно сократить время ожидания ТГСК для пациентов с острыми лейкозами. Терапия с использованием клеточного материала гаплоидентичных доноров позволяет снизить риск трансплантационной смертности до 5% и ниже. Таким образом, выполнение процедуры ТГСК становится доступным всем нуждающимся, независимо от наличия в семье или регистре полностью совместимого донора [6].

В данной работе мы анализируем клинические исходы ТГСК в когорте детей с химиорезистентными формами ОМЛ. Все пациенты, включенные в исследование, проходили стационарное лечение в НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Пациенты

Исследование было одобрено независимым этическим комитетом и утверждено решением ученого совета НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева, проведено в соответствии с Хельсинкской декларацией. Все пациенты и/или их законные представители подписали информированное согласие на участие в исследовании.

В исследование были включены 69 пациентов: 30 девочек и 39 мальчиков. Медиана возраста пациентов на момент ТГСК составила 9,4 (1,1–22) года, медиана наблюдения для выживших пациентов – 5,5 (1,9–8,9) года. Клинический статус пациентов идентифицировался как первично-рефрактерные формы ОМЛ и химиорезистентные рецидивы заболевания в 31 и 38 случаях соответственно.

Цитогенетические и молекулярно-биологические лабораторные тесты изначально были выполнены для всех пациентов. Подробная информация о генетических вариантах представлена в *таблице 1*. Все пациенты получили первую линию терапии в соответствии с актуальными протоколами лечения ОМЛ. Пациенты с рецидивами ОМЛ лечились по протоколу Relapsed AML-2001 и его модификациям.

Химиорезистентность определяли на основании миелограммы при наличии более 5% лейкемических бластных клеток и/или позитивности по соответствующему набору цитогенетических и/или молекулярных маркеров и подтверждали методом иммунофенотипирования (с 2016 г.).

Расписание и интенсивность режимов индукционных/противорецидивных блоков химиотерапии менялись в соответствии с актуальными рекомендациями. До 2018 г. пациенты получали терапию по протоколу ОМЛ-2006, где индукция состояла из 2 частей: ADE и HAM. С 2018 г. терапия ОМЛ прово-

дится по протоколу ОМЛ-2018, где индукция укладывается в одну часть – AM₄₂E.

Статус «резистентность заболевания» присваивался в точке 1 мониторинга остаточной болезни после индукции, при отсутствии полной ремиссии.

Рецидив определялся как выявление в костном мозге более 5% лейкемических бластов и/или любого количества бластных клеток с признаками анаплазии через ≥ 1 мес после присвоения статуса полной ремиссии. Рефрактерность рецидива заболевания фиксировалась в случае отсутствия полной ремиссии после курса интенсивной химиотерапии, включающей флударабин, цитарабин и антрациклин (идарубицин или митоксантрон).

Среднее содержание бластных клеток в костном мозге до начала циторедукции составляло 45%.

Все трансплантации пациентам, включенным в данное исследование, были выполнены в период с февраля 2012 г. по январь 2020 г. на базе отделений ТГСК НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева. Основные характеристики пациентов и трансплантатов представлены в *таблице 2*.

Режимы кондиционирования и подготовка трансплантата

Всем пациентам проводилось медикаментозное кондиционирование на основе треоосульфана с мелфаланом или тиотепой в качестве второго миелоаблативного компонента.

Таблица 1
Цитогенетические характеристики пациентов, включенных в исследование

Tables 1
Cytogenetic characteristics of the enrolled patients

Перестройка Rearrangement	Число пациентов, n Number of patients, n
t(8;21)	11
t(15;17)	2
t(9;11)	5
t(10;11) (1 пациент + NRAS) t(10;11) (1 patient + NRAS)	6
t(1;22) (1 пациент + сложный кариотип) t(1;22) (1 patient + complex karyotype)	2
t(11;19)	4
Сложный кариотип Complex karyotype	5
Моносомия 7 Monosomy 7	5
FLT3	4
Трисомия 8 Trisomy 8	3
Экспрессия WT1, делеция 9, инверсия 16, моно 5, NRAS, PTPN11, делеция ETV, NUP98, кариотипы +11+21 и +8+21, t(12;22), t(16;21), t(6;11), мутация в генах TET2, SF1, CREBBP, BRCA1, DNMT1 WT1 expression, chromosome 9 deletion, chromosome 16 inversion, monosomy 5, NRAS, PTPN11, ETV gene deletion, NUP98, +11+21 and +8+21 karyotypes, t(12;22), t(16;21), t(6;11), mutated TET2, SF1, CREBBP, BRCA1, DNMT1 genes	По 1 пациенту Each aberration present in 1 patient
Без перестроек No rearrangements	8

Таблица 2
Основные характеристики пациентов и трансплантатов

Tables 2
The main patient and transplant characteristics

Параметр Parameter			Значение Value
Возраст пациентов на момент ТГСК, годы (интервал) Patient age at the time of HSCT, years (range)			9,4 (1,1–22,1)
Пол пациентов, мужской:женский, <i>n</i> Patient gender, male:female, <i>n</i>			39:30
Цитогенетический прогноз заболевания, <i>n</i> Cytogenetic prognosis of the disease, <i>n</i>	Благоприятный Favorable		0
	Промежуточный/неизвестный Intermediate/unknown		21
	Неблагоприятный Unfavorable		48
Статус заболевания, <i>n</i> Disease status, <i>n</i>	Первично-рефрактерный Primary refractory disease		31
	Рефрактерный рецидив Refractory relapse		38
Лейкемические бласты в костном мозге до начала кондиционирования (среднее значение), % Leukemic blast cells in the bone marrow before conditioning (mean value), %			45 (МОБ(+) – 98%) 45 (MRD(+) – 98%)
Кондиционирование, <i>n</i> Conditioning, <i>n</i>	Двухфазное Two-step conditioning		29
	Классическое Classic conditioning		40
	Серотерапия (20/69) Serotherapy (20/69)	Антитимоцитарный глобулин лошадиный Equine antithymocyte globulin	9
		Антитимоцитарный глобулин кроличий Rabbit antithymocyte globulin	11
Донор, <i>n</i> Donor, <i>n</i>	Гаплоидентичный (мать – 29, отец – 21) Haploidentical donor (mother – 29, father – 21)		50
	Неродственный Unrelated		9 (пуповинная кровь – 2) 9 (umbilical cord blood – 2)
	Родственный Related		10
Трансплантат, <i>n</i> Transplant, <i>n</i>	αβ-деплеция αβ depletion	Совместимый неродственный донор – 7/ совместимый родственный донор – 1/ гаплоидентичный донор – 47 Matched unrelated donor – 7/ matched related donor – 1/haploidentical donor – 47	55 (CD3/CD19-деплеция – 2) 55 (CD3/CD19 depletion – 2)
	Нативный Native	Совместимый родственный донор – 9 (костный мозг)/гаплоидентичный донор – 3 (костный мозг – 2, стволовые клетки периферической крови – 1)/ пуповинная кровь – 2 Matched related donor – 9 (bone marrow)/ haploidentical donor – 3 (bone marrow – 2, peripheral blood stem cells – 1)/umbilical cord blood – 2	14

Notes. HSCT – hematopoietic stem cell transplantation; MRD – minimal residual disease.

Четверым пациентам в составе кондиционирования проведено тотальное облучение тела до суммарной дозы 12 Гр.

Двадцати девяти пациентам кондиционирование проводилось в 2 фазы: циторедукция и собственно кондиционирование. Первая фаза кондиционирования в исследованной когорте была неоднородной. Пятнадцать пациентов получали флударабин в сочетании с циклофосфаном (*n* = 6), вепезидом (*n* = 2), цитарабином и идарубицином (блок FLAI, *n* = 3) или цитарабином и митоксантроном (блок FLAM, *n* = 4). Десять пациентов получили курс циторедукции на основе клофарабина: в монорежиме (*n* = 6) или в сочетании с цитозаром (*n* = 4). Четверым пациентам проведена циторедукция цитозаром и вепезидом (*n* = 3) или азацитидином и вепезидом (*n* = 1).

Вторая фаза подготовки к ТГСК (собственно кондиционирование) начиналась через 4–21 день после завершения циторедукции, в качестве второго алкилирующего агента использовали мелфалан (*n* = 38) или тиотепу (*n* = 29).

У пациентов, получивших терапию в 2012–2014 гг., в кондиционирование входила серопротекция антитимоцитарным глобулином лошадиным (*n* = 9) или кроличьим (*n* = 11). С июня 2015 г. серотерапию заменили на антицитокиновую терапию блокатором интерлейкина-6 тоцилизумабом (*n* = 36). С октября 2016 г. к тоцилизумабу добавлен блокатор костимуляторного сигнала абатацепт (*n* = 25). Дополнительно в целях деплеции В-лимфоцитов 51 пациент получил ритуксимаб в дозе 200 мг/м².

Схема режимов кондиционирования представлена в таблице 3.

Таблица 3
Состав кондиционирования

Tables 3
Conditioning regimens

Препарат Drug	Суммарная доза Total dose	Дни от ТГСК Days before HSCT
Флударабин Fludarabine	150 мг/м ² 150 mg/m ²	-6, -5, -4, -3, -2
Треосульфат Treosulfan	42 г/м ² 42 g/m ²	-5, -4, -3
Мелфалан (n = 39) Melphalan (n = 39)	140 мг/м ² 140 mg/m ²	-2
Тиотепа (n = 29) Thiotepa (n = 29)	10 мг/кг 10 mg/kg	-2
Антитимоцитарный глобулин лошадиный (n = 9) Equine antithymocyte globulin (n = 9)	50 мг/кг 50 mg/kg	-10, -9
Антитимоцитарный глобулин кроличий (n = 11) Rabbit antithymocyte globulin (n = 11)	5 мг/кг 5 mg/kg	-5, -4
Тоцилизумаб (n = 12) Tocilizumab (n = 12)	10 мг/кг 10 mg/kg	-1
Тоцилизумаб + абатацепт (n = 15) Tocilizumab + Abatacept (n = 15)	10 мг/кг + 8 мг/кг 10 mg/kg + 8 mg/kg	Тоцилизумаб: -1 Tocilizumab: -1 Абатацепт: +1, +7, +14, +28 Abatacept: +1, +7, +14, +28
Такролимус + метотрексат (n = 6) Tacrolimus + Methotrexate (n = 6)	0,02 мг/кг + 5 мг/м ² 0.02 mg/kg + 5 mg/m ²	+1, +3, +6
Бортезомиб (n = 24) Bortezomib (n = 24)	1,3 мг/м ² 1.3 mg/m ²	-5, -2, +2, +5

Доноры для пациентов распределились следующим образом: 50 пациентов получили ТГСК от гаплоидентичных родственных доноров (29 – женского пола, 21 – мужского), 10 – от родственных полностью совместимых доноров (5 – женского пола, 5 – мужского), 9 – от неродственных совместимых доноров (3 – женского пола, 6 – мужского) пациентов.

В качестве источника гемопоэтических стволовых клеток были использованы нативный костный мозг (n = 11), неродственная пуповинная кровь (n = 2), периферические стволовые клетки крови, полученные методом афереза мононуклеаров периферической крови доноров после стандартного режима мобилизации предшественников с применением гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (n = 56).

В 55 случаях был выполнен процессинг трансплантата – αβ-T- и CD19-деплегция. Иммуномагнитную селекцию клеток проводили в системе CliniMACS Plus или CliniMACS Prodigy (Miltenyi Biotec, Bergish Gladbach, Германия) по протоколу производителя. Клеточный состав трансплантата был верифицирован в соответствии с протоколом производителя.

Медианные значения показателей клеточного состава трансплантата составили: αβ-T-клетки 14,5 × 10³/кг, CD34⁺-клетки 8,9 × 10⁶/кг, NK-клетки 32 × 10⁶/кг, γδ-T-клетки 8,2 × 10⁶/кг, CD19⁺-клетки 0,15 × 10⁶/кг.

Пациенты, трансплантированные от родственных доноров, в качестве профилактики реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ) получали ингибиторы кальциневрина: такролимус или циклоспорин до +30-го дня в сочетании с микрофенолата мофетиллом или коротким курсом метотрексата. С 2015 г. в

состав профилактики РТПХ был включен бортезомиб (1,3 мг/м²/сут на +2-й и +5-й дни трансплантации; n = 42). Параметры профилактики РТПХ суммированы в таблице 4.

Приживление нейтрофильного и тромбоцитарного ростков регистрировали в первый из трех последовательных дней при уровне гранулоцитов более 0,5 × 10⁹/л и тромбоцитов более 20,0 × 10⁹/л без предшествующей трансфузии.

Диагностику и стадирование острой (oРТПХ) и хронической (хрРТПХ) РТПХ проводили в соответствии со стандартными критериями [7].

Посттрансплантационная химиотерапия и инфузия донорских лимфоцитов

Пациентам, вышедшим в ремиссию после ТГСК (n = 59), назначалась превентивная терапия в соот-

Таблица 4
Профилактика РТПХ

Tables 4
Graft-versus-host disease (GVHD) prevention

Режим Regimen	Препараты Drugs
1 (n = 9)	Антитимоцитарный глобулин лошадиный 50 мг/кг + такролимус/метотрексат Equine antithymocyte globulin 50 mg/kg + tacrolimus/methotrexate
1.1 (n = 10)	Циклоспорин, метотрексат Cyclosporine, methotrexate
2 (n = 11)	Тимоглобулин 5 мг/кг, ритуксимаб 200 мг/м ² (n = 9), бортезомиб в дни +2, +5 после ТГСК Thymoglobulin 5 mg/kg, rituximab 200 mg/m ² (n = 9), bortezomib on Days +2, +5 after HSCT
3 (n = 35)	Тоцилизумаб 8 мг/кг (n = 33) и бортезомиб после ТГСК (n = 22), дополнительно абатацепт 10 мг/кг по схеме 0+7+14+28 Tocilizumab 8 mg/kg (n = 33) and bortezomib after HSCT (n = 22), plus abatacept 10 mg/kg on days 0+7+14+28
4 (n = 4)	Посттрансплантационный циклофосфамид Post-transplant cyclophosphamide

ветствии с действующими пилотными клиническими протоколами.

Инфузии модифицированных донорских лимфоцитов (ИДЛ) получили 48 пациентов. Использовали 2 типа модифицированных донорских лимфоцитов: продукт $\alpha\beta$ -деплеции первичного трансплантата (изначально аликвотированный и криоконсервированный) и CD45RA-деплетированные лимфоциты (Т-клетки памяти), полученные из первичного продукта афереза либо после нестимулированного афереза [8].

Режим введения донорских лимфоцитов был стандартизирован следующим образом. На +30-е сутки Т-деплетированной ТГСК при отсутствии признаков оРТПХ, после установления факта приживления трансплантата и отмены иммуносупрессивной терапии пациентам вводили заранее заготовленный клеточный продукт от тех же доноров, что и ТГСК. Дозу ИДЛ определяли с учетом индивидуальных характеристик пары «донор–реципиент».

Начиная с 2014 г., 34 пациента получили инфузии CD45RA-деплетированных лимфоцитов, в том числе 23 человека в рамках пилотного исследования, результаты которого опубликованы ранее [8]. Инфузии CD45RA-деплетированных лимфоцитов проводились в виде курса, в среднем по 3 введения, медиана времени до первого введения составила 36 дней. Инфузии $\alpha\beta$ -деплетированных Т-клеток получили 12 пациентов, каждому из которых было выполнено 3 (1–6) введения, медиана времени до проведения терапии составила 44 (39–64) дня.

Мониторинг иммунореконституции проводили ежемесячно путем определения субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови с использованием проточной цитометрии.

Девятнадцать пациентов получили по 3 (1–6) цикла комбинированной терапии после приживления трансплантата для предотвращения рецидива основного заболевания в рамках клинического исследования: 5-азациитидин в суточной дозе 35 мг/м² ($n = 10$) или децитабин 10 мг/м² в 1–5-й дни и бортезомиб 1,3 мг/м² в 1-й и 4-й дни ($n = 9$). Время до начала первого курса составило 40 (33–99) дней.

У 14 пациентов курсы химиотерапии проводили с поддержкой ИДЛ, обогащенных $\alpha\beta$ -Т-деплетированным продуктом ($n = 6$) или клетками памяти ($n = 8$). Результаты этих исследований опубликованы ранее [9, 10].

Статистический анализ

Сбор и анализ данных проводили с помощью клинической базы данных ТГСК, программ Excel и XLSTAT (Addinsoft, Париж, Франция). Классический анализ выживаемости выполнен с помощью метода Каплана–Майера. При расчете бессобытийной выжи-

ваемости (БСВ) событием считали смерть от любой причины или рецидив/прогрессию основного заболевания. Для оценки рисков рецидива основного заболевания, развития РТПХ, трансплантационной смертности строили кривые кумулятивной вероятности. При этом для каждого основного события было принято конкурирующее событие: для рецидива основного заболевания – смерть от любой причины в ремиссии, для оРТПХ – рецидив заболевания или смерть.

Также оценивались факторы, вероятно, влияющие на исход ТГСК при рефрактерных ОМЛ, по данным литературы: цитомегаловирусная инфекция, восстановление субпопуляций NK-лимфоцитов на +30-й день от ТГСК, посттрансплантационная терапия, первично-рефрактерное или пострецидивно-рефрактерное течение, опухолевая нагрузка костного мозга перед трансплантацией, пол донора, возраст пациента, наличие оРТПХ или хрРТПХ.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Приживление трансплантата, острая и хроническая реакция «трансплантат против хозяина»

Приживление трансплантата зафиксировано у 66 (96%) пациентов, медиана приживления лейкоцитарного ростка составила 13 дней (в абсолютном интервале 9–49 дней), тромбоцитарного ростка – 14 (10–50) дней. Стопроцентный донорский химеризм в костном мозге и клинико-гематологическая ремиссия на +30-й день от ТГСК зафиксированы у 59 (86%) пациентов.

Трансплантационная смертность на +100-й день составила 3%: 1 пациент умер на +14-е сутки в связи с острым повреждением легких и 1 – в связи с фульминантным септическим процессом на +10-е сутки (до приживления трансплантата). Далее в период наблюдения умерли еще 3 пациента, 2 из них от комбинации осложнений РТПХ III–IV степени, 1 – через 5 лет после трансплантации, предположительно от септического процесса.

Кумулятивная частота трансплантационной смертности составила 7,8% (95% доверительный интервал (ДИ) 3,3–18).

оРТПХ II–IV степени была диагностирована у 29 пациентов в среднем на +37-й день ТГСК, кумулятивный риск оРТПХ II–IV степени составил 42% (95% ДИ 32–46). У 14 пациентов развилась оРТПХ III–IV степени, кумулятивный риск составил 22% (95% ДИ 13–26). Признаки экстенсивной хрРТПХ развились у 17 пациентов в среднем на +155-й день от ТГСК. У 10 пациентов хрРТПХ развилась после ИДЛ.

Отдельно проанализирована группа пациентов, получивших трансплантат после $\alpha\beta$ -Т- и

CD19-деплеции. В этой когорте пациентов оРТПХ II–IV степени была диагностирована у 20 пациентов в среднем на +43-й день после ТГСК, кумулятивный риск оРТПХ II–IV степени составил 36% (95% ДИ 25–52). оРТПХ III–IV степени зафиксирована у 7 пациентов, кумулятивный риск составил 13% (95% ДИ 6,4–28). хрРТПХ диагностирована у 5 пациентов в среднем на +125-й день от ТГСК. Сравнительные кривые кумулятивного риска РТПХ групп с и без деплеции представлены на *рисунке 1*.

Рецидивы и выживаемость

Прогрессия или рецидив ОМЛ развились у 37 пациентов на сроке 97 (0–924) дней после ТГСК. Кумулятивная вероятность рецидива (КВР) или прогрессирования через 5 лет наблюдения для когорты в целом составила 53% (95% ДИ 43–67). БСВ и общая выживаемость (ОВ) составили 37% (95% ДИ 25–48) и 43% (95% ДИ 30–54) соответственно. Результаты анализа клинических исходов представлены на *рисунке 2*. Группа пациентов, получивших в качестве трансплантата деплетированный продукт, была проанализирована отдельно. КВР составила 55% (95% ДИ 43–70) ($n = 30$). Безрецидивная выживаемость и ОВ составили 40% (95% ДИ 30–57) и 46% (95% ДИ 33–60) соответственно.

Влияние степени поражения костного мозга

Для оценки влияния инициального уровня бластоэза перед кондиционированием на исход ТГСК пациенты были разделены по поражению костного мозга: больше/меньше 30%, 20% или 15% бластов в миелограмме. Выявлено, что бластоэз костного мозга выше 15% коррелирует с неблагоприятным клиническим исходом.

Пятилетние показатели ОВ и КВР среди пациентов с бластоэзом костного мозга ниже 15% составили

72% (95% ДИ 54–90) и 30% (95% ДИ 17–55) соответственно. Для пациентов с бластоэзом костного мозга выше 15% те же показатели составили 23% (95% ДИ 10–36) и 69% (95% ДИ 56–84) соответственно (grey test: $p = 0,002$).

Влияние ранней иммунорекогнституции

Паттерны иммунорекогнституции после ТГСК могут быть прогностически значимыми. Так, восстановление NK-клеток выше медианного уровня ($0,359 (0,066–3,93) \times 10^6/\text{мл}$) было ассоциировано со статистически значимым улучшением выживаемости [11]. Раннее восстановление NK-клеток рассматривается как одно из потенциальных преимуществ применения $\alpha\beta$ -Т-клеточной деплеции. В исследованной когорте 80% пациентов получили деплетированный трансплантат. В этой группе для пациентов с абсолютным количеством NK-клеток выше медианы на +30-е сутки после ТГСК 5-летние ОВ, БСВ и КВР составили 56% (95% ДИ 36–74), 48% (95% ДИ 29–67) и 44% (95% ДИ 29–68) соответственно. Для остальных пациентов когорты соответствующие значения равнялись 31% (95% ДИ 12–51), 23% (95% ДИ 5,2–40) и 77% (95% ДИ 61–96) (log-rank: $p = 0,013$; 0,02 и grey test: $p = 0,05$).

Другие факторы риска

В качестве вероятных факторов риска были проанализированы первичное рефрактерное течение или рефрактерное течение рецидива, двухфазное/классическое кондиционирование, оРТПХ, использование посттрансплантационной химиотерапии, ИДЛ, введение модифицированных CD45RO-лимфоцитов, факт процессинга (деплеции) трансплантата, реактивация цитомегаловирусной инфекции, пол донора, возраст пациента старше/младше 10 лет на момент ТГСК. Ни один из перечисленных факторов не корре-

Рисунок 1

Кумулятивный риск развития оРТПХ в группах с и без деплеции: А – II–IV степени; Б – III–IV степени

Figure 1

Cumulative incidence of acute GVHD in the groups with/without cell depletion: A – grade II–IV; B – grade III–IV

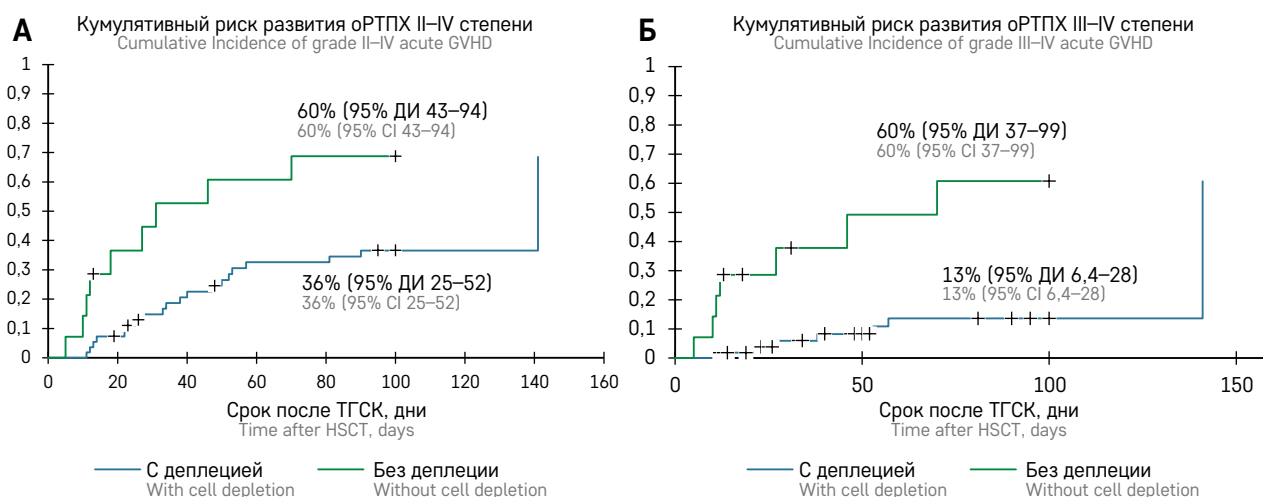
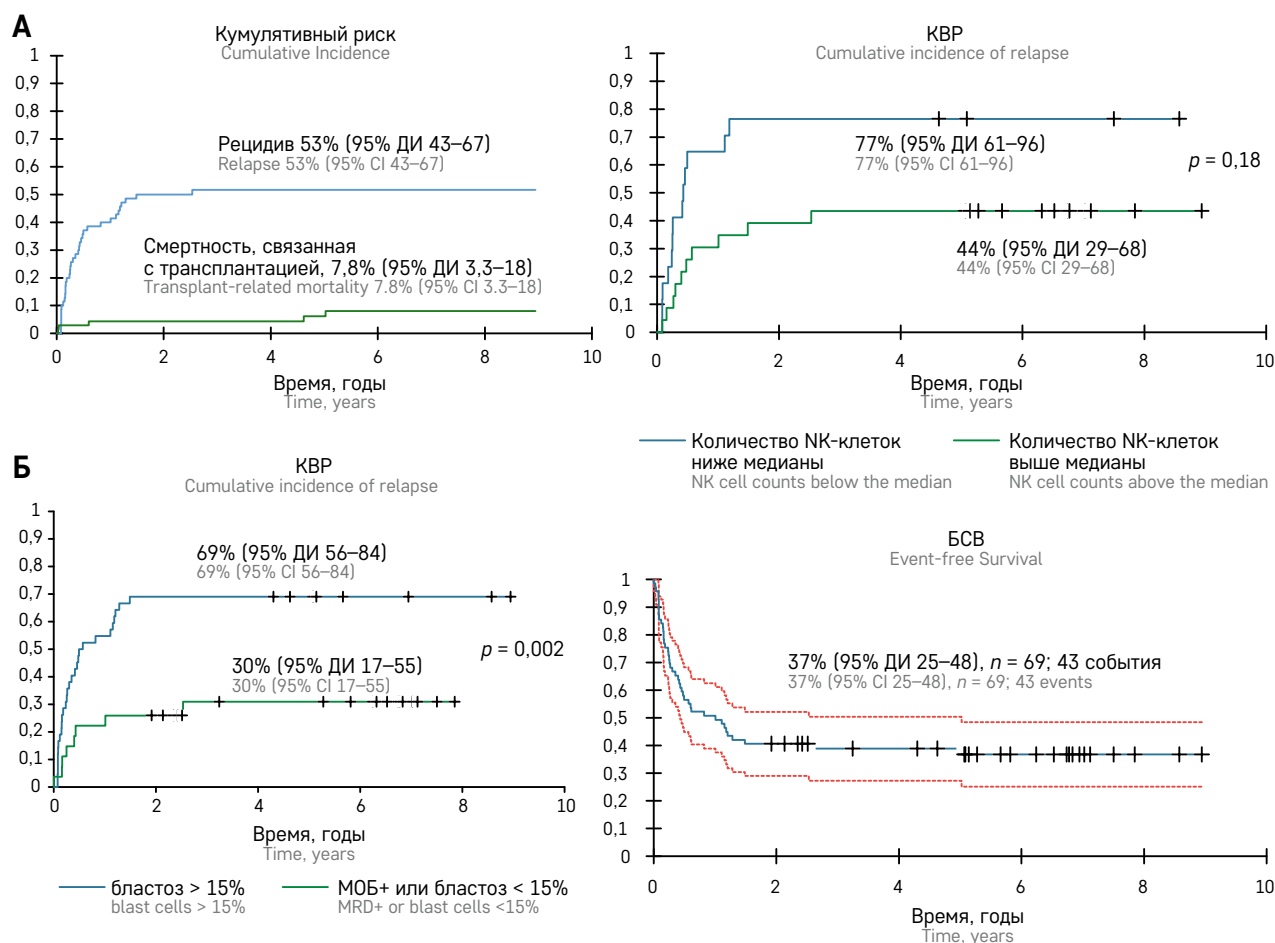


Рисунок 2

Результаты анализа клинических исходов пациентов, включенных в исследование

Figure 2

The results of a clinical outcome analysis in the enrolled patients



лировал с частотой рецидивов и выживаемостью в исследованной когорте, результаты анализа представлены в таблице 5.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Прогноз детей с ОМЛ за последние десятилетия улучшился, при этом ОВ в настоящее время составляет примерно 70% [1, 5]. Большинство международных исследовательских групп в настоящее время используют схемы лечения, которые включают 4–5 курсов интенсивной миелосупрессивной химиотерапии или интенсивной химиотерапии с последующей ТГСК для пациентов с высоким риском [12, 13]. Несмотря на интенсивные режимы, частота рецидивов, достигающая 30%, не изменилась за последние 20 лет [13]. С 1987 г. произошло значительное улучшение ОВ у пациентов с первым рецидивом: 5-летней ОВ с 21–23% в 1980-х и 1990-х годах [14–16] до 36–39% выживших после терапии до 2014 г. [17, 18]. Данные о выживаемости педиатрических пациентов, проходивших лечение в рамках протоколов AML-BFM в период с 2004 по

2017 г. и в исследованиях фазы 3 COG в период с 2006 по 2018 г., были проанализированы ретроспективно. Пятилетняя ОВ у 197 пациентов с рецидивом в группе BFM составила $42 \pm 4\%$, а у 852 пациентов в группе COG – $35 \pm 2\%$. Среди 156 пациентов в группе BFM, получивших блоки даунорубина в сочетании с флударабином после рецидива, 5-летняя ОВ составила 44% [4]. По сравнению с ранними анализами пациентов наблюдается тенденция к улучшению выживаемости с течением времени, а также к увеличению частоты повторных ТГСК. Такое увеличение числа пациентов, перенесших ТГСК, может объяснить улучшение выживаемости. Поскольку реиндукционная терапия не улучшилась, наиболее вероятно, что больше детей получают ТГСК при рецидиве из-за улучшения поддерживающей терапии и доступности доноров.

В данном ретроспективном анализе детей с рецидивом ОМЛ изучались эффективность ТГСК у данной категории пациентов и прогностические переменные. По данным нашего исследования, применяемая тактика проведения аллогенной ТГСК независимо от типа донора и процесинга с/без $\alpha\beta$ -Т-деплецией

Таблица 5
Основные результаты
Tables 5
Main outcomes

Параметр Parameter	Значение Value	
Медиана наблюдения, годы Median follow-up, years	5,47 (2–9)	
Кумулятивная вероятность развития оРТПХ стадии II–IV до 100-го дня после ТГСК, группа деплеции, % Cumulative probability of grade II–IV acute GVHD within 100 days after HSCT, the group with cell depletion, %	36 (95% ДИ 25–52) 36 (95% CI 25–52)	p = 0,019
Кумулятивная вероятность развития оРТПХ стадии II–IV до 100-го дня после ТГСК, группа без деплеции, % Cumulative probability of grade II–IV acute GVHD within 100 days after HSCT, the group without cell depletion, %	60 (95% ДИ 43–94) 60 (95% CI 43–94)	
Кумулятивная вероятность развития оРТПХ стадии III–IV до 100-го дня после ТГСК, вся группа, % Cumulative probability of grade III–IV acute GVHD within 100 days after HSCT, the entire cohort, %	22 (n = 14)	
Кумулятивная вероятность развития оРТПХ стадии III–IV до 100-го дня после ТГСК, группа деплеции, % Cumulative probability of grade III–IV acute GVHD within 100 days after HSCT, the group with cell depletion, %	13 (n = 7)	
Кумулятивная вероятность развития хрРТПХ в течение 1 года после ТГСК, вся группа, % Cumulative probability of chronic GVHD within a year after HSCT, the entire cohort, %	17 (n = 15)	
Кумулятивная вероятность смертности, связанной с трансплантацией, % Cumulative probability of transplant-related mortality, %	7,8 (ДИ ±5) 7.8 (CI ±5)	
БСВ, % Event-free survival, %	37 (ДИ ±10) 37 (CI ±10)	
КВР, % Cumulative probability of relapse, %	53 (ДИ ±10) 53 (CI ±10)	
КВР (> 15% бластов), % Cumulative probability of relapse (> 15% of blast cells), %	69 (95% ДИ 56–84) 69 (95% CI 56–84)	p = 0,002
КВР (< 15% бластов), % Cumulative probability of relapse (< 15% of blast cells), %	30 (95% ДИ 17–55) 30 (95% CI 17–55)	
КВР (количество НК-клеток выше медианы), % Cumulative probability of relapse (NK cell counts above the median), %	44 (95% ДИ 29–68) 44 (95% CI 29–68)	p = 0,013
КВР (количество НК-клеток ниже медианы), % Cumulative probability of relapse (NK cell counts below the median), %	77 (95% ДИ 61–96) 77 (95% CI 61–96)	

позволяет добиться существенной долгосрочной выживаемости в группе пациентов детского возраста с химиорезистентными ОМЛ. Пятилетняя ОВ и выживаемость без лейкемии составили 43 ± 13%, что абсолютно совпадает с аналогичным анализом, проведенным Р. О'Нэге и соавт. [5].

Также в исследовании Р. О'Нэге и соавт. повторяются результаты влияния на исход ТГСК опухолевой нагрузки перед циторедуктивной фазой трансплантации. В частности, мы показали, что пациенты с позитивной МОБ и бластозом до 15% при проведенной ТГСК достигли хорошей ОВ – 72 ± 18%, КВР в этой группе составила всего 32% (95% ДИ 17–55), статистически отличается от таковой у пациентов с бластозом более 15% перед началом кондиционирования – 69% (95% ДИ 57–84) (p = 0,002). Соотносится с нашим исследованием и отсутствие различий в результатах между пациентами с первичным рефрактерным и рецидивирующим рефрактерным заболеванием.

Однако при анализе нашей когорты незначимым оказывается возраст пациента, в то время как Р. О'Нэге и соавт. показывают важность этого параметра.

В нашем анализе не было выявлено корреляции исходной цитогенетики, оРТПХ и хрРТПХ с показателями выживаемости.

В анализируемой когорте 80% пациентов получили деплетированный продукт. В те годы платформа процессинга трансплантата широко использовалась в Центре для надежной профилактики РТПХ. Технология αβ-Т-клеточной деплеции была разработана в том числе в расчете на антилейкемический потенциал НК- и γδ-Т-клеток [19]. Ранняя экспансия и активация этих цитотоксических субпопуляций потенциально могут компенсировать недостаток аллореактивности обычных Т-лимфоцитов в противоопухолевом иммунитете.

Активация *in vivo* НК-клеток интерлейкином-15 [20] или непосредственное введение аликвот НК-клеток изучается как метод клеточной иммунотерапии для пациентов с ОМЛ. Было показано, что адаптивный перенос зрелых аллогенных НК-клеток безопасен и выполним, тогда как его эффективность требует дальнейшей оценки [21].

В нашем анализе было показано, что экспансия НК-клеток выше медианы в период +30 сут после ТГСК позитивно влияет на исход трансплантации. К сожалению, иммунофенотипирование не было сделано у всех пациентов когорты в декретированные сроки, поэтому оценка влияния данного параметра проводилась на меньшей группе. В анализ вошли 49 (71%) пациентов. Уровень НК-клеток (абсолютные

значения содержания были указаны в результатах) выше медианы отмечен среди пациентов, получивших ТГСК с процессированным трансплантатом. Для пациентов с абсолютным количеством НК-клеток выше медианы на +30-й день от ТГСК 5-летняя ОВ составила $56 \pm 19\%$. Для остальных пациентов когорты ОВ составила $31 \pm 19\%$.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящем исследовании показано, что у детей с рефрактерным ОМЛ выполнение аллогенной ТГСК позволяет достичь клинко-гематологической ремиссии в 86% случаев и долгосрочной ОВ около 40%. Среди факторов, влияющих на исход ТГСК, наиболее значимыми оказались размер остаточной популяции опухолевых клеток перед началом кондиционирования и содержание НК-клеток в крови на ранних сроках после ТГСК. Таким образом, при разработке новых протоколов ТГСК при рефрактерных ОМЛ целесообразно сосредоточиться на дополни-

тельной циторедукции перед началом кондиционирования и применении элементов клеточной терапии после ТГСК [22].

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Не указан.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

ORCID

Ilyushina M.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7652-7704>

Shelikhova L.N. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0520-5630>

Shasheleva D.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5641-8567>

Dunaykina M.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1384-1752>

Blagov S.L. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4767-5382>

Kurnikova E.E. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4767-5382>

Kalinina I.I. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0813-5626>

Muzalevsky Ya.O. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3513-8299>

Olshanskaya Yu.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2352-7716>

Kazakova A.N. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1085-4646>

Baydildina D.D. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7130-8596>

Balashov T.D. ORCID: <https://orcid.org/0009-0009-9438-8336>

Maschan A.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0016-6698>

Maschan M.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1735-0093>

Литература / References

1. Калинина И.И., Венёв Д.А., Ольшанская Ю.В., Садовская М.Н., Горонкова О.В., Салимова Т.Ю. и др. Результаты терапии детей с острым миелоидным лейкозом, получивших терапию по протоколу ОМЛ-ММ-2006. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2022; 21 (1): 20–35. DOI: 10.24287/1726-1708-2022-21-1-20-35 [Kalinina I.I., Venyov D.A., Olshanskaya Yu.V., Sadovskaya M.N., Goronkova O.V., Salimova T.Yu., et al. The outcomes of children with acute myeloid leukemia treated in accordance with the AML-MM-2006 protocol. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology 2022; 21 (1): 20–35. (In Russ.)].
2. Egan G., Tasian S.K. Relapsed pediatric acute myeloid leukaemia: state-of-the-art in 2023. Haematologica 2023; 108 (9): 2275–88. DOI: 10.3324/haematol.2022.281106
3. Malani D., Kumar A., Brück O., Kontro M., Yadav B., Hellesøy M., et al. Implementing a Functional Precision Medicine Tumor Board for Acute Myeloid Leukemia. Cancer Discov 2022; 12 (2): 388–401. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-21-0410
4. Rasche M., Zimmermann M., Steidel E., Alonzo T., Aplenc R., Bourquin J.-P., et al. Survival Following Relapse in Children with Acute Myeloid Leukemia: A Report from AML-BFM and COG. Cancers (Basel) 2021; 13 (10): 2336.
5. O'Hare P., Lucchini G., Cummins M., Veys P., Potter M., Lawson S., et al. Allogeneic stem cell transplantation for refractory acute myeloid leukemia in pediatric patients: the UK experience. Bone Marrow Transplant 2017; 52 (6): 825–31. DOI: 10.1038/bmt.2017.3
6. Масчан М.А. Деплеция альфа/бета-Т-лимфоцитов – надежная платформа для развития трансплантации гемопоэтических стволовых клеток от гаплоидентичных доноров. Российский журнал детской гематологии и онкологии 2015; 2 (3): 34–8. DOI: 10.17650/2311-1267-2015-2-3-34-38 [Maschan M.A. Depletion of alpha/beta-T-cells is a robust platform for haploidentical hematopoietic stem cell transplantation results improvement. Russian Journal of Pediatric Hematology and Oncology 2015; 2 (3): 34–8. (In Russ.)].
7. Filipovich A.H., Weisdorf D., Pavletic S., Socie G., Wingard J.R., Lee S.J., et al. National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease: I. Diagnosis and Staging Working Group Report. Biol Blood Marrow Transplant 2005; 11 (12): 945–56. DOI: 10.1016/j.bbmt.2005.09.004
8. Благов С.Л., Шелихова Л.Н., Осипова Е.Ю., Киселева В.В., Казаченок А.С., Шеховцова Ж.Б. и др. Применение инфузий Т-клеток памяти с целью профилактики вирусных инфекций у пациентов с гемобластозами, перенесших аллогенную трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток с деплецией α/β -Т-лимфоцитов. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2018; 17 (2): 9–20. DOI: 10.24287/1726-1708-2018-17-2-9-20 [Blagov S.L., Shelikhova L.N., Osipova E.Yu., Kiseleva V.V., Kazachenok A.S., Shekhovtsova Z.B., et al. Low dose donor memory T-cell infusion after TCR alpha/beta depleted stem cell transplantation for patients with malignant disorders. Pediatric Hematology/Oncology and Immu-

- nopathology 2018; 17 (2): 9–20. (In Russ.)).
9. Илюшина М.А., Шелихова Л.Н., Шашелева Д.А., Хисматуллина Р.Д., Шипицына И.П., Гутовская Е.И. и др. Применение малых доз децитабина с целью профилактики рецидива гемобластозов после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток: опыт одного центра. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2018; 17 (2): 59–68. DOI: 10.24287/1726-1708-2018-17-2-59-68 [Ilushina M.A., Shelikhova L.N., Shasheleva D.A., Khismatullina R.D., Shipitsina I.P., Gutovskaya E.I., et al. Low doses of decitabine for prevention of relapse after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a single-center experience. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology 2018; 17 (2): 59–68. (In Russ.)].
 10. Илюшина М.А., Шелихова Л.Н., Шашелева Д.А., Хисматуллина Р.Д., Благов С.Л., Масчан А.А., Масчан М.А. Опыт применения терапии 5-азацитидином, бортезомибом и вальпроевой кислотой в целях профилактики рецидива лейкемии у детей после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток на платформе деплеции $\alpha\beta$ -Т-лимфоцитов. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2022; 21 (2): 32–41. DOI: 10.24287/1726-1708-2022-21-2-32-41 [Ilushina M.A., Shelikhova L.N., Shasheleva D.A., Khismatullina R.D., Blagov S.L., Maschan A.A., Maschan M.A. Experience in the use of 5-azacytidine, bortezomib and valproic acid for the prevention of leukemia relapses in children after $\alpha\beta$ -T cell-depleted hematopoietic stem cell transplantation. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology 2022; 21 (2): 32–41. (In Russ.)].
 11. Шелихова Л.Н., Илюшина М.А., Семиглазова К.В., Шеховцова Ж.Б., Шашелева Д.А., Хисматуллина Р.Д. и др. Аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток от гаплоидентичного донора с TCR $\alpha\beta$ -деплецией у детей с химиорезистентным острым миелобластным лейкозом. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2019; 18 (2): 11–21. DOI: 10.24287/1726-1708-2019-18-2-11-21 [Shelikhova L.N., Ilushina M.A., Semiglazova K.V., Shekhovtsova Zh.B., Shasheleva D.A., Khismatullina R.D., et al. $\alpha\beta$ -T-cell-depleted haploidentical hematopoietic stem cell transplantation in children with chemorefractory acute myeloid leukemia. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology 2019; 18 (2): 11–21. (In Russ.)].
 12. Creutzig U., van den Heuvel-Eibrink M.M., Gibson B., Dworzak M.N., Adachi S., de Bont E., et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in children and adolescents: recommendations from an international expert panel. Blood 2012; 120 (16): 3187–205.
 13. Zwaan C.M., Kolb E.A., Reinhardt D., Abrahamsson J., Adachi S., Aplenc R., et al. Collaborative Efforts Driving Progress in Pediatric Acute Myeloid Leukemia. J Clin Oncol 2015; 33 (27): 2949–62.
 14. McCarthy A.J., Pitcher L.A., Hann I.M., Oakhill A. FLAG (Fludarabine, High-Dose Cytarabine, and G-CSF) for Refractory and High-Risk Relapsed Acute Leukemia in Children. Med Pediatr Oncol 1999; 32 (6): 411–5.
 15. Fleischhack G., Hasan C., Graf N., Mann G., Bode U. IDA-FLAG (idarubicin, fludarabine, cytarabine, G-CSF), an effective remission-induction therapy for poor-prognosis AML of childhood prior to allogeneic or autologous bone marrow transplantation: experiences of a phase II trial. Br J Haematol 1998; 102 (3): 647–55.
 16. Rubnitz J.E., Razzouk B.I., Lensing S., Pounds S., Pui C.-H., Ribeiro R.C. Prognostic factors and outcome of recurrence in childhood acute myeloid leukemia. Cancer 2007; 109 (1): 157–63.
 17. Karlsson L., Forestier E., Hasle H., Jahnukainen K., Jónsson Ó.G., Lausen B., et al. Outcome after intensive reinduction therapy and allogeneic stem cell transplant in paediatric relapsed acute myeloid leukaemia. Br J Haematol 2017; 178 (4): 592–602.
 18. Hoffman A.E., Schoonmade L.J., Kaspers G.J. Pediatric relapsed acute myeloid leukemia: a systematic review. Expert Rev Anticancer Ther 2021; 21 (1): 45–52.
 19. Handgretinger R. New approaches to graft engineering for haploidentical bone marrow transplantation. Semin Oncol 2012; 39 (6): 664–73.
 20. Romee R., Cooley S., Berrien-Elliott M.M., Westervelt P., Verneris M.R., Wagner J.E., et al. First-in-human phase 1 clinical study of the IL-15 superagonist complex ALT-803 to treat relapse after transplantation. Blood 2018; 131 (23): 2515–27.
 21. Handgretinger R., Lang P., André M.C. Exploitation of natural killer cells for the treatment of acute leukemia. Blood 2016; 127 (26): 3341–9.
 22. Pearson A.D.J., Zwaan C.M., Anders Kolb E., Karres D., Guillot J., Young Kim S., et al. Paediatric Strategy Forum for medicinal product development for acute myeloid leukaemia in children and adolescents: ACCELERATE in collaboration with the European Medicines Agency with participation of the Food and Drug Administration. Eur J Cancer 2020; 136: 116–29.

© 2024 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ
им. Дмитрия Рогачева»
Минздрава России
Поступила 11.03.2024
Принята к печати 08.04.2024



EDN: ZAOZMB

DOI: 10.24287/1726-1708-2024-23-2-26-33

Результаты трансплантации гемопозитических стволовых клеток при различных первичных иммунодефицитах с гемофагоцитарным лимфогистиоцитозом

А.К. Идармачева, А.Л. Лаберко, Э.Р. Султанова, Л.Н. Шелихова, В.В. Бриллиантова,
А.А. Масчан, Д.Н. Балашов, М.А. Масчан

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии
и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, Москва

Гемофагоцитарный синдром (ГФС) является основным клиническим синдромом у пациентов с семейными формами гемофагоцитарного лимфогистиоцитоза (ГЛГ), а также может быть одним из важных фенотипических проявлений при некоторых других первичных иммунодефицитах (ПИД). Аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) является «золотым стандартом» терапии таких заболеваний. В работе проанализированы исходы аллогенной ТГСК у пациентов с различными ПИД с ГФС. Исследование одобрено независимым этическим комитетом и утверждено решением ученого совета НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева. С 2012 по 2020 г. в НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева ТГСК была проведена 314 пациентам с различными ПИД. Из них 44 имели ГФС до ТГСК и были разделены на 2 группы: «Семейный ГЛГ» – с установленным генетическим вариантом или типичной клинической картиной семейного ГЛГ ($n = 24$) и «Другие ГЛГ» – при других верифицированных ПИД ($n = 20$). Инфекционные проблемы до ТГСК регистрировались в обеих группах, тогда как воспалительные заболевания кишечника, иммунная цитопения, артриты и васкулиты наблюдались только в группе «Другие ГЛГ». Медиана возраста пациентов на момент проведения ТГСК составляла 2 года в обеих группах. Применялись режимы кондиционирования с 1 или 2 алкилирующими агентами, а также серотерапия. В качестве источника гемопоэтических стволовых клеток периферическая кровь с $TCR\alpha\beta^+/CD19^+$ -деплецией трансплантата использовалась у 41 пациента, а неманипулированный костный мозг – у 3. Медиана времени наблюдения составила 6,9 года в группе «Семейный ГЛГ» и 4,3 года в группе «Другие ГЛГ» ($p = 0,012$). Частота недостаточности трансплантата (НТ; первичное неприживление и отторжение) в группе «Семейный ГЛГ» составила 0,08 (95% доверительный интервал (ДИ) 0,02–0,31) против 0,25 (95% ДИ 0,12–0,53) в группе «Другие ГЛГ» ($p = 0,12$). Между группами не наблюдалось существенных различий в частоте острой и хронической реакции «трансплантат против хозяина» и реактивации вирусных инфекций. Общая выживаемость составила 0,92 (95% ДИ 0,8–1,0) в группе «Семейный ГЛГ» и 0,85 (95% ДИ 0,69–1,0) в группе «Другие ГЛГ» ($p = 0,5$). Бессобытийная выживаемость (за события принимались НТ, отсутствие контроля над ГЛГ на фоне смешанного химеризма и смерть) составила 0,83 (95% ДИ 0,68–0,98) и 0,65 (95% ДИ 0,44–0,85) соответственно ($p = 0,17$). Пациенты с ГФС в рамках ПИД по сравнению с семейными формами ГЛГ имели более низкую бессобытийную выживаемость с более высоким риском НТ и риском потери контроля над заболеванием при смешанном химеризме.

Ключевые слова: гемофагоцитарный синдром, гемофагоцитарный лимфогистиоцитоз, первичные иммунодефициты, трансплантация гемопоэтических стволовых клеток, реакция «трансплантат против хозяина», недостаточность трансплантата

Идармачева А.К. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2024; 23 (2): 26–33. DOI: 10.24287/1726-1708-2024-23-2-26-33

The results of allogenic hematopoietic stem cell transplantation in primary immunodeficiencies with hemophagocytic lymphohistiocytosis

A.K. Idarmacheva, A.L. Laberko, E.R. Sultanova, L.N. Shelikhova, V.V. Brilliantova, A.A. Maschan,
D.N. Balashov, M.A. Maschan

Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology of Ministry of Healthcare
of the Russian Federation, Moscow

© 2024 by «D. Rogachev NMRCPOI»

Received 11.03.2024
Accepted 08.04.2024

Hemophagocytic syndrome is the primary clinical manifestation in patients with familial hemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH) and may also occur as a phenotypic manifestation of other primary immunodeficiencies (PIDs). Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) is a gold standard therapy for both. In our study, we analyzed the results of HSCT in patients with PIDs associated with HLH. The study was approved by the Independent Ethics Committee and the Scientific Council of the Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology. Out of 314 patients with various PIDs who had undergone HSCT at the Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology between 2012 and 2020, 44 patients diagnosed with HLH before HSCT were included in our study. They were divided into 2 groups: familial HLH group (patients with defined genetic abnormalities or with typical clinical presentation of familial HLH, $n = 24$) and Other HLH group (verified cases of other PIDs, $n = 20$). Pre-HSCT infections occurred in both groups, while inflammatory bowel disease, immune cytopenia, arthritis, and vasculitis were observed only in the Other HLH group. The median age at HSCT was 2 years in both groups. Conditioning regimens included one or two alkylators and serotherapy. Peripheral blood with TCR $\alpha\beta^+$ /CD19 $^+$ graft depletion was used in 41 patients and native bone marrow in 3 patients. The median time of follow-up was 6.9 years in the familial HLH group and 4.3 years in the Other HLH group ($p = 0.012$). The rate of graft failure (non-engraftment or rejection) in the familial HLH group was 0.08 (95% confidence interval (CI) 0.02–0.31) vs 0.25 (95% CI 0.12–0.53) in the Other HLH group ($p = 0.12$). No significant differences in the rates of acute and chronic graft-versus-host-disease and viral reactivations were seen between the groups. The overall survival was 0.92 (95% CI 0.8–1.0) in the familial HLH group and 0.85 (95% CI 0.69–1.0) in the Other HLH group ($p = 0.5$). The event-free survival (where an event was defined as graft failure, lack of control of HLH in patients with mixed chimerism or death) was 0.83 (95% CI 0.68–0.98) and 0.65 (95% CI 0.44–0.85), respectively ($p = 0.17$). The patients with PID presenting with hemophagocytic syndrome had lower event-free survival rates and higher risks of graft failure and loss of disease control in mixed chimerism than the patients with familial HLH.

Key words: hemophagocytic syndrome, hemophagocytic lymphohistiocytosis, primary immunodeficiencies, hematopoietic stem cell transplantation, graft-versus-host disease, graft failure

Idarmacheva A.K., et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology 2024; 23 (2): 26–33.
DOI: 10.24287/1726-1708-2024-23-2-26-33

Гемофагоцитарный синдром (ГФС) – это клинический синдром, являющийся результатом дисрегуляции цитотоксических лимфоцитов и натуральных киллеров, приводящий к избыточной продукции провоспалительных цитокинов, активации макрофагов и фагоцитозу клеток крови [1, 2]. По этиопатогенезу ГФС классифицируется как первичный – генетически обусловленный гемофагоцитарный лимфогистиоцитоз (ГЛГ) и вторичный – приобретенный в результате других заболеваний (аутоиммунных, инфекционных, онкологических и др.) [2]. К генетическим вариантам ГФС относят группу первичных иммунодефицитов (ПИД), среди которых выделяют семейные формы ГЛГ (дефекты *PRF1*, *UNC13D*, *STX11*, *STXBP2* или синдромы Чедиака–Хигаши и Грисцелли), где наиболее часто ГФС является основным проявлением заболевания, или другие ПИД, где ГФС является лишь одним из проявлений заболевания (Х-сцепленный лимфопролиферативный синдром (ХЛПС), аутовоспалительные заболевания) [3].

В 2007 г. были сформулированы клинико-лабораторные критерии, при наличии 5 и более из которых, или при подтвержденном генетическом дефекте устанавливался ГФС [4]. Такими критериями являются лихорадка выше 38,5°C более 7 дней, спленомегалия, цитопения с поражением 2 ростков кроветворения и более, гипертриглицеридемия выше 3 ммоль/л и/или гипофибриногенемия ниже 1,5 г/л, гиперферритинемия выше 500 нг/мл, морфологическая картина гемофагоцитоза в биоптатах костного мозга, селезенки или лимфоузлов в отсутствие признаков злокачественной опухоли, низкая или отсутствующая активность натуральных киллеров периферической крови и повышение концентрации растворимой молекулы CD25 ≥ 2400 Ед/мл в сыворотке крови.

В отличие от заболеваний с нарушением клеточной цитотоксичности при семейных формах

ГЛГ для других ПИД с предрасположенностью к ГФС помимо ГЛГ может быть характерно развитие других аутоиммунных и аутовоспалительных процессов: воспалительные заболевания кишечника, артриты, иммунные цитопении, васкулиты.

Для терапии ГФС применяются различные режимы, основанные на комбинации иммуносупрессивной терапии (ИСТ) разнонаправленного действия, например, широко распространенные в клинической практике протоколы HLH-1994/2004 [5]. В настоящее время распространение при ГФС получила таргетная терапия, направленная на блокаду провоспалительных цитокинов [5]. Однако в связи с высоким риском рецидива в качестве единственного радикального метода терапии ГЛГ для генетически обусловленных и рефрактерных форм проводится аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК).

Многие исследователи объединяют результаты ТГСК при семейных формах ГЛГ с ХЛПС и другими генетически детерминированными ПИД [6], однако данный подход может быть неоправданным ввиду различных механизмов развития заболеваний, и, как следствие, ассоциированных с ТГСК рисков. Так, некоторые исследования показывают, что для семейных форм ГЛГ достаточно 30% донорского химеризма для поддержания ремиссии заболевания после ТГСК [7], в то время как риск отторжения и потери контроля над ГЛГ при ХЛПС 2-го типа является достаточно высоким [8].

В данной работе проанализированы результаты ТГСК пациентов с ПИД, ассоциированными с ГФС (семейными ГЛГ в сравнении с другими ПИД) в НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева. Исследование одобрено независимым этическим комитетом и утверждено решением ученого совета Центра им. Дмитрия Рогачева.

Correspondence:

Aishat K. Idarmacheva, a research technician at the Department of Treatment and Prophylaxis Optimization for Hematopoietic Stem Cell Transplantation associated Complications at the Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology of Ministry of Healthcare of the Russian Federation
Address: 1 Samory Mashela St., Moscow 117997, Russia
E-mail: aishatkantulaeva@gmail.com

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

С 2012 по 2020 г. в НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева 314 пациентам с различными ПИД проведена первая аллогенная ТГСК, у 44 из них на основании вышеперечисленных критериев был диагностирован ГФС до трансплантации. Все пациенты с манифестацией ГФС до ТГСК были разделены на 2 группы: «Семейный ГЛГ» – с установленным генетическим вариантом или типичной клинической картиной семейного ГЛГ [3] ($n = 24$) и «Другие ГЛГ» – пациенты с другими установленными или неуточненными ПИД ($n = 20$) (таблица). Медиана возраста пациентов на момент ТГСК в обеих группах составила 2 года (разброс 0,36–15,67 года и 0,46–12,38 года соответственно; $p = 0,89$).

Молекулярно-генетическая верификация диагноза проводилась методом прямого бидирекционного секвенирования по Сэнгеру или секвенированием нового поколения в панелях генов иммунодефицитов или клинического экзома.

Все пациенты до ТГСК получали терапию по протоколу HLH-2004 в составе полного протокола или модифицированного с заменой препаратов или добавлением таргетной терапии. При этом активное течение ГФС (отсутствие ремиссии на фоне проводимой терапии) на момент ТГСК по критериям HLH-2004 было констатировано у 9 из 44 пациентов (таблица).

Инфекции различного генеза встречались у всех пациентов в обеих группах, при этом аутоиммунные и аутовоспалительные проявления (воспалительные заболевания кишечника, васкулиты, иммунные цитопении, артриты) – только в группе «Другие ГЛГ» (таблица).

У 12 пациентов использовался режим кондиционирования в составе треоосульфана 36 и 42 г/м², флударабина 150 мг/м². У 30 пациентов в дополнение к треоосульфану и флударабину использовался второй алкилирующий препарат в кондиционировании: тиотепа 10 мг/кг ($n = 24$) или мелфалан 140 мг/м² ($n = 7$), или циклофосфамид 120 мг/кг ($n = 1$). У 1 пациента в качестве дополнительного агента был использован вепезид в дозе 60 мг/кг. Все пациенты получали серотерапию (кроличий анти-тимоцитарный глобулин 5–10 мг/кг ($n = 37$), лошадиный анти-тимоцитарный глобулин 80–100 мг/кг ($n = 4$), алемтузумаб 0,4–1 мг/кг ($n = 3$)). В качестве источника стволовых клеток использовалась периферическая кровь с TCR $\alpha\beta$ /CD19⁺-деплецией трансплантата ($n = 41$) или неманипулированный костный мозг ($n = 3$) от HLA-совместимых неродственных ($n = 22$), гаплоидентичных родственных ($n = 16$) и HLA-совместимых родственных ($n = 6$) доноров. ИСТ

для профилактики реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ) получили 37 пациентов, в состав входили ингибиторы кальциневрина (циклоспорин А, такролимус; $n = 27$) и другие препараты (абатацепт, мофетила микофенолат, руксолитиниб, тоцилизумаб, эмапалумаб, бортезомиб; $n = 10$), у 7 пациентов ИСТ не проводилась. Сравнение характеристик подходов к ТГСК в различных группах ПИД представлено в таблице.

Приживление трансплантата регистрировалось в первый из 3 последующих дней, когда уровень нейтрофилов в периферической крови достигал значений более $0,5 \times 10^9/\text{л}$. За неприживление трансплантата принималось отсутствие лабораторных признаков приживления до +30-го дня и/или собственный общий химеризм более 90% на +30-й день после ТГСК. Отторжение трансплантата регистрировалось при наличии более 90% собственных клеток по результатам исследования химеризма в периферической крови или костном мозге после зарегистрированного ранее приживления трансплантата на основании существующих критериев. За недостаточность трансплантата (НТ) принимались случаи его неприживления или отторжения. Химеризм клеток (общий – в периферической крови или костном мозге и линейный – в Т-, В- или миелоидных лимфоцитах) у реципиентов после ТГСК оценивался молекулярно-генетическим методом с определением коротких tandemных повторов ДНК с помощью полимеразной цепной реакции на +30, +60, +90, +180, +360-е сутки после ТГСК [9]. За полный донорский химеризм принимался общий химеризм, где определялось более 90% донорских клеток, за смешанный химеризм – общий химеризм, где определялось более 10%, но менее 90% донорских клеток, за собственный – общий химеризм, когда определялось менее 10% клеток донорского происхождения.

Потерей контроля над ГФС являлось появление 5 из 8 признаков ГФС после ТГСК при отсутствии данных за НТ.

Диагностика и стадирование острой и хронической РТПХ проводились в соответствии со стандартными опубликованными критериями [10, 11].

Оценка риска развития НТ, острой и хронической РТПХ, реактивации вирусных инфекций проводилась методом кумулятивной вероятности с учетом конкурирующих событий с указанием 95% доверительного интервала (ДИ). Анализ у пациентов без событий ограничивался последним наблюдением (декабрь 2022 г.). Вероятность общей и бессобытийной выживаемости оценивалась по методу Каплана–Майера на момент последнего наблюдения или смерти/события. За событие при анализе бессобытийной выживаемости принимались НТ, отсутствие контроля над ГФС у пациентов со смешанным химеризмом или смерть после ТГСК.

Таблица
Характеристика групп пациентов и подходов к ТГСК

Tables
The patient characteristics and hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) approaches

Параметр Parameter	Группа Groups		
	«Семейный ГЛГ» (n = 24) Familial HLH (n = 24)	«Другие ГЛГ» (n = 20) Other HLH (n = 20)	
Характеристика групп Group characteristics			
Генетические варианты/клинические формы Genetic variants/clinical presentation	Дефицит MUNC13-4 (UNC13D) (n = 9) MUNC13-4 deficiency (UNC13D) (n = 9)	ХЛПС 2-го типа (BIRC4) (n = 9) XLP2 (BIRC4) (n = 9)	
	Дефицит MUNC18-2 (STXBP2) (n = 2) MUNC18-2 deficiency (STXBP2) (n = 2)	Синдром PAMI (PSTPIP1) (n = 2) PAMI syndrome (PSTPIP1) (n = 2)	
	Синдром Чедиака–Хигаши (LYST) (n = 2) Chediak–Higashi syndrome (LYST) (n = 2)	Дефект STAT1-GOF (STAT1) (n = 1) STAT1 GOF defect (STAT1) (n = 1)	
	Синдром Грисцелли (RAB27A) (n = 1) Griscelli syndrome (RAB27A) (n = 1)	Неуточненные ПИД (n = 8) Unspecified PID (n = 8)	
	Неуточненный ГЛГ (n = 10) Unspecified HLH (n = 10)		
Медиана возраста пациентов на момент манифестации ГЛГ, годы (p = 0,93) The median age at HLH onset, years (p = 0.93)	1,13 (0,06–14,96)	1,1 (0,07–11,2)	
Медиана времени от реактивации ГЛГ до ТГСК, годы (p = 0,017) The median time from HLH onset to HSCT, years (p = 0.017)	0,64 (0,04–3,95)	0,39 (0,18–11,93)	
Активный ГЛГ на момент ТГСК, n Active HLH at the time of HSCT, n	4	5	
Инфекционные заболевания до ТГСК Infectious diseases before HSCT	Вирусные (n = 15) Viral (n = 15)	Вирусные (n = 15) Viral (n = 15)	
	Бактериальные (n = 14) Bacterial (n = 14)	Бактериальные (n = 14) Bacterial (n = 14)	
	Грибковые (n = 4) Fungal (n = 4)	Грибковые (n = 4) Fungal (n = 4)	
Аутоиммунные или аутовоспалительные заболевания до ТГСК Autoimmune and autoinflammatory diseases before HSCT	Нет None	Воспалительные заболевания кишечника (n = 11) Inflammatory bowel diseases (n = 11)	
		Иммунная цитопения (n = 7) Immune cytopenia (n = 7)	
		Артрит (n = 5) Arthritis (n = 5)	
	Васкулит (n = 3) Vasculitis (n = 3)		
Характеристика подхода к ТГСК HSCT approach			
Донор, n (p = 0,22) Donor, n (p = 0.22)	Совместимый неродственный Matched unrelated	14	8
	Гаплоидентичный родственный Haploidentical related	6	10
	Совместимый родственный Matched related	4	2
Кондиционирование, n (p = 0,173) Conditioning regimen, n (p = 0.173)	1 алкилятор 1 alkylating agent	9	3
	2 алкилятора 2 alkylating agent	15	17*
Посттрансплантационная иммуносупрессия, n (p = 0,04) Post-transplant immunosuppression, n (p = 0.04)	Да Yes	23	14
	Нет No	1	6
Источник стволовых клеток, n (p = 1) Stem cell source, n (p = 1)	Костный мозг Bone marrow	2	1
	ПСКК с TCRαβ ⁺ /CD19 ⁺ -деплецией TCRαβ ⁺ /CD19 ⁺ -depleted PBSC	22	19

Примечание. Синдром PAMI – PSTPIP1-ассоциированный миелоидно-связанная воспалительная протеинемия; * – 1 пациент получил этопозид. ПСКК – периферические стволовые клетки крови.
Note. PAMI syndrome – PSTPIP1-associated myeloid-related proteinemia inflammatory syndrome; * – 1 patient received etoposide; XLP2 – X-linked lymphoproliferative syndrome type 2; HLH – hemophagocytic lymphohistiocytosis; PID – primary immunodeficiency; PBSC – peripheral blood stem cell.

Сравнение результатов общей и бессобытийной выживаемости, неприживления и отторжения трансплантата между группами пациентов проводилось с использованием теста log-rank. Для сравнения непараметрических показателей был использован U-тест Манна–Уитни. Различия между сравниваемыми параметрами считались статистически значимыми при p -value < 0,05. Статистическая обработка полученных данных проводилась с помощью программы XLSTAT 2023 (Lumivero, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Медиана времени наблюдения за пациентами составила 6,85 (разброс 1,91–10,6) года при семейном ГЛГ и 4,25 (разброс 2,4–10,0) года при других ГЛГ ($p = 0,012$). Приживление трансплантата было констатировано у 42 (96%) из 44 пациентов. Медиана приживления нейтрофилов составила 12,5 (разброс 9–33) дней в группе с семейными ГЛГ и 14 (разброс 9–33) дней в группе с другими ГЛГ.

Неприживление трансплантата верифицировано у 1 пациента с неуточненным ГЛГ из группы «Семейный ГЛГ» и у 1 пациента с неуточненным ПИД из группы «Другие ГЛГ». Отторжение трансплантата зарегистрировано у 5 из 44 пациентов: у 1 из группы «Семейный ГЛГ» и у 4 из группы «Другие ГЛГ». Таким образом, частота НТ при семейных ГЛГ составила 0,08 (95% ДИ 0,02–0,31) против 0,25 (95% ДИ 0,12–0,53) при других ГЛГ ($p = 0,12$) (рисунки 1А). Медиана времени НТ составила 0,1 и 0,15 года ($p = 0,011$).

Кумулятивная вероятность развития НТ у пациентов, трансплантированных в ремиссии ГФС, составила 0,11 (95% ДИ 0,05–0,29), в стадии активного заболевания – 0,33 (0,13–0,84) ($p = 0,1$) (рисунки 1Б).

Кумулятивная вероятность острой РТПХ II–IV стадии составила 0,21 (95% ДИ 0,1–0,45) в группе «Семейный ГЛГ» и 0,25 (95% ДИ 0,12–0,52) в группе

«Другие ГЛГ» ($p = 0,012$). Острая РТПХ в группе «Семейный ГЛГ» была представлена II стадией у 4 пациентов и III стадией – у 1. У 2 пациентов в дальнейшем развилась ограниченная хроническая РТПХ. В группе «Другие ГЛГ» у всех пациентов констатирована острая РТПХ II стадии.

Риск развития хронической РТПХ в группе «Семейный ГЛГ» составил 0,12 (95% ДИ 0,07–0,4), в группе «Другие ГЛГ» – 0,1 (95% ДИ 0,03–0,4) ($p = 0,78$). В группе «Семейный ГЛГ» у 2 пациентов констатирована ограниченная форма хронической РТПХ, в группе «Другие ГЛГ» у 2 пациентов – экстенсивная форма.

Реактивация цитомегаловирусной (ЦМВ) инфекции отмечалась у 20 из 44 пациентов, включенных в исследование: у 10 в группе «Семейный ГЛГ» и у 10 в группе «Другие ГЛГ». Вероятность развития реактивации ЦМВ-инфекции составила 0,42 (95% ДИ 0,26–0,67) в группе «Семейный ГЛГ» и 0,5 (95% ДИ 0,32–0,78) в группе «Другие ГЛГ» ($p = 0,43$). В группе «Семейный ГЛГ» у всех 10 пациентов отмечалась виремия, у 1 из них в сочетании с ретинитом, у 1 – с пневмонией и у 1 – с ретинитом и пневмонией. В группе «Другие ГЛГ» виремия констатирована у 9 из 10 пациентов, у 2 из них отмечался ретинит, у 1 – пневмония, у 1 – пневмония и колит, у 1 – ретинит и колит, у 1 – изолированная ЦМВ-пневмония. ЦМВ-инфекция была причиной смерти у 3 пациентов (1 из группы «Семейный ГЛГ» и 2 из группы «Другие ГЛГ»).

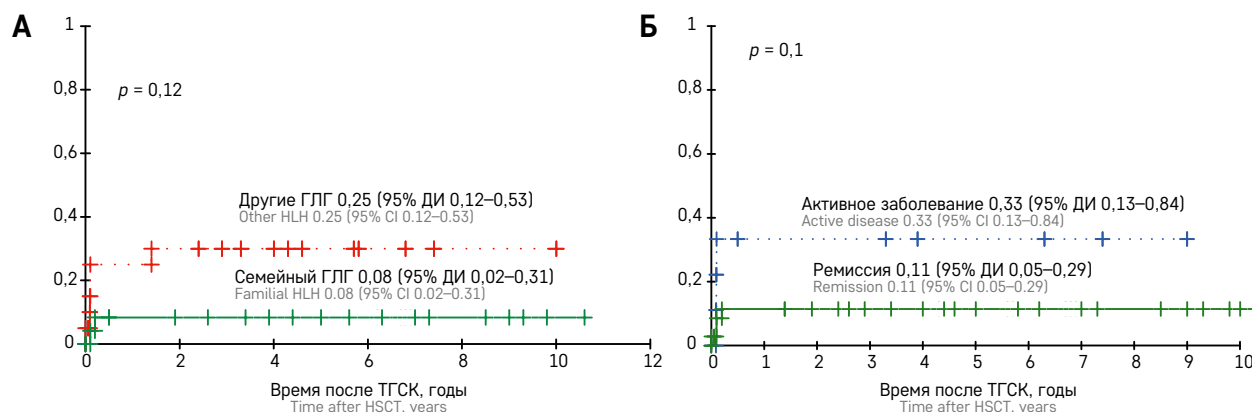
Реактивация вирусной инфекции Эпштейна–Барр отмечалась у 5 из 44 пациентов, ни один случай реактивации не привел к развитию посттрансплантационного лимфопролиферативного заболевания, соответственно, не требовал назначения терапии. Реактивация герпес-вируса 6-го типа отмечалась у 12 пациентов, у 2 из них проводилась противовирусная терапия. Аденовирусная реактивация выявлена у

Рисунок 1

Кумулятивная вероятность НТ в группах «Семейный ГЛГ» и «Другие ГЛГ» (А) и у пациентов, трансплантированных в активной стадии и в ремиссии (Б)

Figure 1

The cumulative probability of graft failure in the Familial HLH group and Other HLH group (A), and in the patients transplanted in active disease and in remission (B)



10 пациентов из всей изучаемой группы, 4 случая требовали проведения противовирусной терапии.

В группе «Семейный ГЛГ» на момент последнего наблюдения у 10 (50%) пациентов сохранялся полный донорский химеризм, у 7 (35%) – смешанный химеризм и 2 пациента имели 27% донорских клеток по результатам оценки общего химеризма, что в соответствии с имеющимися данными является критерием высокого риска реактивации ГЛГ [7]. При этом у всех пациентов сохранялась ремиссия основного заболевания. В группе «Другие ГЛГ» 13 (65%) пациентов имели полный донорский химеризм. У 1 пациента с ХЛПС 2-го типа в группе «Другие ГЛГ» на фоне смешанного общего химеризма (59% собственных клеток) зарегистрирована реактивация ГФС, а также активация воспалительного заболевания кишечника и иммунная тромбоцитопения. В связи с отсутствием контроля заболевания на фоне потери функции трансплантата запланирована повторная ТГСК.

Повторная ТГСК в группе «Семейный ГЛГ» проведена 2 пациентам, на момент последнего наблюдения оба имеют полный донорский химеризм. В группе «Другие ГЛГ» повторная ТГСК проведена 5 пациентам: 1 пациент в стабильном состоянии, имеет полный донорский химеризм, в 1 случае зарегистрировано повторное отторжение трансплантата, у 1 ребенка с ХЛПС 2-го типа отмечалось развитие реактивации воспалительного заболевания кишечника на фоне смешанного химеризма без реактивации ГФС, 2 человека умерли после повторной ТГСК.

Общая выживаемость пациентов после ТГСК составила 0,92 (95% ДИ 0,8–1,0) в группе «Семейный ГЛГ» и 0,85 (95% ДИ 0,69–1,0) в группе «Другие ГЛГ» ($p = 0,5$) (рисунок 2А). После первой ТГСК умерли 2 пациента в группе «Семейный ГЛГ» и 1 ребенок с ХЛПС 2-го типа из группы «Другие ГЛГ», 2 пациента – после повторной ТГСК. Причиной смерти во всех 5 случаях являлись инфекционные осложнения.

Бессобытийная выживаемость составила 0,83 (95% ДИ 0,68–0,98) в группе «Семейный ГЛГ» и 0,65 (95% ДИ 0,44–0,85) в группе «Другие ГЛГ» ($p = 0,17$) (рисунок 2Б). Среди семейных ГЛГ 2 пациента умерли после 1-й ТГСК, в 2 случаях развилась НТ. В группе «Другие ГЛГ» 1 пациент умер после ТГСК, у 5 развилась НТ и у 1 ребенка с ХЛПС 2-го типа был потерян контроль над основным заболеванием на фоне смешанного химеризма.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

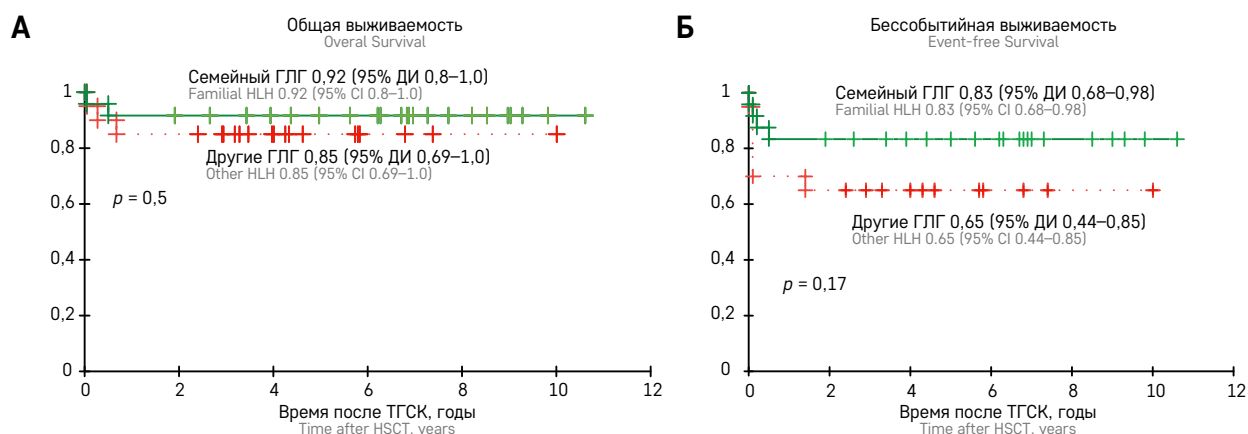
ГЛГ в зависимости от механизма развития, клинического течения и особенностей ответа на консервативную терапию – это гетерогенный синдром. В данном исследовании проводилось сравнение 2 групп пациентов: с классическими проявлениями семейного ГЛГ и другими ПИД с ГФС, у которых клинический фенотип проявлялся не только проявлениями ГФС, но и рядом других проблем, в частности воспалительными заболеваниями кишечника, иммунной цитопенией, васкулитами и/или артритом [12].

В нашем исследовании между группами не наблюдалось существенных различий в вероятности приживления трансплантата, развития острой и хронической РТПХ, а также реактивации вирусных инфекций. По всей видимости, это связано с технологией ТГСК.

Благодаря $\text{TCR}\alpha\beta^+/\text{CD}19^+$ -деплеции трансплантата удалось уменьшить тяжесть и риск развития РТПХ: не было выявлено острой РТПХ IV стадии, наблюдалась низкая частота развития хронической РТПХ (9% пациентов), а также отсутствовали случаи летального исхода, ассоциированные с данным осложнением. Ранее мы публиковали результаты ТГСК с $\text{TCR}\alpha\beta^+$ -деплецией у пациентов с ГФС [13], куда вошли часть пациентов из текущего исследования.

Рисунок 2
Общая (А) и бессобытийная (Б) выживаемость в группах «Семейный ГЛГ» и «Другие ГЛГ»

Figure 2
The overall (A) and event-free (Б) survival rates in the Familial HLH group and Other HLH group



Важным фактором, влияющим на результат ТГСК при ГФС, является активность процесса на момент ТГСК [6], так как активное течение заболевания на момент трансплантации предрасполагает к более высоким рискам НТ (неприживление + отторжение). В исследуемой когорте НТ констатирована чаще у пациентов, имеющих активное заболевание на момент ТГСК: при проведении трансплантации в состоянии ремиссии вероятность НТ составила 0,11, в то время как при отсутствии полного контроля ГФС – 0,33 ($p = 0,1$), вне зависимости от генетической формы в момент активного ГФС.

Интересным в исследовании оказался уровень контроля заболевания на фоне смешанного химеризма в разных группах пациентов. Так, в группе «Семейный ГЛГ» у 2 пациентов отмечалось снижение донорской фракции клеток до 27% в общем химеризме, но при этом отсутствовали признаки реактивации заболевания. В то же время пациент с ХЛПС 2-го типа из группы «Другие ГЛГ» имел 41% общего донорского химеризма и реактивацию ГФС на этом фоне. По данным Wustrau и соавт. [7], уровень общего химеризма 30% является достаточным для поддержания ремиссии при семейном ГЛГ, уровень же химеризма, достаточный для контроля ХЛПС 2-го типа, в настоящее время не исследован.

В группе «Другие ГЛГ», где доминирующее число пациентов были с ХЛПС 2-го типа, частота НТ встречалась в 3 раза чаще, чем в группе «Семейный ГЛГ» ($p = 0,12$). В группу «Другие ГЛГ» вошли 9 пациентов с ХЛПС 2-го типа, среди которых у 4 отмечалось развитие НТ, у 1 – отсутствие контроля ГФС и у 1 – колит на фоне смешанного химеризма, что говорит о более высоких рисках потери функции трансплантата у пациентов с этим диагнозом [8].

Миелоаблативное кондиционирование может быть эффективным методом профилактики НТ и смешанного химеризма у пациентов с ГЛГ. Однако такой подход у пациентов с ХЛПС 2-го типа может привести к повышению рисков токсичности ТГСК, снижающих выживаемость данной группы пациентов [8, 14].

Бессобытийная выживаемость в группе «Другие ГЛГ» оказалась ниже (0,65 против 0,83) за счет

более высокой частоты НТ и потери функции трансплантата на фоне смешанного химеризма, разница не оказалась статистически достоверной ($p = 0,17$). Несколько ниже в группе «Другие ГЛГ» оказалась и общая выживаемость (0,85 против 0,93; $p = 0,5$), что, вероятно, связано с повторными ТГСК ($n = 2$) и ассоциированными дополнительными рисками технологии [15]. В схожем исследовании A.S. Dain и соавт. в анализе на 23 пациентах с 4-летним периодом наблюдения получили почти двукратную разницу в выживаемости и реактивации заболевания между классическими и атипичными ГЛГ [16]. Исследование ограничено небольшими группами пациентов с этим редким диагнозом, что имеет влияние на статистическую достоверность.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное нами исследование показывает, что пациенты с другими генетически детерминированными формами ГФС, в отличие от семейных, имеют более высокие риски развития НТ, отсутствие контроля над заболеванием на фоне смешанного химеризма, а также риск смерти, ассоциированный с повторной трансплантацией. Более подробное изучение факторов, лежащих в основе заболеваний и влияющих на результаты ТГСК при ПИД с ГФС, позволит разработать более эффективные подходы к трансплантации у таких пациентов.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Не указан.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

ORCID

Idarmacheva A.K. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5962-1264>

Laberko A.L. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2354-2588>

Sultanova E.R. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0319-3699>

Brilliantova V.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0079-7761>

Shelikhova L.N. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0520-5630>

Maschan A.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0016-6698>

Balashov D.N. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2689-0569>

Maschan M.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0016-6698>

Литература / References

1. Canna S.W., Marsh R.A. Pediatric hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Blood* 2020; 135 (16): 1332–43.
2. Steen E.A., Nichols K.E., Meyer L.K. Insights into the cellular pathophysiology of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Front Immunol* 2023; 14: 1147603.
3. Bousfiha A., Moundir A., Tangye S.G., Picard C., Jeddane L., Al-Herz W., et al. The 2022 Update of IUIS Phenotypical Classification for Human Inborn Errors of Immunity. *J Clin Immunol* 2022; 42 (7): 1508–20.
4. Henter J.I., Horne A., Aricó M., Egeler R.M., Filipovich A.H., Imashuku S., et al. HLH-2004: Diagnostic and therapeutic guidelines for hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Pediatr Blood Cancer* 2007; 48 (2): 124–31.
5. Henderson L.A., Degar B.A. HLH treatment: smarter, not harder. *Blood* 2022; 139 (24): 3453–5.
6. Bergsten E., Horne A., Hed Myrberg I., Aricó M., Astigarraga I., Ishii E., et al. Stem cell transplantation for children with hemophagocytic lymphohistiocytosis: results from the HLH-2004 study. *Blood Adv* 2020; 4 (15): 3754–66.
7. Wustrau K., Greil J., Sykora K.W., Albert M.H., Burkhardt B., Lang P., et al. Risk factors for mixed chimerism in children with hemophagocytic lymphohistiocytosis after reduced toxicity conditioning. *Pediatr Blood Cancer* 2020; 67 (9): e28523.
8. Yang L., Booth C., Speckmann C., Seidel M.G., Worth A.J.J., Kindle G., et al. Phenotype, genotype, treatment, and survival outcomes in patients with X-linked inhibitor of apoptosis deficiency. *J Allergy Clin Immunol* 2022; 150 (2): 456–66.
9. Блау О.В. Химеризм после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток. Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика 2013; 6 (1): 34–9. [Blau O.V. chimerism following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Clinical Oncohematology. Basic Research and Clinical Practice* 2013; 6 (1): 34–9. (In Russ.)].
10. Jagasia M.H., Greinix H.T., Arora M., Williams K.M., Wolff D., Cowen E.W., et al. National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease: I. The 2014 Diagnosis and Staging Working Group report. *Biol Blood Marrow Transplant* 2015; 21 (3): 389–401.e1.
11. Arora M., Cutler C.S., Jagasia M.H., Pidala J., Chai X., Martin P.J., et al. Late Acute and Chronic Graft-versus-Host Disease after Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2016; 22 (3): 449–55.
12. Tesi B., Bryceson Y.T. HLH: genomics illuminates pathophysiological diversity. *Blood* 2018; 132 (1): 5–7.
13. Кантулаева А.К., Гутовская Е.И., Лаберко А.Л., Радыгина С.А., Козловская С.Н., Лившиц А.М. и др. Аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток с процессингом трансплантата TCRαβ⁺/CD19⁺-деплецией у детей с генетически обусловленными формами гемофагоцитарного лимфогистиоцитоза. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2020; 19 (2): 38–45. DOI: 10.24287/1726-1708-2020-19-2-38-45 [Kantulaeva A.K., Gutovskaya E.I., Laberko A.L., Radygina S.A., Kozlovskaya S.N., Livshits A.M., et al. Hematopoietic stem cell transplantation with TCRαβ⁺/CD19⁺ graft depletion for hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology* 2020; 19 (2): 38–45. (In Russ.)].
14. Arnold D.E., Nofal R., Wakefield C., Lehmborg K., Wustrau K., Albert M.H., et al. Reduced-Intensity/Reduced-Toxicity Conditioning Approaches Are Tolerated in XIAP Deficiency but Patients Fare Poorly with Acute GVHD. *J Clin Immunol* 2022; 42 (1): 36–45.
15. Laberko A., Sultanova E., Idarmacheva A., Skvortsova Y., Shelikhova L., Nechesnyuk A., et al. Second allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in patients with inborn errors of immunity. *Bone Marrow Transplant* 2023; 58 (3): 273–81.
16. Dain A.S., Hermiston M.L., Shimano K.A., Kharbanda S., Melton A., Dara J., et al. Role of Disease Mechanism in Hematopoietic Cell Transplantation Outcomes for Hemophagocytic Lymphohistiocytosis. *Blood* 2019; 134 (Suppl_1): 3343.

© 2024 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ
им. Дмитрия Рогачева»
Минздрава России
Поступила 19.03.2024
Принята к печати 15.04.2024



EDN: ZKXEZT

Контактная информация:

Власова Анна Алексеевна,
врач-детский онколог отделения
анестезиологии, реанимации и
трансплантации костного мозга Центра
детской онкологии и гематологии
ГАОУ СО «Областная детская
клиническая больница»
Адрес: 620149, Екатеринбург,
ул. Серафимы Дерябиной, 32
E-mail: vlasovaAA@mis66.ru

DOI: 10.24287/1726-1708-2024-23-2-34-39

Сравнительный анализ применения *ex vivo* и *in vivo* деплеции лимфоцитов для трансплантации гемопозитических стволовых клеток у детей со злокачественными заболеваниями системы крови

А.А. Власова¹, Л.В. Вахонина^{1,2}, Н.Г. Майшева¹, Д.Э. Клевакин¹, Д.Е. Костенко¹,
А.А. Игуменцев^{1,2}, С.В. Боровских¹, Т.Ю. Вержбицкая^{1,2}, А.И. Пономарев¹⁻³,
Ж.В. Пермикин^{1,3}, Г.А. Цаур¹⁻³, Л.Г. Фечина^{1,2}

¹ГАОУ СО «Областная детская клиническая больница», Екатеринбург

²ГАОУ СО «Институт медицинских клеточных технологий», Екатеринбург

³ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет», Екатеринбург

Подходы к решению проблем, связанных с аллореактивностью Т-клеток после трансплантации гемопозитических стволовых клеток (ТГСК), включают в себя деплецию TCRαβ⁺- и CD19⁺-лимфоцитов, а также посттрансплантационную терапию с помощью высоких доз циклофосфида (ПТЦФ). Цель: провести анализ результатов ТГСК в зависимости от способа деплеции лимфоцитов. Исследование было нерандомизированным и носило ретроспективный характер. Проанализированы результаты 118 ТГСК, выполненных 107 пациентам со злокачественными заболеваниями системы крови на базе Центра детской онкологии и гематологии ГАОУ СО ОДКБ (Екатеринбург) в период с 2010 по 2023 г. Пациентов разделили на 2 группы: получивших *ex vivo* TCRαβ⁺/CD19⁺-деплекцию с применением технологии CliniMACS (*n* = 75; 1-я группа) и получивших *in vivo* деплекцию с использованием ПТЦФ в дозе 50 мг/кг (*n* = 43; 2-я группа). Исследование одобрено независимым этическим комитетом и утверждено решением ученого совета ГАОУ СО «Институт медицинских клеточных технологий» (Екатеринбург). Информированное согласие на проведение исследования и лечения было получено во всех случаях от пациентов и их законных представителей. Несмотря на то, что лучший темп приживления наблюдался в группе с TCRαβ⁺/CD19⁺-деплекцией (медиана 12 дней) по сравнению с группой с ПТЦФ (медиана 18 дней) (*p* < 0,0001), кумулятивная частота реактивации цитомегаловирусной инфекции и инфекции, вызванной вирусом герпеса 6-го типа, в посттрансплантационном периоде статистически значимо не отличалась у пациентов исследуемых групп. Для цитомегаловирусной инфекции частота реактивации составила 0,467 и 0,466 (*p* = 0,89), для вируса герпеса 6-го типа – 0,360 и 0,240 (*p* = 0,13) для 1-й и 2-й групп соответственно. Не было выявлено достоверных различий в кумулятивной частоте возникновения острой реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ) к +100-му дню у пациентов обеих групп (0,294 и 0,419 для 1-й и 2-й групп соответственно; *p* = 0,77), в частоте развития тяжелой острой РТПХ (0,067 и 0,093 для 1-й и 2-й групп соответственно; *p* = 0,11). Частота развития хронической РТПХ составила 0,12 в группе, где была проведена с TCRαβ⁺/CD19⁺-деплекция, и 0,26 в группе с ПТЦФ (*p* = 0,11). Также не найдено различий в бессобытийной, общей выживаемости и кумулятивной частоте развития рецидива между исследуемыми группами. Оба способа деплеции нежелательной популяции Т-лимфоцитов показали сопоставимую эффективность. Их применение должно проводиться с учетом факторов, связанных с биологическими характеристиками заболевания и клиническим статусом пациента. Возможность использования различных методов деплеции в одном трансплантационном центре позволяет оптимизировать выбор тактики ведения пациентов, нуждающихся в проведении ТГСК.

Ключевые слова: трансплантация гемопозитических стволовых клеток, TCRαβ⁺/CD19⁺-деплекция, посттрансплантационный циклофосфамид, профилактика реакции «трансплантат против хозяина», дети, острые лейкозы

Власова А.А. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2024; 23 (2): 34–39.
DOI: 10.24287/1726-1708-2024-23-2-34-39

A comparison of *ex vivo* and *in vivo* T-cell depletion for hematopoietic stem cell transplantation in children with malignant blood disorders

A.A. Vlasova¹, L.V. Vakhonina^{1,2}, N.G. Maisheva^{1,2}, D.E. Klevakin¹, D.E. Kostenko¹, A.A. Igumenshchev^{1,2}, S.V. Borovskikh¹, T.Yu. Verzhbitskaya^{1,2}, A.I. Ponomarev^{1,3}, Zh.V. Permikin^{1,3}, G.A. Tsaur^{1,3}, L.G. Fechina^{1,2}

¹Regional Children's Clinical Hospital, Yekaterinburg

²Institute of Medical Cell Technologies, Yekaterinburg

³Ural State Medical University, Yekaterinburg

A decrease in T cell alloreactivity following hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) can be achieved via the depletion of TCR $\alpha\beta^+$ and CD19 $^+$ lymphocytes or post-transplant therapy with high-dose cyclophosphamide (PTCy). The purpose of this study was to analyze HSCT outcomes according to the type of lymphocyte depletion. In our non-randomized retrospective study, we analyzed the results of 118 HSCTs performed in 107 patients with malignant blood disorders at the Center for Pediatric Oncology and Hematology of the Regional Children's Clinical Hospital (Yekaterinburg) from 2010 to 2023. The patients were divided into 2 groups: those who had received *ex vivo* TCR $\alpha\beta^+$ /CD19 $^+$ depletion using the CliniMACS technology ($n = 75$; Group 1) and those who had received *in vivo* depletion using PTCy at a dose of 50 mg/kg ($n = 43$; Group 2). The study was approved by the Independent Ethics Committee and the Scientific Council of the Institute of Medical Cell Technologies (Yekaterinburg). Informed consent for the research and treatment was obtained from each patient and their legal representatives. Even though the patients from the TCR $\alpha\beta^+$ /CD19 $^+$ depletion group showed a better engraftment rate (median time: 12 days) than the subjects from the PTCy group (median time: 18 days) ($p < 0.0001$), there was no statistically significant difference in the cumulative incidence of cytomegalovirus and herpesvirus type 6 infection reactivation post-transplant between the two study groups. The cytomegalovirus reactivation rate was 0.467 and 0.466 in Group 1 and 2 respectively ($p = 0.89$), while for herpesvirus type 6 the reactivation rate was 0.360 and 0.240 respectively ($p = 0.13$). There were no significant differences in the cumulative incidence of acute graft-versus-host disease (GVHD) in the two groups by Day +100 (0.294 and 0.419 in Group 1 and 2 respectively; $p = 0.77$); neither was there any difference in the incidence of severe acute GVHD (0.067 and 0.093 respectively; $p = 0.11$). The incidence of chronic GVHD was 0.12 in the TCR $\alpha\beta^+$ /CD19 $^+$ depletion group and 0.26 in the PTCy group ($p = 0.11$). The event-free survival, overall survival and cumulative incidence of relapse did not differ between the studied groups either. The two methods of the depletion of unwanted T-cell populations showed a comparable effectiveness. The choice between them should be based on factors related to the biological characteristics of the disease and the clinical status of a patient. The availability of different depletion methods at a single transplant center helps to choose the optimal treatment option for patients who are in need of HSCT.

Key words: hematopoietic stem cell transplantation, TCR $\alpha\beta^+$ /CD19 $^+$ depletion, post-transplant cyclophosphamide, graft-versus-host disease prevention, children, acute leukemias

Vlasova A.A., et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology 2024; 23 (2): 34–9.

DOI: 10.24287/1726-1708-2024-23-2-34-39

© 2024 by «D. Rogachev NMRCPhOI»

Received 19.03.2024

Accepted 15.04.2024

Correspondence:

Anna A. Vlasova,
a pediatric oncologist at the Department
of Anesthesiology, Intensive Care and Bone
Marrow Transplantation at the Center
for Pediatric Oncology and Hematology
of the Regional Children's Clinical Hospital
Address: 32 Serafimov Deryabinoy St.,
Yekaterinburg 620149, Russia
E-mail: vlasovaAA@mis66.ru

Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) – широко используемая терапевтическая опция для лечения различных злокачественных и незлокачественных заболеваний системы крови. В течение последних 20 лет наблюдается существенный рост трансплантационной активности по всему миру. Разнообразные подходы делают ТГСК все более эффективным и безопасным методом лечения [1, 2]. Одним из наиболее серьезных препятствий для успешного исхода аллогенной ТГСК являются аллореактивные Т-клетки донора и реципиента. Т-лимфоциты реципиента влияют на приживление и функционирование трансплантата, могут провоцировать его неприживление и/или отторжение. Т-лимфоциты донора могут индуцировать тяжелую острую и хроническую реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ) [3].

Подходы к решению этих проблем включают методы *ex vivo* деплеции Т-лимфоцитов с положительной селекцией CD34 $^+$ -клеток с использованием мегадоз CD34 $^+$ -клеток, *ex vivo* деплецию TCR $\alpha\beta^+$ -лимфоцитов, а также подходы с использованием усиленной иммуносупрессии и деплеции Т-клеток *in vivo* – терапия с помощью высоких доз циклофосфамида после трансплантации (ПТЦФ) [2, 4]. Каждая из технологий имеет свои преимущества и недостатки, однако их сравнительный анализ проводится относительно нечасто.

Цель исследования – провести анализ результатов ТГСК в зависимости от способа деплеции лимфоцитов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование было сплошным, когортным и нерандомизированным, оно носило ретроспективный характер. Проанализированы результаты 118 ТГСК, выполненных 107 пациентам со злокачественными заболеваниями системы крови на базе Центра детской онкологии и гематологии ГАУЗ СО ОДКБ (Екатеринбург) в период с 2010 по 2023 г. Подробная характеристика пациентов приведена в таблице. Наиболее частыми диагнозами были острый лимфобластный лейкоз ($n = 66$) и острый миелоидный лейкоз ($n = 53$). Показаниями для проведения ТГСК являлись заболевания высокого риска и рецидивы. Большинство пациентов (75%) получали трансплантационное лечение во второй ремиссии. Пациентов разделили на 2 группы: получивших *ex vivo* TCR $\alpha\beta^+$ - и CD19 $^+$ -деплецию с использованием CliniMACS Plus (Miltenyi Biotec, Германия) (75 ТГСК у 74 пациентов; 1-я группа) и получивших *in vivo* деплецию с использованием ПТЦФ в дозе 50 мг/кг (43 ТГСК у 33 пациентов; 2-я группа).

Доноры и источник стволовых клеток

В качестве доноров преимущественно выступали гаплоидентичные родители ($n = 97$), реже – полностью совместимые неродственные доноры ($n = 19$). Полностью совместимый сиблинг был выбран в качестве донора для 1 пациента. Мобилизация перифе-

Таблица
Характеристика обеих групп пациентов, включенных в исследование
Tables
Characteristics of the enrolled patients from both groups

Параметр Parameter	Группа с ПТЦФ (n = 43) The PTCy group (n = 43)	Группа с TCRαβ ⁺ /CD19 ⁺ -деплецией (n = 75) The TCRαβ ⁺ /CD19 ⁺ depletion group (n = 75)	p
Число пациентов Number of patients	33	74	
Медиана возраста (диапазон), годы The median age (range), years	8 (1–17)	5 (1–17)	< 0,003
Пол (мужской/женский), n (%) Gender (male/female), n (%)	21 (63,6)/12 (36,4)	43 (58,1)/31 (41,9)	< 0,003
Диагноз Diagnosis			
Острый лимфобластный лейкоз, n Acute lymphoblastic leukemia, n	22	44	< 0,02
Острый миелоидный лейкоз, n Acute myeloid leukemia, n	19	24	
Ювенильный миеломоноцитарный лейкоз, n Juvenile myelomonocytic leukemia, n	2	1	
Миелодиспластический синдром, n Myelodysplastic syndrome, n	–	1	
Лимфома, n Lymphoma, n	–	4	
Гемофагоцитарный лимфогистоцитоз, n Hemophagocytic lymphohistiocytosis, n	–	1	
Статус заболевания Disease status			
Первая ремиссия, n First remission, n	22	24	< 0,005
Вторая ремиссия, n Second remission, n	17	39	
Рефрактерное течение, n Refractory disease, n	4	12	
Тип донора Donor type			
Гаплоидентичный, n Haploidentical donor, n	37	60	< 0,001
Неродственный полностью совместимый, n Fully matched unrelated donor, n	5	14	
Родственный полностью совместимый, n Fully matched related donor, n	1	–	
Источник стволовых клеток Stem cell source			
Периферические стволовые клетки, n Peripheral blood stem cells, n	24	74	< 0,03
КМ, n Bone marrow, n	9	1	
Режим кондиционирования Conditioning regimen			
Режимы со сниженной интенсивностью, n Reduced-intensity regimen, n	2	7	< 0,007
Миелоаблативный режим, n Myeloablative regimen, n	41	68	

Notes. PTCy – post-transplant cyclophosphamide.

рических стволовых клеток (n = 98) проводилась путем введения гемопоэтического фактора роста лейкоцитов в дозе 10 мкг/кг/сут в течение 4 дней с последующим сбором клеток методом лейкофере-реза. Оптимальной считалась доза гемопоэтиче-ских стволовых клеток (ГСК) в диапазоне от 8 × 10⁶ до 15 × 10⁶/кг массы тела реципиента. В 10 случаях в качестве источника ГСК был выбран костный мозг (КМ). В 9 из 10 ГСК проводилась с применением непраймированного, неманипулированного КМ. В 1 случае был выполнен лейкоферез донор-ского КМ с последующей TCRαβ⁺/CD19⁺-деплецией.

Режим кондиционирования и профилактика реакции «трансплантат против хозяина»

В обеих группах в качестве предтранспланта-ционной подготовки большинство пациентов получали миелоаблативное кондиционирование с использо-ванием флударабина, тиотепы, треосульфана или бусульфана. Для профилактики посттранспланта-ционных лимфопролиферативных заболеваний всем пациентам вводился ритуксимаб в дозе 100 мг/м² в –1-й день. Профилактика РПТХ до 2019 г. прово-дилась с применением такролимуса в дозе 0,02 мг/кг/сут внутривенно, затем *per os* под контролем уровня препарата в сыворотке крови. В

группе с $\text{TCR}\alpha\beta^+/\text{CD}19^-$ -деплецией решение о пост-трансплантационной профилактике с применением такролимуса проводилось с учетом уровня $\text{TCR}\alpha\beta^+$ в трансплантате после процедуры деплеции. С 2019 г. для профилактики РТПХ в дополнение к такролимусу стали использоваться тоцилизумаб, абатацепт и бортезомиб.

Состав трансплантата

В группе с $\text{TCR}\alpha\beta^+/\text{CD}19^-$ -деплецией медиана количества введенных $\text{CD}34^+$ -клеток составляла $10,7 \times 10^6/\text{кг}$, медиана $\text{TCR}\alpha\beta^+$ -клеток – $1,46 \times 10^4/\text{кг}$ (диапазон 0,54–43,7). В группе с ПТЦФ медиана количества $\text{CD}34^+$ -клеток – $9,6 \times 10^6/\text{кг}$. Достоверных различий в дозе $\text{CD}34^+$ -клеток между группами не выявлено ($p < 0,003$).

Сопроводительная терапия

Все пациенты получали профилактику вено-окклюзионной болезни гепарином натрия в дозе 100 Ед/кг до +30-х суток после ТГСК. В рамках профилактики реактивации цитомегаловирусной инфекции (ЦМВ) в предтрансплантационном периоде проводилась терапия ганцикловиром. Гемопозитический колониестимулирующий фактор вводили с +5-го дня после трансфузии ГСК до приживления нейтрофилов. В раннем посттрансплантационном периоде все пациенты получали комбинированную противомикробную терапию (2 антибактериальных препарата с учетом результатов микробиологических посевов в комбинации с ацикловиром и каспофунгином). После выписки из отделения пациенты продолжали получать противомикробную профилактику, объем, длительность терапии и комбинация препаратов определялись с учетом текущего статуса пациента и инфекционного анамнеза. Внутривенный иммуноглобулин получали все пациенты после ТГСК для поддержания уровня IgG выше 4–5 г/л. Все продукты крови были лейкодеплементированы и облучены. Всем пациентам проводился мониторинг крови, мочи и кала методом полимеразной цепной реакции в еженедельном режиме. Применялась стратегия превентивного лечения (ганцикловир/фоскавир/цидофовир + внутривенный иммуноглобулин) при определении в цельной крови вирусов группы герпеса, полиомавирусов в количествах более 200 копий/мл либо аденовируса при любом позитивном результате полимеразной цепной реакции.

Для статистической обработки данных использовали программное обеспечение Statistica 8.0, R-statistics. При сравнении 2 групп пациентов по количественным признакам использовали критерий Манна–Уитни, по категориальным признакам – точный критерий Фишера. Результаты ТГСК оценивались по кривым бессобытийной (БСВ) и общей (ОВ) выжива-

емости, построенным по методу Каплана–Майера, а также по кумулятивной частоте приживления нейтрофилов, реактивации вирусных инфекций, развития РТПХ, рецидивов. Для сравнения кривых выживаемости использовался непараметрический log-rank-критерий, для сравнения кумулятивных частот – критерий Грея. Все различия считались достоверными при $p < 0,05$. Исследование одобрено независимым этическим комитетом и утверждено решением ученого совета ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий» (Екатеринбург). Информированное согласие на проведение исследования и лечения было получено во всех случаях от пациентов и их законных представителей.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Первичное приживление произошло в 110 (94%) случаях ТГСК. В группе с $\text{TCR}\alpha\beta^+/\text{CD}19^-$ -деплецией первичное неприживление было констатировано в 5 (7%) случаях. При этом в дальнейшем 2 пациента погибли от тяжелых инфекционных осложнений, а в 3 случаях (в сроки от 45 до 60 дней) была успешно проведена повторная ТГСК со сменой донора и/или источника ГСК. Отторжение/недостаточность трансплантата в этой группе выявлены у 3 (4%) пациентов, 1 из них погиб от тяжелой генерализованной ВК-вирусной инфекции, в 1 случае была проведена повторная ТГСК со сменой донора и 1 пациент развил отторжение трансплантата после повторной ТГСК со сменой донора и погиб от тяжелой генерализованной бактериально-грибковой инфекции.

В группе с ПТЦФ неприживление было зафиксировано у 2 (6%) пациентов, оба погибли до проведения повторной ТГСК из-за тяжелых инфекционных осложнений. Отторжение/недостаточность трансплантата были диагностированы у 3 (7%) пациентов, однако в дальнейшем у всех восстановление кровотока произошло после модификации иммуносупрессивной терапии и проведения инфузии донорских лимфоцитов.

Более быстрый темп приживления регистрировался в группе с $\text{TCR}\alpha\beta^+/\text{CD}19^-$ -деплецией (медиана достигнута на +12-й день), продемонстрировав статистически значимые различия с группой с ПТЦФ (медиана достигнута на +18-й день) ($p < 0,0001$) (рисунки 1).

Кумулятивная частота реактивации ЦМВ в посттрансплантационном периоде статистически значимо не отличалась в группах с $\text{TCR}\alpha\beta^+/\text{CD}19^-$ -деплецией и ПТЦФ и составила 0,467 и 0,466 соответственно ($p = 0,76$). Также не выявлено различий в частоте реактивации инфекции, вызванной вирусом герпеса 6-го типа (0,360 и 0,240 соответственно; $p = 0,13$), вирусом Эпштейна–Барр (0,78 и 0,66 соответственно;

$p = 0,32$) и полиомавирусами (0,68 и 0,69 соответственно; $p = 0,64$).

Кумулятивная частота острой РТПХ к +100-му дню достоверно не различалась у пациентов 2 исследуемых групп и составила 0,294 для группы с $\text{TCR}\alpha\beta^+/\text{CD}19^+$ -деплецией и 0,419 для группы с ПТЦФ ($p = 0,77$). Также не выявлено достоверных различий в частоте возникновения тяжелой острой РТПХ (III–IV степень) у пациентов 2 групп (0,067 и 0,093 для 1-й и 2-й групп соответственно; $p = 0,11$). Частота развития хронической РТПХ составила 0,12 в группе, где была проведена $\text{TCR}\alpha\beta^+/\text{CD}19^+$ -деплеция, и 0,26 в группе с ПТЦФ ($p = 0,11$) (рисунок 2). Кишечная форма РТПХ отмечена у 4 пациентов, в том числе у 1 из группы с $\text{TCR}\alpha\beta^+/\text{CD}19^+$ -деплецией (стероид-рефрактерная острая РТПХ IV степени, которая привела к гибели пациента) и 3 с ПТЦФ (все пациенты живы). У 2 пациентов в группе с ПТЦФ наблюдалось контролируемое поражение легких.

Кумулятивная частота рецидивов статистически не различалась в 2 группах и составила 0,45 для пациентов с $\text{TCR}\alpha\beta^+/\text{CD}19^+$ -деплецией и 0,56 для пациентов с ПТЦФ ($p = 0,35$). Медиана времени до развития в группе с $\text{TCR}\alpha\beta^+/\text{CD}19^+$ -деплецией – 11,1 мес (диапазон 1,0–26,4 мес), в группе с ПТЦФ – 5,2 мес (диапазон 1,0–24,1 мес) (рисунок 3). Не найдено различий в БСВ и ОВ между исследуемыми группами ($p = 0,34$ и $p = 0,28$ соответственно). Для группы с $\text{TCR}\alpha\beta^+/\text{CD}19^+$ -деплецией БСВ и ОВ

составили 0,53 и 0,61, для группы с ПТЦФ – 0,45 и 0,75 соответственно.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Применение ТГСК как терапевтической опции для лечения злокачественных заболеваний системы крови у детей из уникальной технологии превратилось в клиническую реальность. Существует несколько подходов к обработке трансплантата, которые следует сравнивать друг с другом. В нашем исследовании мы проанализировали результаты ТГСК у детей с использованием *ex vivo* деpleции $\text{TCR}\alpha\beta^+$ - и $\text{CD}19^+$ -лимфоцитов и *in vivo* деpleции с использованием ПТЦФ. Мы подтвердили ранее известные данные о замедленном приживлении нейтрофилов при использовании ПТЦФ. В нашем исследовании одним из важных наблюдений была статистически значимая разница в скорости приживления трансплантата в пользу группы $\text{TCR}\alpha\beta^+/\text{CD}19^+$ -деплеции. Это может быть значимым фактором при принятии решения о стратегии проведения ТГСК у пациентов с высоким риском бактериальных и грибковых инфекционных осложнений.

Согласно литературным данным, при применении $\text{TCR}\alpha\beta^+/\text{CD}19^+$ -деплеции высока частота реактивации латентных вирусов, таких как ЦМВ, вирус Эпштейна–Барр, вирус герпеса 6-го типа [5]. В нашем исследовании статистически значимых различий между группами с $\text{TCR}\alpha\beta^+/\text{CD}19^+$ -деплецией и ПТЦФ в

Рисунок 1

Кумулятивная частота приживления нейтрофилов у пациентов обеих групп

Figure 1

The cumulative incidence of neutrophil engraftment in the patients from both groups

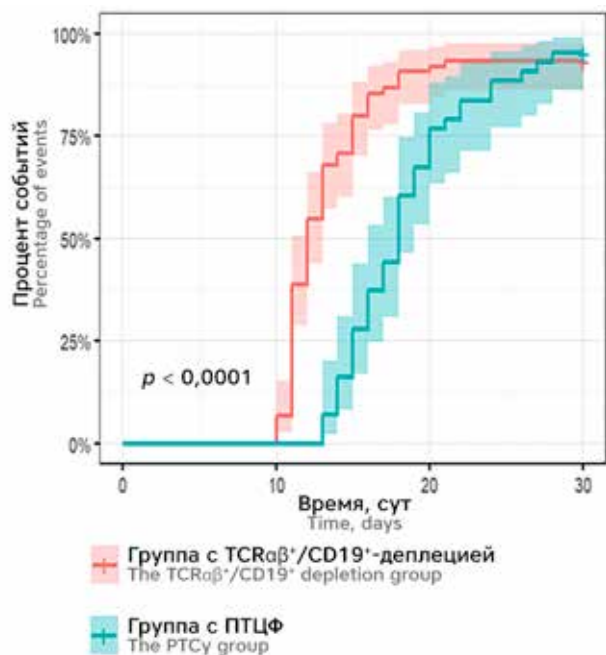


Рисунок 2

Кумулятивная частота острой РТПХ ко дню +100 у пациентов обеих групп

Figure 2

The cumulative incidence of acute graft-versus-host disease (GVHD) by Day +100 in the patients from both groups

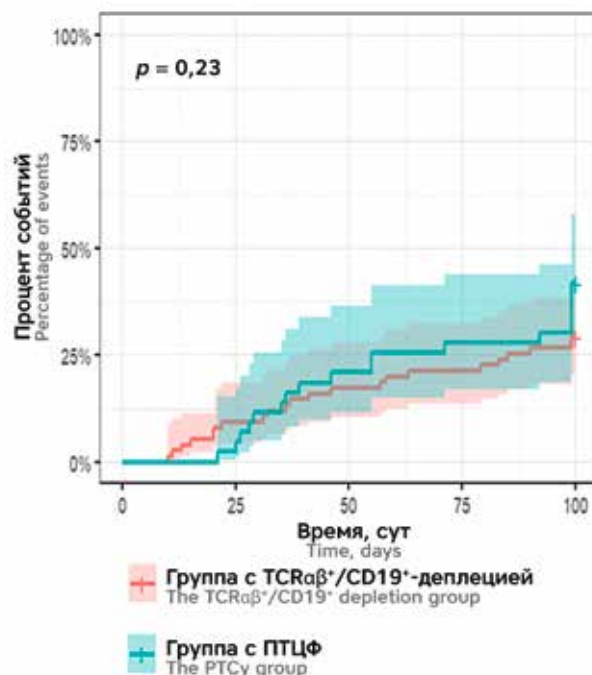
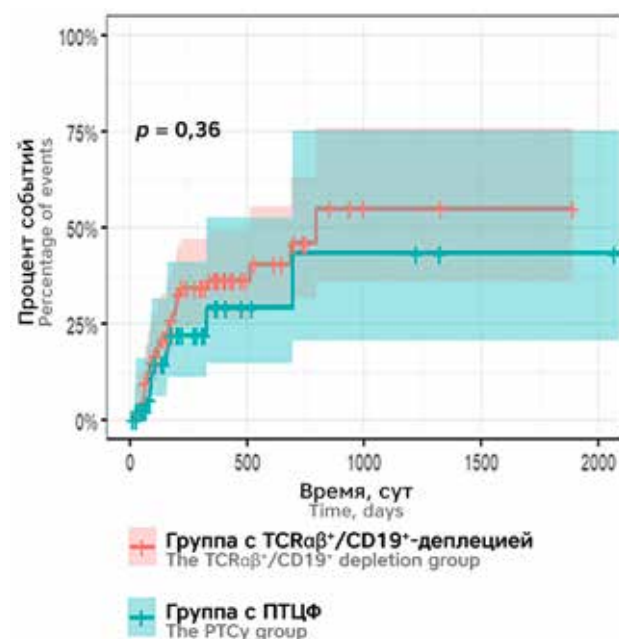


Рисунок 3

Кумулятивная частота рецидивов у пациентов обеих групп

Figure 3

The cumulative incidence of relapse in both groups



частоте реактивации герпес-вирусов не выявлено. В то же время существует ряд факторов, которые могут способствовать появлению этих различий: используемый режим кондиционирования, источник стволовых клеток и интенсивность иммуносупрессии [6].

Анализируя как данные литературы [7, 8], так и собственный опыт [9] следует отметить, что ТГСК с использованием TCRαβ⁺/CD19⁺-деплементированного

трансплантата остается безопасным и осуществимым вариантом для педиатрических пациентов с высоким риском посттрансплантационных осложнений [8, 9].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По нашему опыту оба способа деплеции нежелательной популяции Т-лимфоцитов показали сопоставимую эффективность. Их применение должно проводиться с учетом факторов, связанных с биологическими характеристиками заболевания и клиническим статусом пациента. Возможность использования различных методов деплеции в одном трансплантационном центре позволяет оптимизировать выбор тактики ведения пациентов, нуждающихся в проведении ТГСК.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Не указан.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

ORCID

Vlasova A.A. ORCID: <https://orcid.org/0009-0000-2036-4352>

Vakhonina L.V. ORCID: <https://orcid.org/0009-0003-7644-1486>

Klevakin D.E. ORCID: <https://orcid.org/0009-0002-7186-5055>

Kostenko D.E. ORCID: <https://orcid.org/0009-0006-7756-4930>

Verzhbitskaya T.Yu. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9329-1828>

Ponomarev A.I. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0150-6471>

Permikin Zh.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1904-4989>

Tsaur G.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9881-6221>

Fechina L.G. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1885-3912>

Литература / References

- Dufort G., Pisano S., Incoronato A., Castiglioni M., Carracedo M., Pages C., et al. Feasibility and outcome of haploidentical SCT in pediatric high-risk hematologic malignancies and Fanconi anemia in Uruguay. *Bone Marrow Transplant* 2012; 47: 663–8.
- Kwon M., Bailén R., Díez-Martín J.L. Evolution of the role of haploidentical stem cell transplantation: past, present, and future. *Expert Rev Hematol* 2020; 13 (8): 835–50. DOI: 10.1080/17474086.2020.1796621
- Vadakekolathu J., Rutella S. T-Cell Manipulation Strategies to Prevent Graft-Versus-Host Disease in Haploidentical Stem Cell Transplantation. *Biomedicine* 2017; 5 (2): 33. DOI: 10.3390/biomedicine5020033
- Lang P., Feuchtinger T., Teltschik H.-M., Schwinger W., Schlegel P., Pfeiffer M., et al. Improved immune recovery after transplantation of TCRαβ/CD19-depleted allografts from haploidentical donors in pediatric patients. *Bone Marrow Transplant* 2015; 50: 6–10. DOI: 10.1038/bmt.2015.87
- Dufort G., Castillo L., Pisano S., Castiglioni M., Carolina P., Andrea I., et al. Haploidentical hematopoietic stem cell transplantation in children with high-risk hematologic malignancies: outcomes with two different strategies for GvHD prevention. *Ex vivo T-cell depletion and post-transplant cyclophosphamide: 10 years of experience at a single center. Bone Marrow Transplant* 2016; 21 (10): 1354–60. DOI: 10.1038/bmt.2016.161
- Ruggeri A., Roth-Guepin G., Battipaglia G., Mamez A.-C., Malard F., Gomez A., et al. Incidence and risk factors for hemorrhagic cystitis in unmanipulated haploidentical transplant recipients. *Transpl Infect Dis* 2015; 17: 822–30. DOI: 10.1111/tid.12455
- Mitchell R., Cole T., Shaw P.J., Mechinaud F., O'Brien T., Fraser C. TCR αβ⁺/CD19⁺ cell-depleted hematopoietic stem cell transplantation for pediatric patients. *Pediatr Transplant* 2019; 23 (6): e13517. DOI: 10.1111/ptr.13517
- Montoro J., Roldán E., Piñana J.L., Barba P., Chorão P., Quintero A., et al. *Ex vivo T-cell depletion vs post-transplant cyclophosphamide, sirolimus, and mycophenolate mofetil as graft-vs-host disease prophylaxis for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Eur J Haematol* 2021; 106 (1): 114–25. DOI: 10.1111/ejh.13529
- Вахонина Л.В., Вяткин И.Н., Майшева Н.Г., Пудовкин В.А., Игуменцев А.А., Шориков Е.В. и др. Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток в Областной детской клинической больнице №1 г. Екатеринбург. Результаты работы за период с 2006 по 2016 г. *Российский журнал детской гематологии и онкологии* 2017; 4 (2): 91–9. DOI: 10.17650/2311-1267-2017-4-2-91-99 [Vakhonina L.V., Vyatkin I.N., Maysheva N.G., Pudovkin V.A., Igumenshev A.A., Shorikov E.V., et al. Transplantation of hematopoietic stem cells in the Regional Children's Clinical Hospital № 1 in Ekaterinburg. Results of work for the period from 2006 to 2016. *Russian Journal of Pediatric Hematology and Oncology* 2017; 4 (2): 91–9. (In Russ.)].

© 2024 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ
им. Дмитрия Рогачева»
Минздрава России
Поступила 25.09.2023
Принята к печати 08.04.2024



EDN: WGSWNA

Контактная информация:

Сысоев Андрей Евгеньевич,
заместитель заведующего отделением –
врач-детский онколог отделения
нейроонкологии ФГБУ «НМИЦ ДГОИ
им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России
Адрес: 117997, Москва,
ул. Саморы Машела, 1
E-mail: andrey.sysoev2011@yandex.ru

© 2024 by «D. Rogachev NMRCPHOI»

Received 25.09.2023
Accepted 08.04.2024

Correspondence:

Andrey E. Sysoev,
Deputy Head of the Department of Neuro-
oncology, a pediatric oncologist at the Dmitry
Rogachev National Medical Research
Center of Pediatric Hematology, Oncology
and Immunology of Ministry of Healthcare
of the Russian Federation
Address: 1 Samory Mashela St.,
Moscow 117997, Russia
E-mail: andrey.sysoev2011@yandex.ru

DOI: 10.24287/1726-1708-2024-23-2-40-46

Высокодозная химиотерапия с аутологичной трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток в лечении рецидивов медуллобластомы у детей

А.Е. Сысоев, Л.И. Папуша, Е.А. Сальникова, А.В. Процветкина, А.А. Меришавян,
И.Г. Вилесова, Г.В. Терещенко, А.И. Карачунский

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, Москва

Рецидивы медуллобластомы (МБ) обладают гетерогенным клиническим течением и продолжают оставаться сложной терапевтической задачей. В зарубежной литературе представлены данные о низкой эффективности и значимой токсичности высокодозной химиотерапии (ВДХТ) с аутологичной трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток (ауто-ТГСК) в лечении пациентов с рецидивом МБ. Нами проведен анализ эффективности и переносимости ВДХТ с ауто-ТГСК у 9 пациентов детского и подросткового возраста с рецидивом МБ, референс морфологии и нейровизуализации которых был выполнен в НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева в период с июля 2013 г. по декабрь 2021 г. Целью работы явилась оценка эффективности противорецидивной терапии с включением ВДХТ с ауто-ТГСК в лечение рецидивов МБ в педиатрической практике. Исследование одобрено независимым этическим комитетом и утверждено решением ученого совета НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева.

Ключевые слова: медуллобластома, рецидив, дети, высокодозная химиотерапия

Сысоев А.Е. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2024; 23 (2): 40–6.
DOI: 10.24287/1726-1708-2024-23-2-40-46

High-dose chemotherapy with autologous hematopoietic stem cell transplantation in the treatment of recurrent medulloblastoma in children

A.E. Sysoev, L.I. Papusha, E.A. Salnikova, A.V. Protsvetkina, A.A. Merishavyan, I.G. Vilesova,
G.V. Tereshchenko, A.I. Karachunsky

The Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology of Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow

Medulloblastoma (MB) recurrence can manifest in various clinical ways and still remains a major therapeutic challenge. As reported in the international literature, high-dose chemotherapy (HDCT) with autologous hematopoietic stem cell transplantation (auto-HSCT) has low effectiveness and severe toxicity in patients with recurrent MB. Here, we analyzed the effectiveness and tolerability of HDCT with auto-HSCT in 9 pediatric and adolescent patients with MB relapses whose histological samples and magnetic resonance images had been reviewed at the Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology from July 2013 till December 2021. The aim of the study was to evaluate the effectiveness of the HDCT with auto-HSCT approach for the treatment of MB relapses in pediatric patients. The study was approved by the Independent Ethics Committee and the Scientific Council of the Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology of Ministry of Healthcare of Russia.

Key words: medulloblastoma, recurrence, children, high-dose chemotherapy

Sysoev A.E., et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology 2024; 23 (2): 40–6.
DOI: 10.24287/1726-1708-2024-23-2-40-46

Согласно результатам зарубежных исследований, показатели 7-летней общей выживаемости (ОВ) детей с рецидивом медуллобластомы (МБ) составляют менее 10%, несмотря на множество методов лечения, включая повторную резекцию опухоли, повторную лучевую терапию, высокодозную химиотерапию (ВДХТ) с аутологичной трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток (ауто-ТГСК) [1].

На протяжении многих лет протокол HIT-REZ 2005 остается терапевтическим стандартом, включающим проведение ВДХТ с ауто-ТГСК при достижении полного ответа (ПО) после индукционных блоков химиотерапии (ХТ) [2].

В ходе систематического анализа англоязычных исследований МБ, доступных в Pubmed, с акцентом на рецидивы заболевания без каких-либо временных ограничений мы выделили несколько сообщений о применении ВДХТ с ауто-ТГСК в рамках противорецидивного лечения. Все работы были ограничены малым числом пациентов и свидетельствовали об отсутствии эффективности и выраженной токсичности данной опции [3–5].

Сомнительная куративная эффективность и высокая токсичность ВДХТ с ауто-ТГСК диктуют необходимость поиска альтернативных вариантов лечения. Нами проведен анализ собствен-

ного опыта применения ВДХТ с ауто-ТГСК в терапии рецидивов МБ.

Цели и задачи исследования: провести анализ эффективности и токсичности противорецидивной терапии с включением ВДХТ с ауто-ТГСК в лечение рецидивов МБ у 9 пациентов детского и подросткового возраста.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование одобрено независимым этическим комитетом и утверждено решением ученого совета НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева.

В исследуемую группу включены 9 пациентов.

Критерии включения:

1. Возраст на момент установления рецидива МБ от 0 до 18 лет.

2. Верификация МБ, определение молекулярно-генетической группы, поиск генетических аберраций в ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России в период с июля 2013 г. по декабрь 2021 г. (материал – ткань, полученная в результате резекции опухоли, фиксированная в формалине и залитая в парафиновый блок).

3. Радиологически и/или гистологически констатированный рецидив МБ (референс магнитно-резонансной томографии (МРТ) нейрорадиологом ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, референс рецидивного материала в патологоанатомическом отделении Центра им. Дмитрия Рогачева).

4. Наличие ПО или частичного ответа (ЧО) до ВДХТ с ауто-ТГСК по данным МРТ.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В анализ включены 9 пациентов с рецидивом МБ, средний возраст которых на момент установления первичного диагноза составил 6,8 года (диапазон 0,45–13,6 года).

В старшую возрастную группу (≥ 4 лет) вошли 6 детей, в младшую (< 4 лет) – 3. Подавляющим большинством пациентов оказались мальчики ($n = 7$).

В 4 случаях к моменту начала первичной терапии наблюдалась локальная форма заболевания (M0-стадия), у 2 пациентов – M3-стадия. В 2 случаях стадирование было проведено неадекватно (Mx-стадия), поскольку цитологическое исследование ликвора не выполнялось.

Тотальная резекция опухоли (GTR) изначально выполнена 2 пациентам (R0-стадия). R(+)-стадия установлена в 3 случаях. Еще 4 пациентам наличие резидуальной опухоли достоверно исключено не было (Rx-стадия) в связи с неадекватными сроками выполнения послеоперационной МРТ головного

мозга (после 72 ч от операции) ($n = 3$) и оставленным в ложе удаленной опухоли гемостатическим материалом ($n = 1$).

На долю классического варианта гистологии пришлось 4 случая, десмопластического – 3, анапластического – 1, с экстенсивной нодулярностью – 1.

К группе стандартного риска были отнесены 2 пациента, к группе высокого риска – 7.

В результате проведенного молекулярно-генетического исследования в 5 случаях установлена группа 4, в 3 – группа SHN, еще в 1 – группа 3.

Амплификация гена *MYCN* выявлена у 1 пациента (группа 4). Среди пациентов с МБ SHN в ткани опухоли обнаружены мутации в генах *SUFU* ($n = 1$) и *PTCH1* ($n = 1$).

До развития рецидива в рамках первичного лечения 3 пациентам была назначена терапия SKK с последующими облучением и поддерживающей ХТ. У 3 детей младшего возраста лечение включало только режим SKK. Еще в 2 случаях проведено облучение с поддерживающей ХТ. Один пациент после резекции опухоли с установлением неверного диагноза (пилочитарная астроцитома) специфического адъювантного лечения не получал и лишь развитие рецидива через несколько месяцев привело к стороннему референсу гистопрепаратов и верификации МБ.

Клинические характеристики пациентов исследуемой группы представлены в *таблице 1*.

Средний возраст пациентов на момент установления рецидива составил 8,4 года (диапазон 1,5–15,1 года).

На долю локальных рецидивов пришлось 2 случая, метастатических – 1, а смешанных (рецидивная опухоль в области инициальной операции с метастатическим компонентом) – 6.

Распределение разных типов рецидивов МБ по отношению к молекулярно-генетическим группам представлено в *таблице 2*. Все 6 рецидивов опухоли групп 3 и 4 носили метастатический и смешанный характер.

В рамках противорецидивной терапии, выполненной до ВДХТ с ауто-ТГСК, в 8 случаях проведены блоки CARBO/VP16 (1 пациенту после GTR), еще в 1 случае – первичное фотонное облучение.

До назначения ВДХТ с ауто-ТГСК был достигнут ПО в 5 случаях, а ЧО – в 4.

Всем пациентам ВДХТ с ауто-ТГСК проводилась в рамках лечения первого рецидива. В подавляющем большинстве случаев кондиционирование было представлено комбинацией тиотепы/карбоплатин/вепезид.

После ВДХТ с ауто-ТГСК развитие второго рецидива наблюдалось у 7 детей: локального у 1 (SHN), метастатического у 4 (SHN – 2, группа 4 – 2), смешанного у 2 (группа 4).

Таблица 1

Клинические характеристики пациентов исследуемой группы ($n = 9$)

Tables 1

Clinical characteristics of the enrolled patients ($n = 9$)

Параметр Parameter	Всего Total	Группа SHH ($n = 3$) The SHH group ($n = 3$)	Группа 3 ($n = 1$) Group 3 ($n = 1$)	Группа 4 ($n = 5$) Group 4 ($n = 5$)
Пол, n (%): Gender, n (%):				
мужской male	7 (77,8)	3 (100,0)	1 (100,0)	3 (60,0)
женский female	2 (22,2)	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (40,0)
Возраст: Age:				
медиана, годы the median, years	6,8	2,2	13,6	8,2
диапазон, годы range, years	0,45–13,6	0,45–3,1	13,6–13,6	5,37–9,75
≥ 4 лет, n (%) ≥ 4 years, n (%)	6 (66,7)	0 (0,0)	1 (100,0)	5 (100,0)
< 4 лет, n (%) < 4 years, n (%)	3 (33,3)	3 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Гистологический вариант, n (%): Histological type, n (%):				
классический classic	4 (44,5)	0 (0,0)	1 (100,0)	3 (60,0)
десмопластический desmoplastic	3 (33,3)	2 (66,7)	0 (0,0)	1 (20,0)
с экстенсивной нодулярностью extensive nodularity	1 (11,1)	1 (33,3)	0 (0,0)	0 (0,0)
анapластический anaplastic	1 (11,1)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (20,0)
M-стадия, n (%): M stage, n (%):				
M0	4 (44,5)	1 (33,3)	1 (100,0)	2 (40,0)
M1	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
M2	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
M3	2 (22,2)	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (40,0)
Mx	3 (33,3)	2 (66,7)	0 (0,0)	1 (20,0)
R-стадия, n (%): R stage, n (%):				
R+	3 (33,3)	1 (33,3)	0 (0,0)	2 (40,0)
R0	2 (22,2)	1 (33,3)	1 (100,0)	0 (0,0)
Rx	4 (44,5)	1 (33,3)	0 (0,0)	3 (60,0)
Группа риска, n (%): Risk group, n (%):				
стандартный риск standard risk	2 (22,2)	0 (0,0)	1 (100,0)	1 (20,0)
высокий риск high risk	7 (77,8)	3 (100,0)	0 (0,0)	4 (80,0)
Инициальная терапия, n (%): Initial treatment, n (%):				
химиотерапия chemotherapy	6 (66,7)	3 (100,0)	0 (0,0)	3 (60,0)
лучевая терапия radiotherapy	2 (22,2)	0 (0,0)	1 (100,0)	1 (20,0)
Исход, n (%): Outcome, n (%):				
жив alive	2 (22,2)	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (40,0)
умер dead	7 (77,8)	3 (100,0)	1 (100,0)	3 (60,0)

Таблица 2

Распределение типов рецидивов МБ по отношению к молекулярно-генетическим группам ($n = 9$)

Tables 2

Medulloblastoma relapse types according to molecular genetic group ($n = 9$)

Генетическая группа Genetic group	Локальный, n (%) Local, n (%)	Метастатический, n (%) Metastatic, n (%)	Смешанный, n (%) Mixed, n (%)
SHH	2 (66,7)	0 (0,0)	1 (33,3)
3	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (100,0)
4	0 (0,0)	1 (20,0)	4 (80,0)

Живы в ремиссии 2 пациента (после терапии второго и третьего рецидивов).

Одному пациенту в рамках лечения первичного заболевания был назначен режим SKK с последую-

щими облучением и поддерживающей ХТ. Другому пациенту из-за установления неверного диагноза инициальная специфическая терапия не проводилась.

Скончались от прогрессии болезни (ПБ) 6 детей (в том числе с развитием в 4 случаях фатального второго или третьего рецидива). Ребенок с соматической мутацией в гене *PTCH1* скончался от прогрессии третьего метастатического рецидива, а пациент с соматической мутацией в гене *SUFU* – от прогрессии второго локального рецидива. В 1 случае летальный исход был обусловлен прогрессией второй опухоли (глиобластома), диагностированной спустя 7 лет после завершения лечения второго метастатического рецидива МБ.

Особенности противорецидивного лечения и исход пациентов исследуемой группы представлены в таблице 3.

Результаты лечения пациентов исследуемой группы представлены в таблице 4. Случаев смерти от терапии в ремиссии, потери из-под наблюдения не зарегистрировано.

Медиана ОВ для исследуемой группы пациентов составила 24 мес (95% доверительный интервал (ДИ) 13–NE). Показатель ОВ через 12 мес с момента констатации рецидива составил 89% (95% ДИ 71–100), после 18 мес – 56% (95% ДИ 31–100), а спустя 24 мес – 44% (95% ДИ 21–92). ОВ исследуемой группы пациентов отражена на рисунке 1.

Медиана бессобытийной выживаемости (БСВ) для исследуемой группы пациентов составила 11 мес (95% ДИ 8,3–NE). Показатель БСВ через 8 мес с момента установления рецидива составил 78% (95% ДИ 55–100), после 10 мес – 56% (95% ДИ 31–100), а спустя 12 мес – 22% (95% ДИ 6,5–75). БСВ исследуемой группы пациентов отражена на рисунке 2.

При анализе переносимости во всех случаях наблюдалась тяжелая гематологическая токсичность.

Более чем у половины детей ранний посттрансплантационный период протекал с инфекционными осложнениями (стоматит, эзофагит, энтероколит, сепсис). У 1 пациентки развилась нейросенсорная тугоухость.

Токсические проявления ВДХТ с ауто-ТГСК у пациентов исследуемой группы представлены в таблице 5.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

В 2009 г. М. Massimino и соавт. [3] опубликовали сообщение о применении ВДХТ с ауто-ТГСК в лечении рецидивов МБ. В исследуемую группу были включены 15 пациентов детского возраста. До ВДХТ с ауто-ТГСК в 14 случаях зарегистрирован ответ на индукционную ХТ, еще в 1 случае проведена только GTR по поводу локального рецидива в задней черепной ямке. Всем пациентам были назначены 1–2 курса миелоаблативной терапии на основе ТТ. Суммарно проведено 25 процедур ВДХТ с ауто-ТГСК. Второй курс миелоаблативной терапии был пропущен у 5 пациентов (ПБ в 2 случаях, тяжелая инфекция в 1 и недо-

Таблица 3

Особенности противорецидивного лечения и исход пациентов исследуемой группы ($n = 9$)

Tables 3

Relapse treatment and patient outcomes in the study group ($n = 9$)

Пациент Patient	Пол Gender	Возраст, годы Age, years	Генетическая группа Genetic group	Тип рецидива Relapse type	Терапия рецидива до ВДХТ с ауто-ТГСК Relapse treatment before HDCT with auto-HSCT	Статус болезни до ВДХТ с ауто-ТГСК Disease status before HDCT with auto-HSCT	Кондиционирование Conditioning	Событие после ВДХТ с ауто-ТГСК Event after HDCT with auto-HSCT	Исход Outcome
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
№1	Мужской Male	4,2	SHN	Первый (смешанный) First relapse (mixed)	CARBO/VP16 (3)	ПО CR	ТТ/CARBO/VP16 (тандем) TT/CARBO/VP16 (tandemtherapy)	Второй рецидив через 6,5 мес Second relapse 6.5 months later	Умер от прогрессии третьего рецидива Died because of third relapse progression
№2	Мужской Male	4,5	SHN	Первый (локальный) First relapse (local)	GTR, CARBO/VP16 (4)	ПО CR	ТТ/CARBO/VP16	Второй рецидив через 1 мес Second relapse 1 month later	Умер (в ремиссии после терапии второго рецидива) от второй опухоли (глиобластома) Died because of a second tumor (glioblastoma) while in remission after treatment of the second relapse of the primary disease
№3	Мужской Male	1,5	SHN	Первый (локальный) First relapse (local)	CARBO/VP16 (4)	ПО CR	ТТ/CARBO/VP16	Второй рецидив через 4 мес Second relapse 4 months later	Умер от прогрессии второго рецидива Died because of second relapse progression
№4	Мужской Male	15,1	3	Первый (смешанный) First relapse (mixed)	CARBO/VP16 (4)	ЧО PR	ТТ/TMZ	ПБ через 5,5 мес PD 5.5 months later	Умер от прогрессии первого рецидива Died because of first relapse progression

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
№5	Мужской Male	13,0	4	Первый (метастатический) First relapse (metastatic)	CARBO/VP16 (4)	ЧО PR	CARBO/VP16	Второй рецидив через 4 мес Second relapse 4 months later	Умер от прогрессии второго рецидива Died because of second relapse progression
№6	Мужской Male	12,7	4	Первый (смешанный) First relapse (mixed)	Биопсия, CARBO/VP16 (6) Biopsy, CARBO/VP16 (6)	ПО CR	ТТ/CARBO/VP16	Второй рецидив через 10,5 мес Second relapse 10.5 months later	Жив в ремиссии после терапии второго рецидива Alive and in remission after the treatment of the second relapse
№7	Мужской Male	6,7	4	Первый (смешанный) First relapse (mixed)	CARBO/VP16 (3)	ПО CR	ТТ/CARBO/VP16	Второй рецидив через 6 мес Second relapse 6 months later	Умер от прогрессии второго рецидива Died because of second relapse progression
№8	Женский Female	8,4	4	Первый (смешанный) First relapse (mixed)	CARBO/VP16 (3)	ЧО PR	ТТ/CARBO/VP16	ПБ через 2,5 мес PD 2.5 months later	Умер от прогрессии первого рецидива Died because of first relapse progression
№9	Женский Female	9,1	4	Первый (смешанный) First relapse (mixed)	Биопсия, лучевая терапия Biopsy, radiotherapy	ЧО PR	CDDP/VCR/CPM (тандем) CDDP/VCR/CPM (tandem therapy)	Второй рецидив через 16 мес Second relapse 16 months later	Жив в ремиссии после терапии третьего рецидива Alive and in remission after the treatment of the third relapse

Примечание. Здесь и в таблице 4: ТТ – тиотепа; CARBO – карбоплатин; VP16 – вепезид; TMZ – темозоломид; CDDP – цисплатин; VCR – винкристин; CPM – циклофосфамид.
Notes. Here and in Table 4: CR – complete response; PR – partial response; PD – progressive disease; TT – thiotepa; CARBO – carboplatin; VP16 – vepesid, TMZ – temozolomide; CDDP – cisplatin; VCR – vincristine; CPM – cyclophosphamide; GTR – gross total resection; HDCT – high-dose chemotherapy; auto-HSCT – autologous hematopoietic stem cell transplantation.

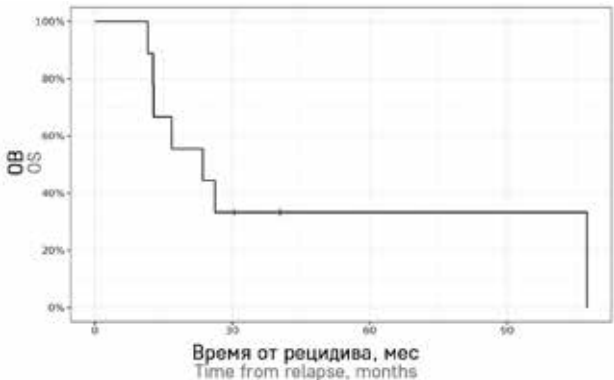
Таблица 4
Результаты лечения пациентов исследуемой группы (n = 9)

Tables 4
Treatment results in the enrolled patients (n = 9)

Результат Result	Всего, n (%) Total, n (%)	Группа SHH (n = 3), n (%) The SHH group (n = 3), n (%)	Группа 3 (n = 1), n (%) Group 3 (n = 1), n (%)	Группа 4 (n = 5), n (%) Group 4 (n = 5), n (%)
СБ SD	2 (22,2)	0 (0,0)	1 (100,0)	1 (20,0)
ЧО PR	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
ПО CR	5 (55,6)	2 (66,7)	0 (0,0)	3 (60,0)
ПБ PD	2 (22,2)	1 (33,3)	0 (0,0)	1 (20,0)
Смерть от ПБ Death of PD	6 (66,7)	2 (66,7)	1 (100,0)	3 (60,0)
Ранняя летальность* Early mortality*	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Смерть от терапии в ремиссии Treatment-related death while in remission	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Смерть от других причин Death of other causes	1 (11,1)	1 (33,3)	0 (0,0)	0 (0,0)
Второй рецидив The second relapse	7 (77,8)	3 (100,0)	0 (0,0)	4 (80,0)
Вторая опухоль A second tumor	1 (11,1)	1 (33,3)	0 (0,0)	0 (0,0)
Потеря из-под наблюдения Lost to follow-up	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)

Примечание. СБ – стабилизация болезни. * – летальность в первые 2 мес от начала лечения.
Notes. SD – stable disease, * – mortality within 2 months of treatment initiation.

Рисунок 1
ОВ исследуемой группы пациентов ($n = 9$)
ДИ – доверительный интервал
Figure 1
Overall survival (OS) of the enrolled patients ($n = 9$)
CI – confidence interval



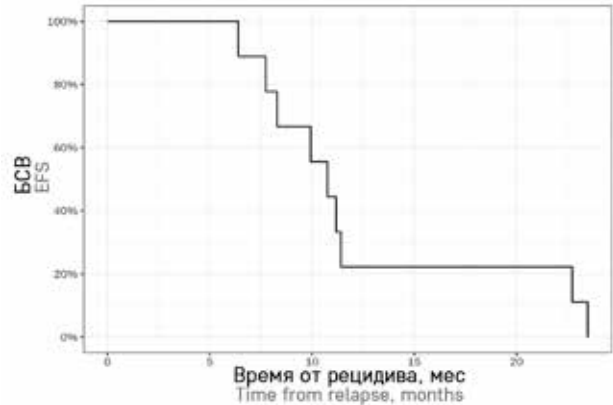
Время от рецидива, мес Time from relapse, months	12	18	24
ОВ, % OS, %	89 (95% ДИ 71–100)	56 (95% ДИ 31–100)	44 (95% ДИ 21–92)
	89 (95% CI 71–100)	56 (95% CI 31–100)	44 (95% CI 21–92)

Таблица 5
Токсические проявления ВДХТ с ауто-ТГСК у исследуемой группы пациентов ($n = 9$)
Tables 5
HDCT with auto-HSCT toxicity in the enrolled patients ($n = 9$)

Пациент Patient	Токсические проявления Toxicity
№1	Гематологическая токсичность IV степени Grade 4 hematologic toxicity
№2	Гематологическая токсичность IV степени, стоматит, эзофагит Grade 4 hematologic toxicity, stomatitis, esophagitis
№3	Гематологическая токсичность IV степени, энтероколит, стоматит, токсидермия Grade 4 hematologic toxicity, enterocolitis, stomatitis, toxicoderma
№4	Гематологическая токсичность IV степени, энтероколит, стоматит, эзофагит Grade 4 hematologic toxicity, enterocolitis, stomatitis, esophagitis
№5	Гематологическая токсичность IV степени, энтероколит, стоматит, токсидермия Grade 4 hematologic toxicity, enterocolitis, stomatitis, toxicoderma
№6	Гематологическая токсичность IV степени Grade 4 hematologic toxicity
№7	Гематологическая токсичность IV степени, энтероколит, стоматит, эзофагит Grade 4 hematologic toxicity, enterocolitis, stomatitis, esophagitis
№8	Гематологическая токсичность IV степени Grade 4 hematologic toxicity
№9	Гематологическая токсичность IV степени, энтероколит, сепсис, ототоксичность Grade 4 hematologic toxicity, enterocolitis, sepsis, ototoxicity

статочное количество периферических стволовых клеток крови в 2). В раннем посттрансплантационном периоде у всех пациентов наблюдалась гематологическая токсичность IV степени, в 10 случаях – бактериальный сепсис и в 3 – герпетическая инфекция. После запланированного противорецидивного

Рисунок 2
БСВ исследуемой группы пациентов ($n = 9$)
Figure 2
Event-free survival (EFS) of the enrolled patients ($n = 9$)



Время от рецидива, мес Time from relapse, months	8	10	12
БСВ, % EFS, %	78 (95% ДИ 55–100)	56 (95% ДИ 31–100)	22% (95 ДИ 6,5–75)
	78 (95% CI 55–100)	56 (95% CI 31–100)	22% (95 CI 6,5–75)

лечения у 13 из 15 пациентов ПО или ЧО сохранялся в среднем 16 мес. Медиана ОВ составила 41 мес для всей группы. На момент публикации только 1 пациент был жив в ремиссии более 93 мес после ГТР. В 13 случаях наблюдалась ПБ с летальным исходом. Один пациент скончался через 13 мес после завершения лечения в ремиссии от пневмонии. Трехлетние БСВ и ОВ составили $19 \pm 10\%$ и $56 \pm 6\%$ соответственно. Двухлетняя БСВ составила 60% для детей, которые получили 2 курса миелоаблативной терапии, и 0% для тех, кому был проведен только 1 курс ($p = 0,004$); 2-летняя ОВ – 70% и 20% соответственно ($p = 0,009$).

В 2010 г. Ira J. Dunkel и соавт. [4] опубликовали результаты долгосрочного наблюдения за расширенной серией случаев ($n = 25$) применения ВДХТ с ауто-ТГСК в рамках терапии первого рецидива МБ. В среднем через 8,5 мес (диапазон 2,3–58,5 мес) у 16 пациентов был констатирован второй рецидив (в дальнейшем все скончались от ПБ). Шесть пациентов живы без событий в среднем через 151,2 мес после ВДХТ с ауто-ТГСК (диапазон 127,2–201,6 мес). Медиана ОВ составила 26,8 мес (95% ДИ 11,9–51,1). БСВ и ОВ через 10 лет после ВДХТ с ауто-ТГСК составили 24% (95% ДИ 9,8–41,7). У большинства наблюдалась тяжелая гематологическая токсичность, фебрильная нейтропения и орофарингеальный мукозит, требующий назначения опиоидов и полного парентерального питания. В первые 29 дней после ВДХТ с ауто-ТГСК в 3 (12%) случаях зарегистриро-

вана смерть от токсичности, связанная с полиорганный недостаточностью ($n = 2$) и аспергиллезной инфекцией с веноокклюзионной болезнью печени ($n = 1$).

В 2022 г. С. Gaab и соавт. [5] опубликовали результаты исследования локального и системного лечения рецидивов МБ у детей и взрослых. Среди пациентов с ПО или ЧО у 12 детей применение ВДХТ с ауто-ТГСК не сопровождалось улучшением выживаемости без прогрессирования (ВБП) (медиана 19,9 мес (95% ДИ 15,9–24,0)) по сравнению с 11, которым данный вид терапии не проводился (медиана ВБП 15,7 мес (95% ДИ 5,7–25,6); $p = 0,509$). Медиана ОВ для группы с ВДХТ с ауто-ТГСК составила 47,8 мес (95% ДИ 11,1–84,6), а без нее – 34,6 мес ((95% ДИ 14,0–55,2); $p = 0,253$). У всех пациентов после ВДХТ с ауто-ТГСК задокументирована выраженная гематологическая токсичность. В большинстве случаев отмечалось развитие тяжелого орального и интестинального мукозита, фебрильной нейтропении. Другими негематологическими токсическими проявлениями были преходящая кожная и гепатотоксичность, а также необратимая нейросенсорная тугоухость. В 1 случае наблюдалось жизнеугрожающее состояние, обусловленное аденовирусной инфекцией, которая осложнилась кишечным кровотечением, септическим шоком и транзиторной острой почечной недостаточностью.

Отсутствие куративной эффективности и выраженная токсичность ставят обоснованность применения ВДХТ с ауто-ТГСК у пациентов с рецидивом МБ под сомнение. В нашей группе 6 из 9 детей погибли от дальнейшей ПБ, в том числе с развитием в 4 случаях фатального второго или третьего рецидива. Еще 1 пациент скончался от прогрессии глиобластомы, диагностированной спустя 7 лет от завершения

лечения второго метастатического рецидива МБ. Два пациента живы в ремиссии после терапии второго и третьего рецидивов, которые развились несмотря на применение ранее ВДХТ с ауто-ТГСК. Зарубежные данные и результаты проведенного нами анализа диктуют необходимость поиска терапевтических стратегий, являющихся альтернативными действующим стандартам лечения. В последние годы проводится исследование метронормного режима МЕММАТ (Medulloblastoma European Multitarget Metronomic Anti-Angiogenic Trial; ClinicalTrials.gov, идентификатор NCT01356290), токсичность которого является управляемой. В ряде случаев терапия МЕММАТ приводит к улучшению ВБП [6, 7].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В связи с отсутствием куративной эффективности и выраженной токсичностью ВДХТ с ауто-ТГСК в лечении рецидивов МБ не рекомендована. В целях улучшения ВБП вместо ВДХТ с ауто-ТГСК могут быть рассмотрены метронормные режимы (МЕММАТ и др.).

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Не указан.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

ORCID

Sysoev A.E. ORCID: <https://orcid.org/0009-0005-1920-9343>

Papusha L.I. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7750-5216>

Salnikova E.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9846-2793>

Protsvetkina A.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8562-8945>

Merishavyan A.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5310-5928>

Vilesova I.G. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6296-4305>

Tereshchenko G.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7317-7104>

Karachunskiy A.I. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9300-5198>

Литература / References

1. Sabel M., Fleischhack G., Tippelt S., Gustafsson G., Doz F., Kortmann R., et al. SIOP-E Brain Tumour Group. Relapse patterns and outcome after relapse in standard risk medulloblastoma: a report from the HIT-SIOP-PNET4 study. *J Neurooncol* 2016; 129 (3): 515–24.
2. Fleischhack G. HIT-REZ 2005 Multi-center, cooperative therapy optimization study and phase II study for the treatment of children, adolescents and young adults with therapy-resistant or recurrent primitive neuroectodermal brain tumors (medulloblastomas, supratentorial PNETs) and ependymomas.
3. Massimino M., Gandola L., Spreafico F., Biassoni V., Luksch R., Colini P., et al. No salvage using high-dose chemotherapy plus/minus reirradiation for relapsing previously irradiated medulloblastoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2009; 73: 1358–63.
4. Dunkel I.J., Gardner S.L., Garvin J.H., Jr., Goldman S., Shi W., Finlay J.L. High-dose carboplatin, thiopeta, and etoposide with autologous stem cell rescue for patients with previously irradiated recurrent medulloblastoma. *Neuro Oncol* 2010; 12: 297–303.
5. Gaab C., Adolph J.E., Tippelt S., Mikasch R., Obrecht D., Mynarek M., et al. Local and Systemic Therapy of Recurrent Medulloblastomas in Children and Adolescents: Results of the P-HIT-REZ 2005 Study. *Cancers* 2022; 14: 471.
6. Peyrl A., Chocholous M., Kieran M.W., Azizi A.A., Prucker C., Czech T., et al. Antiangiogenic metronomic therapy for children with recurrent embryonal brain tumors. *Pediatr Blood Cancer* 2012; 59 (3): 511–7.
7. Slavic I., Mayr L., Stepien N., Gojo J., Aliotti Lippolis M., Azizi A.A., et al. Improved Long-Term Survival of Patients with Recurrent Medulloblastoma Treated with a “MEMMAT-like” Metronomic Antiangiogenic Approach. *Cancers (Basel)* 2022; 14 (20): 5128. DOI: 10.3390/cancers14205128

© 2024 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ
им. Дмитрия Рогачева»
Минздрава России
Поступила 25.03.2024
Принята к печати 08.05.2024



EDN: ZNMOLO

Контактная информация:

Ведмедская Виктория Андреевна,
младший научный сотрудник лаборатории
трансплантационной иммунологии
и иммунотерапии гемобластозов
ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева»
Минздрава России
Адрес: 117997, Москва,
ул. Саморы Машела, 1
E-mail: viktor.zubachenko@dgoi.ru

DOI: 10.24287/1726-1708-2024-23-2-48-59

Опыт изготовления гаплоидентичного клеточного продукта, обогащенного Т-регуляторными лимфоцитами

В.А. Ведмедская, Д.Е. Першин, М.С. Фадеева, Т.А. Созонова, Е.А. Малахова,
Е.А. Кулаковская, О.Б. Лодоева, Э.Я. Мусаева, Я.О. Музалевский, А.С. Казаченко,
Д.С. Осипова, Е.А. Бадрин, В.Е. Бельчиков, А.К. Мелькова, Л.Н. Шелихова, Д.Н. Балашов,
М.А. Масчан

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, Москва

Реакция «трансплантат против хозяина» (РТПХ) остается основным жизнеугрожающим иммунологическим осложнением трансплантации гемопоэтических стволовых клеток. Несмотря на современные фармакологические возможности профилактики и терапии данного состояния, все еще сохраняется потребность в поиске новых подходов к его разрешению. В настоящее время в мировой клинической практике появляется все больше опыта в области применения клеточных продуктов (КП) Т-регуляторных клеток (T_{reg}) для лечения резистентной РТПХ. Описан ряд альтернативных протоколов производства КП для T_{reg} -терапии. Мы изучили возможности получения и использования T_{reg} в качестве клеточной терапии и представляем данные нашего опыта изготовления гаплоидентичного T_{reg} -обогащенного КП (T_{reg} КП) путем комбинации методик иммуномагнитной селекции $CD25^+$ и сортировки на основе проточной цитофлуориметрии. Исследование одобрено независимым этическим комитетом и утверждено решением ученого совета НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева. В исследовании приведена характеристика процессов производства 9 T_{reg} КП. Согласно описанному в нашей работе протоколу производства, можно получить КП, соответствующий заданным характеристикам, необходимым для одобрения к клиническому применению. Контроль качества включал оценку клеточного состава, жизнеспособности и микробиологической безопасности продукта и был выполнен на всех основных этапах производства. Финальный КП характеризуется стабильно высоким содержанием FoxP3-экспрессирующих T_{reg} (медиана составила 98%) с медианой жизнеспособности 99,1% и обладает высоким потенциалом функциональной эффективности. Таким образом, протокол получения T_{reg} КП путем комбинации методик иммуномагнитной селекции $CD25^+$ и цитофлуориметрического клеточного сортировки может быть использован для клинического применения в целях терапии РТПХ.

Ключевые слова: реакция «трансплантат против хозяина», трансплантация гемопоэтических стволовых клеток, клеточные продукты, Т-регуляторные клетки, иммуномагнитная селекция $CD25^+$, цитофлуориметрический клеточный сортинг

Ведмедская В.А. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2024; 23 (2): 48–59. DOI: 10.24287/1726-1708-2024-23-2-48-59

© 2024 by «D. Rogachev NMRCPHOI»

Received 25.03.2024

Accepted 08.05.2024

Experience in manufacturing a haploidentical biomedical cell product enriched with regulatory T-lymphocytes

V.A. Vedmedskaya, D.E. Pershin, M.S. Fadeeva, T.A. Sozonova, E.A. Malakhova, E.A. Kulakovskaya,
O.B. Lodoeva, E.Ya. Musaeva, Ya.O. Muzalevskii, A.S. Kazachenok, D.S. Osipova, E.A. Badrin, V.E. Belchikov,
A.K. Melkova, L.N. Shelikhova, D.N. Balashov, M.A. Maschan

The Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology of Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow

Graft-versus-host disease (GVHD) remains the main life-threatening immunologic complication of hematopoietic stem cell transplantation. Despite modern pharmacological approaches for preventing and treating GVHD, there remains a need for new approaches to cure GVHD. Currently, more and more clinical experience is emerging globally in the field of using regulatory T-cell (T_{reg}) therapies for the treatment of refractory GVHD. Manufacturing cell products for T_{reg} therapies has a wide range of protocol variations. We have developed an approach of T_{reg} manufacturing for cell therapy and present data from our experience in manufacturing a haploidentical T_{reg} cell product by combining $CD25^+$ immunomagnetic selection with closed system flow-based cell sorting methods. The study was approved by the Independent Ethics Committee and the Scientific Council of the Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology. The study describes the processes of producing 9 T_{reg} cell products. According to the manufacturing protocol described here, it is possible to obtain a cell product that meets the quality control requirements necessary for approval for clinical use. Quality control includes the assessment of the cell composition, viability, and microbiological safety of the product, and is performed at all major stages of production. The final cell product is characterized by consistently high levels of FoxP3-expressing T_{reg} (median: 98%), with a median cell viability of 99.1%, and has a high potential for functional efficacy. Thus, the protocol for producing T_{reg} cell products by combining $CD25^+$ immunomagnetic selection with flow cytometry-based cell sorting methods can be used for the clinical treatment of GVHD.

Key words: graft-versus-host disease, hematopoietic stem cell transplantation, cell products, regulatory T-cell, $CD25^+$ immunomagnetic selection, flow cytometry-based cell sorting

Vedmedskaya V.A., et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology 2024; 23 (2): 48–59.
DOI: 10.24287/1726-1708-2024-23-2-48-59

Correspondence:
Victoria A. Vedmedskaya,
a junior researcher at the Laboratory of
Transplantation Immunology
and Immunotherapy of Hemoblastoses
of the Dmitry Rogachev National Medical
Research Center of Pediatric Hematology,
Oncology and Immunology, Ministry
of Healthcare of the Russian Federation
Address: 1 Samory Mashela St.,
Moscow 117997, Russia
E-mail: viktor.zubachenko@dgoi.ru

Аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК) является основной терапевтической опцией для целого спектра онкологических и гематологических заболеваний, а также для ряда врожденных иммунологических и некоторых других наследственных патологий. Одним из наиболее частых и жизнеугрожающих осложнений после алло-ТГСК остается развитие реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ) [1–3]. За последние несколько десятилетий был совершен огромный провыв в использовании иммуносупрессивных препаратов для профилактики и лечения РТПХ. Но, несмотря на это, развитие РТПХ является по-прежнему острой проблемой, затрагивающей большое число пациентов, в связи с чем поиск альтернативных методов лечения остается актуальной задачей.

В настоящий момент описаны различные механизмы иммунных процессов, лежащих в основе патофизиологии РТПХ [4]. Принято считать, что основным механизмом является повреждение донорскими аллоспецифичными Т-лимфоцитами тканей реципиента. Процесс инициируется в результате активации донорских Т-лимфоцитов в трансплантате после распознавания антигенов, представленных на антигенпрезентирующих клетках реципиента. Данный процесс запускает клональную пролиферацию эффекторных донорских Т-клеток ($T_{эфф}$) с последующей их миграцией к тканям-мишеням, синтезом провоспалительных цитокинов и реализацией цитотоксических функций [5].

На развитие РТПХ влияют различные факторы, такие как степень несоответствия антигенов гистосовместимости между донором и реципиентом, а также подлежащий провоспалительный фон в тканях, сформированный в условиях применения высокодозной химио- и лучевой терапии. Кроме того, фармакологическое сопровождение ТГСК, режимы кондиционирования и иммуносупрессивная профилактика развития РТПХ влияют на баланс клеток иммунной системы, приводя к длительной лимфопении в ранний посттрансплантационный период. В свою очередь, длительное нахождение клеток иммунной системы в несбалансированном состоянии препятствует гармоничному восстановлению субпопуляций лимфоцитов, приводя к отсроченной иммунореконституции и увеличивая риски инфекционных осложнений [6, 7]. Понимание всех вышеупомянутых механизмов имеет решающее значение для разработки эффективных стратегий профилактики и лечения РТПХ.

Согласно данным литературы, на мышиных моделях многократно была продемонстрирована ключевая роль Т-регуляторных клеток ($T_{рег}$) в разрешении процессов РТПХ [8, 9]. Кроме того, известно, что их персистенция в раннем посттранспланти-

онном периоде обеспечивает необходимый уровень периферической толерантности, тем самым препятствуя развитию патологических процессов, лежащих в основе РТПХ [6, 10–12]. В условиях процедуры ТГСК $T_{рег}$ обеспечивают индукцию толерантности к аллоантигенам, способствуя более гармоничному взаимодействию клеток донора и реципиента [13, 14].

$T_{рег}$ впервые были описаны группой S. Sakaguchi и соавт. как популяция $CD4^+$ Т-лимфоцитов с высокой плотностью экспрессии рецептора $CD25$ (α -цепь рецептора интерлейкина-2) и иммуносупрессивными и регуляторными свойствами [15]. Популяция $T_{рег}$ крайне немногочисленна (порядка 1–2% среди всех клеток крови) и не имеет уникального маркера на своей поверхности. В литературе можно встретить различные подходы к классификации $T_{рег}$, но все они так или иначе сводятся к 2 основным популяциям: центральные, или естественные, $T_{рег}$ тимического происхождения и индуцированные, или периферические, $T_{рег}$ [16]. Дифференциация этих популяций между собой заключается в особенностях эпигенетического регулирования транскрипционного фактора FoxP3 – белка $T_{рег}$, являющегося одновременно и ключевым маркером, и основой их функциональности [17]. Деметилированная $T_{рег}$ -специфическая область ($T_{рег}$ -specific demethylated region, TSDR) определяет перманентную экспрессию генов, поддерживающих постоянство экспрессии FoxP3 в $T_{рег}$ -лимфоцитах тимического происхождения [18]. Кроме этого, общую популяцию $T_{рег}$ можно подразделить на пул наивных клеток и $T_{эфф}$, в зависимости от их статуса дифференцировки [19]. Наивные $T_{рег}$ не встречались со специфичным к своему Т-клеточному рецептору антигеном и находятся во вторичных лимфоидных органах. При встрече с антигеном они активируются и дифференцируются в $T_{рег}$ -лимфоциты центральной памяти и $T_{эфф}$, мигрируя в периферические ткани [20, 21].

Современные фармацевтические подходы к контролю РТПХ достаточно вариативны и не всегда возможны к использованию в полном объеме ввиду своей токсичности. В связи с этим поиск новых терапевтических подходов, в том числе и в области адоптивных клеточных технологий, становится актуальной и важной задачей. Первые результаты клинического применения $T_{рег}$ в качестве терапии РТПХ были получены P. Trzonkowski и соавт. в 2009 г. [22]. Это исследование продемонстрировало потенциальные преимущества адоптивного переноса $T_{рег}$ у пациентов с острой и хронической РТПХ. Инфузия $T_{рег}$, полученных от гаплоидентичных доноров, приводила к улучшению клинической картины РТПХ, что позволяло снизить объем иммуносупрессии у пациентов. Этот подход продемонстрировал многообещающую способность $T_{рег}$ модулировать иммунный ответ у

пациентов с РТПХ, что в дальнейшем было подтверждено во многих работах, посвященных как солидной трансплантологии, так и ТГСК [7, 23–25].

За последнее десятилетие стремительный прогресс технологий в сфере биомедицины привел не только к расширению направлений, но и к увеличению их доступности. Все больший интерес направлен на развитие клеточных технологий, в частности адоптивного переноса различного рода клеток, полученных прямой селекцией из биоматериала либо же культивированных *ex vivo* с иммуномодулирующей целью [26–28]. Несмотря на рост количества клинических исследований $T_{\text{рег}}$ -терапии, на данный момент не существует универсального способа изготовления клеточного продукта (КП), обогащенного $T_{\text{рег}}$ ($T_{\text{рег}}$ КП).

Как правило, методы изготовления $T_{\text{рег}}$ КП основываются на иммуномагнитной сепарации клеток, флуоресцентном клеточном сортинге либо сочетании этих подходов. Также активно разрабатываются протоколы дальнейшей экспансии $T_{\text{рег}}$ -лимфоцитов, полученных вышеупомянутыми методами. Однако крайне вариабельные подходы к условиям получения, культивирования и применения $T_{\text{рег}}$ затрудняют их сравнительный анализ [27, 29]. Все применяемые технологии являются дорогостоящими и достаточно трудоемкими процедурами, а их комбинации лишь увеличивают стоимость и ограничивают доступность $T_{\text{рег}}$ -терапии.

В данной работе мы описываем стратегию изготовления $T_{\text{рег}}$ КП в условиях надлежащей производственной практики путем комбинации процессов иммуномагнитной селекции $CD25^+$ -клеток на платформе CliniMACS plus (Miltenyi Biotec, Германия) из продукта афереза (ПА) и последующего сортинга $T_{\text{рег}}$ на основе проточной цитофлуориметрии на платформе MACSQuant Tyto (Miltenyi Biotec, Германия).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование одобрено независимым этическим комитетом и утверждено решением ученого совета НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева. Доноры подписали информированное согласие на участие в исследовании. Терапевтическое применение КП было одобрено индивидуальным решением врачебной комиссии в соответствии с клиническими показаниями пациентов.

Клеточные продукты

В работе приведена характеристика $T_{\text{рег}}$ КП ($n = 9$), произведенных в период с декабря 2021 г. по декабрь 2022 г. в НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева. В их число вошли данные 3 процессов, проведенных в рамках валидации протокола получения $T_{\text{рег}}$ КП

(обязательного этапа, предшествующего внедрению в клиническую практику), а также 6 $T_{\text{рег}}$ КП, в дальнейшем использованных в качестве клеточной терапии пациентов.

Пациенты

В исследование включены данные 6 пациентов, перенесших алло-ТГСК с процессингом трансплантата от гаплоидентичных доноров при помощи автоматизированной технологии TCR $\alpha\beta$ - и CD19-деплеции на платформе CliniMACS Prodigy (Miltenyi Biotec, Германия). Все пациенты имели рефрактерную к терапии РТПХ (таблица 1). Медиана возраста пациентов на момент алло-ТГСК составляла 5 (2–12) лет, медиана срока от алло-ТГСК до клеточной терапии – 9,2 (4–14) мес.

Процедура получения клеточного продукта, обогащенного $T_{\text{рег}}$ -регуляторными клетками

Все $T_{\text{рег}}$ КП для пациентов были заготовлены от исходных доноров гемопоэтических стволовых клеток. Материал для изготовления $T_{\text{рег}}$ КП получали путем нестимулированного лейкофереза в соответствии с протоколом сбора мононуклеаров периферической крови с использованием прибора Spectra Optia, программное обеспечение версий 6 и 9 и Cobe Spectra, программное обеспечение версии 6.1 (Caridian BCT Inc, Lakewood, CO, США).

Процедура получения $T_{\text{рег}}$ КП из ПА состояла из 2 последовательных этапов:

1 – этап иммуномагнитной селекции $CD25^+$ -клеток с помощью прибора CliniMACS plus;

2 – сортинг $T_{\text{рег}}$ – этап сепарации $T_{\text{рег}}$ с помощью клеточного сортера MACSQuant Tyto на основании метода проточной цитометрии из фракции, полученной на предыдущем этапе. Схема процесса проиллюстрирована на рисунке 1.

Все этапы процедуры и формирования окончательного $T_{\text{рег}}$ КП проводились в соответствии с правилами надлежащей производственной практики в условиях чистых помещений.

Процесс иммуномагнитной селекции $CD25^+$ (этап 1)

ПА для подготовки к селекции последовательно инкубировали при температуре +4°C с биотинилированными флуоресцентными антителами к $CD25$ (GMP- $CD25$ -PE-Biotin, Miltenyi Biotec, Германия) и магнитными антителами к биотину (GMP CliniMACS Anti-Biotin Reagent, Miltenyi Biotec, Германия) в соответствии с протоколом производителя. Далее выполняли магнитную сепарацию клеток на платформе CliniMACS Plus. В результате данного процессинга получали КП селекции, обогащенный $CD25^+$ -клетками ($CD25^+$ КП).

Таблица 1
Характеристика пациентов, включенных в исследование

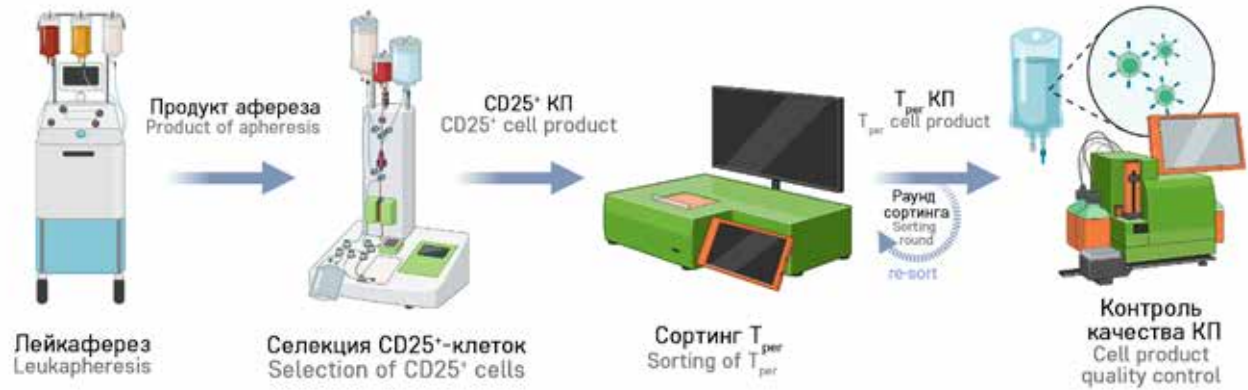
Tables 1
Patient characteristics

Пациент Patient	Инициальный диагноз Initial diagnosis	Возраст на момент алло-ТГСК, годы Age at allo-HSCT, years	РТПХ GVHD	Проявления РТПХ GVHD manifestation sites	Срок от алло-ТГСК до терапии T _{рег} , дни Time from allo-HSCT to CT, days	Доза T _{рег} /кг, E+05 T _{reg} dose/kg, E+05
P1	Миелодиспластический синдром с мутацией в гене <i>SAMD9</i> Myelodysplastic syndrome with <i>SAMD9</i> mutation	7	Хроническая Chronic	Кожа, кишечник Skin, intestine	126	5
P2	APDS-синдром с мутацией <i>PIK3D</i> APDS with <i>PIK3D</i> mutation	2	Хроническая Chronic	Кожа Skin	419	5
P3	Острый миелоидный лейкоз Acute myeloid leukaemia	3	Хроническая Chronic	Кожа, слизистые Skin, mucosae	133	5
P4	Острый лимфобластный лейкоз, BI Acute lymphoblastic leukaemia, BI	12	Хроническая Chronic	Кожа, желудочно-кишечный тракт Skin, gastrointestinal tract	406	2.5
P5	Тяжелая комбинированная иммунная недостаточность, дефицит аденозиндеаминазы Severe combined immune deficiency, adenosine deaminase deficiency	4	Хроническая Chronic	Кожа, кишечник, легкие Skin, intestine, lungs	169	5
P6	Нейробластома Neuroblastoma	6	Хроническая Chronic	Кожа Skin	384	5

Note. Allo-HSCT – allogeneic hematopoietic stem cell transplantation; GVHD – graft-versus-host disease; CT – cell therapy; T_{рег} – regulatory T cells.

Рисунок 1
Схема процесса получения T_{рег} КП
Последовательно указаны основные этапы производства T_{рег} КП

Figure 1
Scheme of the process of obtaining T_{рег} cell products
The sequence of the main stages of T_{рег} cell product manufacturing



Процесс сортировки Т-регуляторных клеток (этап 2)

Процесс сортировки T_{рег} выполняли из материала CD25⁺ КП при помощи клеточного сортера MACSQuant Tyto. Для осуществления сортировки CD25⁺ КП инкубировали с флуоресцентными моноклональными антителами GMP-CD4 VioBlue (Miltenyi Biotec, Германия) и GMP-CD127 APC (Miltenyi Biotec, Германия), далее материал помещали в стерильный одноразовый картридж MACS GMP Tyto Cartridge (Miltenyi Biotec, Германия), представляющий собой закрытую систему. Стратегия гейтирования для определения сортируемой популяции T_{рег}-лимфоцитов (рисунки 2) соответствовала ее поверхностному фенотипу CD4⁺CD25^{high}CD127^{low}.

Учитывая специфику процесса, а именно ограничение картриджа по вместимости количества клеток и зависимость чистоты финальной фракции от скорости потока, материал CD25⁺ КП был разделен на несколько фракций для проведения последовательных сортировок. Для достижения более высокой клеточности финального продукта для части T_{рег} КП проводились повторные раунды сортировки.

Контроль качества клеточного продукта

Контроль качества, жизнеспособности и клеточного состава был произведен на всех этапах производства. Контрольными точками проведения исследований были выбраны ПА, CD25⁺ КП и финальный T_{рег} КП. Были утверждены следующие

Рисунок 2

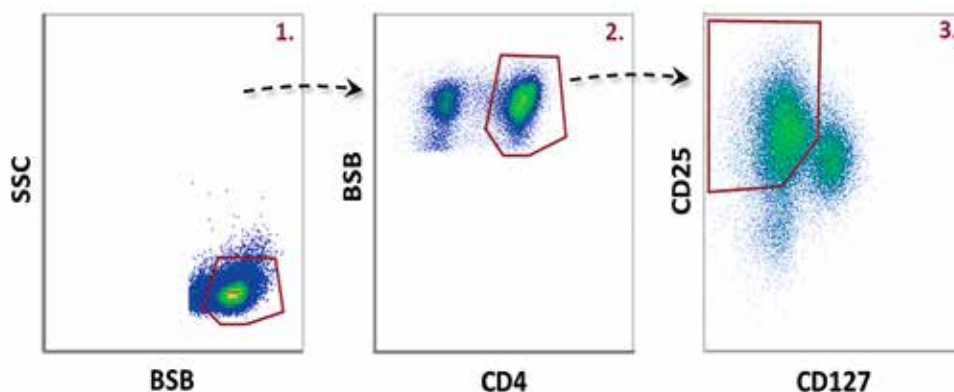
Стратегия последовательного гейтирования T_{reg} в процессе сортировки

1 – выделение популяции лейкоцитов от дебриса среди всех событий на основании параметров бокового светорассеяния (SSC) и обратного светорассеяния синего лазера (BSB); 2 – выделение региона Т-лимфоцитов среди всех лейкоцитов на основании положительной экспрессии маркера CD4; 3 – выделение региона T_{reg} в соответствии с фенотипом $CD25^{high}CD127^{low}$ среди $CD4^{+}$ Т-лимфоцитов. Данный регион является регионом сортировки

Figure 2

Sequential gating strategy for T_{reg} during the sorting process

1 – gating of the population of leukocytes from debris among all events based on the SSC (side scatter) and BSB (blue laser backscatter) parameters; 2 – identification of the $CD4^{+}$ T lymphocyte region among all leukocytes based on positive expression; 3 – identification of the T_{reg} region in accordance with the $CD25^{high}CD127^{low}$ phenotype among $CD4^{+}$ T lymphocytes. This region is designated as the sorting gate



параметры качества продукта, являющиеся критериями одобрения его дальнейшего терапевтического использования: микробиологическая безопасность продукта, жизнеспособность T_{reg} КП не менее 70% и содержание популяции T_{reg} в финальном продукте не менее 85%.

Оценка микробиологической безопасности включала отсутствие роста микроорганизмов (посев на стерильность (BD BACTEC, США)), отсутствие содержания эндотоксина (< 1 EU/mL) (Endosafe, LAL test, США) и отрицательный результат контаминации микоплазмой методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени (Евроген, Мусо Real-Time, Россия).

Жизнеспособность и содержание T_{reg} оценивали методом проточной цитометрии в рамках определения клеточного состава продуктов.

Оценка состава клеточных продуктов

Определение количества клеток и их жизнеспособности на всех этапах производства проводили с помощью проточного цитометра MACSQuant (Miltenyi Biotec, Германия). Подробный клеточный состав продуктов исследовали с помощью многоцветных панелей коммерческих моноклональных антител (таблица 2), данные были получены с помощью проточного цитометра CytoFlex (Beckman Coulter, США) и проанализированы с использованием программного обеспечения CytExpert версии 2.3.0.84 (Beckman Coulter, США).

В данной работе для всех исследуемых популяций представлены значения медианы с указанием максимума и минимума разброса.

Оценку субпопуляций T_{reg} проводили по экспрессии маркеров CD45RA и CD197 (CCR7): наивные T_{reg} ($CD45RA^{+}CD197^{+}$), T_{reg} -лимфоциты центральной памяти ($CD45RA^{-}CD197^{+}$), T_{reg} эффекторной памяти ($CD45RA^{-}CD197^{-}$) и T_{eff} (TEMRA) ($CD45RA^{+}CD197^{-}$).

Содержание T_{reg} в финальном продукте определяли согласно протоколу внутриклеточного окрашивания транскрипционного фактора FoxP3 с использованием набора Human FoxP3 Buffer Set (Becton Dickinson, США) в соответствии с инструкцией производителя. Иллюстрация гейтирования T_{reg} на разных этапах производства представлена на рисунке 3.

Для T_{reg} КП (процесс 8) была проведена оценка статуса деметилирования CpG-островков в TSDR локуса FOXP3. ДНК образцов инкубировали без или в присутствии метилчувствительных рестриктаз: HpyCH4IV, AclI, HpaII, HinfI (New England BioLabs, Великобритания). Далее проводили очистку с помощью колонок (Cleanup Standard, Евроген, Россия). Для постановки ПЦР в режиме реального времени использовали реакционную смесь для ПЦР с красителем SYBR Green I (Евроген, Россия), праймеры на регион TSDR и контрольный ген XIST. Условия проведения ПЦР: 95°C 15 мин, 40 циклов 94,0°C 30 с, 65,0°C 30 с, 72,0°C 1 мин. Значения порогового цикла Ct были рассчитаны с помощью программного обеспечения Bio-Rad CFX Manager (BioRad, США). Амплификацию метилированных копий TSDR в образцах, обработанных рестриктазами, оценивали относительно амплификации контрольных, необработанных рестриктазами образцов с помощью метода $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Процент деметилирования рассчитывали как $100 -$ полученный процент метилирования.

Оценка функциональной активности Т-регуляторных лимфоцитов

Функциональная активность T_{reg} оценивалась на этапе валидации клинического протокола. $T_{эфф}$ для постановки исследований были получены методом

флуоресцентного сортинга $TCR\alpha\beta/CD45RO^{+}$ -клеток.

Оценка способности T_{reg} подавлять пролиферативную активность Т-лимфоцитов в ответ на алло-антигены в смешанной клеточной культуре была

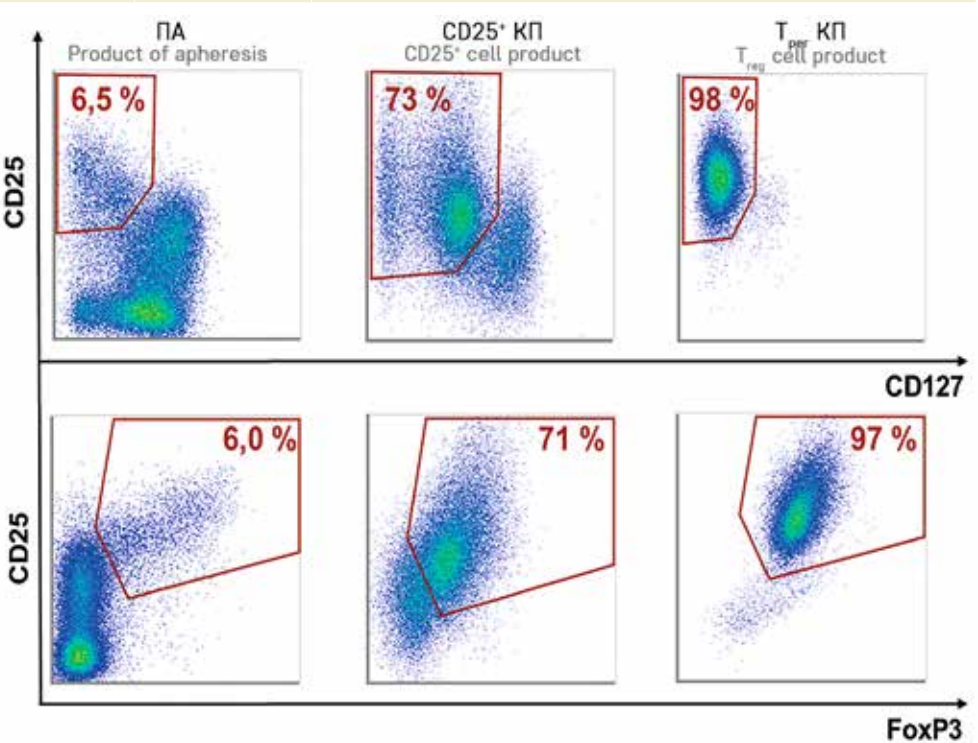
Таблица 2
Моноклональные антитела, используемые в многоцветных панелях для исследования клеточного состава продуктов с помощью проточной цитометрии

Tables 2
Monoclonal antibodies used in the multicolor panels for the study of the cellular composition of products by flow cytometry

Антитело Antibody	Производитель Manufacturer	Клон Clone	Клеточная популяция Cell population
CD45	Beckman Coulter, USA	J33	Лейкоциты Leukocytes
7-AAD	Miltenyi Biotec, Germany	-	Жизнеспособность Viability
CD3	Miltenyi Biotec, Germany	REA613	Т-лимфоциты T-lymphocytes
CD4	Miltenyi Biotec, Germany	M-T466	Т-хелперы T-helpers
FoxP3	Becton Dickinson, USA	236A/E7	T_{reg} T_{reg}
CD25	Miltenyi Biotec, Germany	REA570	T_{reg} T_{reg}
CD127	Miltenyi Biotec, Germany	MB15-18C9	T_{reg} T_{reg}
CD8	Becton Dickinson, USA	SK1	Т-цитотоксические клетки Cytotoxic T-cells
CD19	Miltenyi Biotec, Germany	J3-119	В-лимфоциты B-lymphocytes
CD56	Becton Dickinson, USA	NCAM16.2	НК-лимфоциты NK-lymphocytes
CD16	Beckman Coulter, USA	3G8	НК-лимфоциты/нейтрофилы NK-lymphocytes/neutrophils
TCRab	Miltenyi Biotec, Germany	BW242/412	$TCR\alpha\beta$ Т-лимфоциты $TCR\alpha\beta$ T-lymphocytes
TCRgd	Miltenyi Biotec, Germany	REA591	$TCR\gamma\delta$ Т-лимфоциты $TCR\gamma\delta$ T-lymphocytes
CD14	Miltenyi Biotec, Germany	RM052	Моноциты Monocytes
CD197	Miltenyi Biotec, Germany	REA108	Наивный фенотип/ фенотип памяти Т-лимфоцитов Naive/memory T-lymphocytes phenotype
CD45RA	Miltenyi Biotec, Germany	T6D11	Наивный фенотип/ фенотип памяти Т-лимфоцитов Naive/memory T-lymphocytes phenotype

Рисунок 3
Определение содержания T_{reg} в процессе производства T_{reg} КП с помощью проточной цитометрии
На дот-плотах отображена популяция $CD4^{+}$ Т-лимфоцитов соответствующих КП. Границы популяции T_{reg} отмечены красным. Процент T_{reg} указан среди $CD4^{+}$ Т-лимфоцитов

Figure 3
Determination of T_{reg} content in CP by flow cytometry
The dot plots show the population of $CD4^{+}$ T-lymphocytes in the corresponding CP. The boundaries of the T_{reg} population are marked in red. Numbers indicate the percentage of T_{reg} among $CD4^{+}$ T-lymphocytes



выполнена при помощи проточной цитометрии на основании оценки маркеров пролиферации. Кратко: $T_{\text{эфф}}$ после сортировки были смешаны в 3 соотношениях с $T_{\text{рег}}$ ($T_{\text{рег}}$ КП), далее к ним добавляли выделенную в градиенте плотности фракцию аллогенных мононуклеарных клеток (алло-МНК). Инкубацию проводили в течение 7 сут в среде TexMACS (Miltenyi Biotec, Германия), после чего оценивалась супрессорная активность $T_{\text{рег}}$ по 2 протоколам: исследование пролиферации с помощью протокола Click-iT EdU и определение внутриядерной экспрессии маркера пролиферации Ki-67.

Анализ репликации ДНК в пролиферирующих клетках проводили с использованием набора Click-iT Plus EdU Alexa Fluor 488 (Invitrogen, США) в соответствии с инструкцией производителя. Реагент 5-этинил-2'-дезоксифлуоридин (EdU) добавляли в исследуемые лунки на 5-е сут инкубации. В процессе культивирования EdU встраивается в ДНК во время ее активного синтеза, что позволяет определить процентное содержание клеток в S-фазе клеточного цикла. После завершения культивирования выполняли фиксацию и пермеабиллизацию клеток образцов и их окрашивание реагентами из набора и антителами к поверхностным антигенам CD45, CD3 и маркером жизнеспособности 7-AAD.

Для оценки пролиферации методом определения экспрессии внутриядерного белка Ki-67 (Ki-67 REA183, Miltenyi Biotec, Германия) в финале культивирования образцы окрашивали согласно протоколу исследования внутриядерной/внутриклеточной экспрессии маркеров с использованием коммерческого набора Human FoxP3 Buffer Set (Becton Dickinson, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В соответствии с исследовательским протоколом о применении биомедицинского КП, обогащенного

$T_{\text{рег}}$, перед его внедрением в клиническую практику необходимо было провести серию валидационных процессов изготовления КП, используя биоматериал условно здоровых доноров. После получения удовлетворительных результатов оценки качества и характеристики состава $T_{\text{рег}}$ КП предварительных процессов ($n = 3$) было принято решение о производстве клинических продуктов ($n = 6$). Далее представлены сводные данные по всем процессам.

Все произведенные $T_{\text{рег}}$ КП, включая продукты промежуточных этапов изготовления, отвечали заявленным параметрам микробиологической безопасности, имели высокие показатели жизнеспособности (медиана 99,1% (97–99,8%)) и были одобрены к применению в соответствии с установленными критериями контроля качества.

Медиана клеточности ПА, взятого в работу в качестве стартового материала для селекции CD25, составила $4E+09$ ($2E+09 - 6E+09$). Медиана содержания $T_{\text{рег}}$ в ПА – 2,4% (0,9–3,1%).

Полученные CD25⁺ КП были значительно обогащены $T_{\text{рег}}$, медиана их содержания составила 53% (34–77%). Медиана абсолютного количества $T_{\text{рег}}$ -лимфоцитов в CD25⁺ КП составила $2,6E+07$ ($1,9E+07 - 8,5E+07$). Также кроме $T_{\text{рег}}$ состав продукта селекции был представлен CD3⁺ Т-лимфоцитами (медиана 33,7% (9,4–52,7%)), среди которых большую часть составляли CD4⁺-лимфоциты (медиана 29,6% (7,1–48,3%)), и CD19 В-лимфоцитами (медиана 8,2% (2–21%)). Подробный клеточный состав представлен в таблице 3.

Среднее количество потребовавшихся раундов флуоресцентного сортировки $T_{\text{рег}}$ составило 5 (2–6). Состав $T_{\text{рег}}$ КП после сортировки был представлен в основном $T_{\text{рег}}$, медиана содержания экспрессирующих FoxP3 клеток составила 98% (91–99%). Кроме $T_{\text{рег}}$ состав продукта характеризовался незначи-

Таблица 3
Клеточный состав ПА и селекции CD25⁺

Tables 3
Cellular composition of apheresis products and CD25⁺ selection

Процесс Process	ПА Apheresis product			Продукт селекции CD25 ⁺ CD25 ⁺ selection product						
	Общая клеточность продукта, E+09 Total number of cells in the product, E+09	$T_{\text{рег}}$ (FoxP3 ⁺), % от всех клеток $T_{\text{рег}}$ (FoxP3 ⁺), % of all cells	$T_{\text{рег}}$ (FoxP3 ⁺), E+06 $T_{\text{рег}}$ (FoxP3 ⁺), E+06	Общая клеточность продукта, E+06 Total number of cells in the product, E+06	$T_{\text{рег}}$ (FoxP3 ⁺), % от всех клеток $T_{\text{рег}}$ (FoxP3 ⁺), % of all cells	$T_{\text{рег}}$ (FoxP3 ⁺), E+06 $T_{\text{рег}}$ (FoxP3 ⁺), E+06	Не- $T_{\text{рег}}$ -лимфоциты, % от всех клеток Not $T_{\text{рег}}$ lymphocytes, % of all cells			
							CD3 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD19 ⁺
1	2,7	2,4	65	85	46	39	28	25	2,3	21,4
2	6,0	2	120	62	57,2	35	34	29	3,4	6,7
3	4,0	0,9	36	80	32,9	26	44	36	7,0	17,8
4	4,0	1,5	60	65	40	26	49	46	2,4	8,2
5	4,0	3,1	124	50	76,7	38	17	7	0,6	2,8
6	5,0	3,1	155	42	54	23	32	30	2,1	8,3
7	3,3	2,5	83	35	64,4	22	9	8	1,0	12,6
8	4,0	2,1	84	48	38,8	19	53	48	1,1	1,7
9	6,0	2,9	174	163	53	86	38	37	0,9	5,0

тельным количеством CD4⁺ Т-лимфоцитов (медиана 1,8% (0,5–6,8%)) и практически полным отсутствием CD8⁺ Т-лимфоцитов (медиана 0,1% (0–0,2%)). Все Т-лимфоциты были представлены TCRαβ⁺-клетками (медиана 2% (0,5–6,5%)). Остальные субпопуляции лимфоцитов также детектировались лишь в небольших количествах: медиана содержания CD16⁺CD56⁺ NK-лимфоцитов 0,1% (0–0,2%), медиана

CD19⁺ В-лимфоцитов 0,1% (0–0,9%). Субпопуляционный состав T_{рег}-лимфоцитов был представлен фенотипом наивных клеток (медиана 26,5% (15,5–44,7%)), клеток центральной памяти (медиана 29% (11,0–42,4%)) и эффекторных клеток памяти (медиана 39,6% (24,5–63,0%)). Подробный клеточный состав T_{рег} КП представлен в таблице 4 и на рисунке 4. Относительное значение деметилирования

Таблица 4
Клеточный состав T_{рег} КП

Tables 4
Cellular composition of T_{рег} cell product

Процесс Process	Общая клеточ- ность продукта, Е+06 Total number of cells in the product, E+06	T _{рег} (FoxP3 ⁺), % от всех клеток T _{рег} (FoxP3 ⁺), % of all cells	T _{рег}				Не-T _{рег} -лимфоциты, % от всех клеток Not T _{рег} lymphocytes, % of all cells					Коли- чество раундов сорти- нга Number of sorting rounds	Выход со- ртинга, % Sorting yield, %
			Наи- вные, % Naïve, %	CM, %	EM, %	TEMRA, %	CD4 ⁺	TCRαβ	CD8 ⁺	CD19 ⁺	CD56 ⁺		
1	20	98	39	26	34	2	1,4	1,5	0,1	0,5	0,1	4	63
2	10	99	45	29	25	2	0,5	0,5	0	0,2	0	5	55
3	14,5	98	37	29	32	2	1,9	2,1	0,2	0,9	0	5	74
4	18,7	91	22	36	45	0	6,8	6,5	0,1	0	0	3	72
5	5	95	16	42	41	2	3,6	3,6	0	0	0	2	69
6	15,5	98	30	33	35	2	0,8	0,8	0	0	0	5	44
7	18	98	19	26	53	2	0,7	0,7	0,1	0,2	0	5	79
8	20	95	27	30	40	4	1,8	2,0	0,2	0,0	0,2	6	57
9	55	94	25	11	63	1	4,8	5,0	0,2	0,1	0	6	64

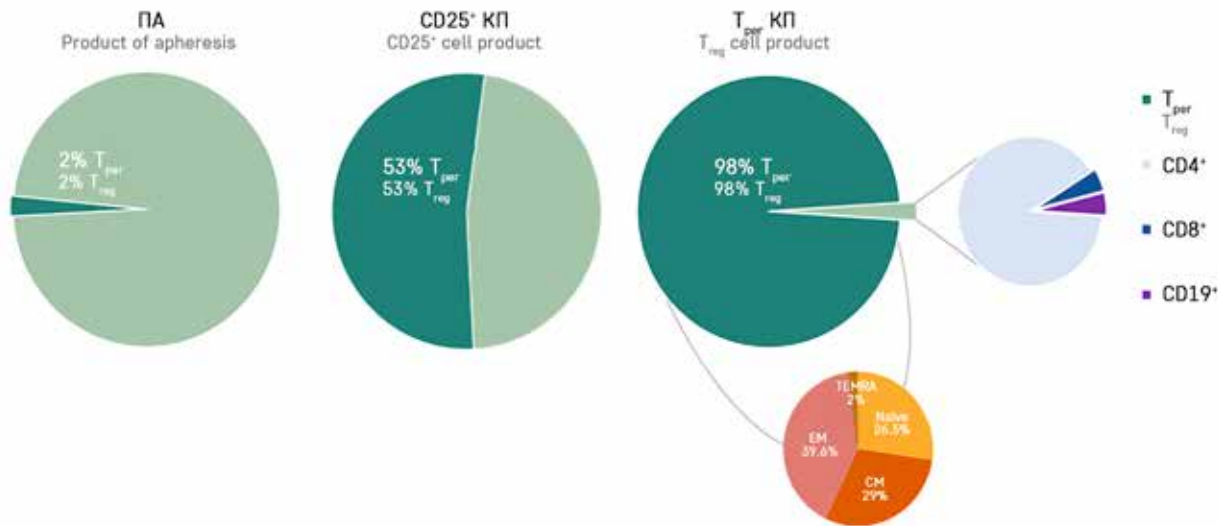
Примечание. Наивные – T_{рег} с фенотипом CD45RA⁺CD197⁺; CM – T_{рег} с фенотипом центральных клеток памяти, CD45RA⁺CD197⁺; EM – T_{рег} с фенотипом эффекторных клеток памяти, CD45RA⁺CD197⁺; TEMRA – T_{рег} с фенотипом эффекторных клеток CD45RA⁺, CD45RA⁺CD197⁺. Выход сорти-нга рассчитан как отношение количества T_{рег} в финальной фракции сорти-нга к количеству T_{рег} в КП селекции CD25⁺.
Note. Naïve T_{рег} – CD45RA⁺CD197⁺; CM – T_{рег} with central memory cell phenotype, CD45RA⁺CD197⁺; EM – T_{рег} with effector memory phenotype, CD45RA⁺CD197⁺; TEMRA – T_{рег} with effector memory phenotype, CD45RA⁺CD197⁺. The sorting yield is calculated as the ratio of the amount of T_{рег} in the final sorting fraction to the amount of T_{рег} in the cell product of CD25⁺ selection.

Рисунок 4
Содержание T_{рег} в КП

На диаграммах указаны медианы процентного содержания T_{рег} от общего числа клеток в ПА, CD25⁺ КП и T_{рег} КП. Диаграмма состава T_{рег} КП содержит 2 дочерние диаграммы: субпопуляционный состав лимфоцитов в продукте (фракция не-T_{рег}) (справа), субпопуляционный состав T_{рег} (внизу)

Figure 4
T_{рег} content in cell products

The diagrams show the median percentage of T_{рег} cells of the total number of cells in apheresis products, CD25⁺ cell products and T_{рег} cell products. The diagram of the T_{рег} cell product composition contains two secondary diagrams: the subpopulation composition of lymphocytes in the product (fraction of non-T_{рег} cells) (right), the subpopulation composition of T_{рег} cells (bottom)



геномного участка TSDR, исследованное для КП 8, составило 52%.

Все 6 пациентов удовлетворительно перенесли инфузию $T_{\text{рег}}$ КП, не было зафиксировано побочных эффектов (ухудшение РТПХ, проявление цитокинового шторма или нейротоксичности). Доза инфузии составила $5E+05$ клеток/кг для 5 пациентов и $2,5E+05$ клеток/кг – для 1.

В дополнение к вышесказанному нами была продемонстрирована супрессорная *in vitro* активность $T_{\text{рег}}$ при исследовании их функциональных особенностей в реакции смешанной культуры в присутствии аллоспецифичных Т-лимфоцитов на валидационном этапе протокола (рисунок 5). Полученные в соответствии с описанным протоколом $T_{\text{рег}}$ способны подавлять пролиферацию $T_{\text{эфф}}$ -лимфоцитов, активированную в ответ на присутствие аллогенных клеток, что отражено в снижении экспрессии $T_{\text{эфф}}$ клетками маркеров пролиферации Ki-67 и EdU.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Современный подход к лечению и профилактике РТПХ обычно включает комбинированное применение фармакологических препаратов в целях ограничения иммунного ответа при сохранении эффекта «трансплантат против лейкоза». Основными являются стратегии, включающие использование кортикостероидов, ингибиторов кальциневрина и антитимоцитарного глобулина для подавления активации и пролиферации аллоспецифичных Т-лимфоцитов [30, 31]. Однако, несмотря на высокую эффективность фармацевтических подходов к контролю РТПХ, поиск новых методов лечения, включая использование адоптивных клеточных технологий, остается актуальной задачей.

Методы, направленные на селекцию $T_{\text{рег}}$ и прямое их применение, а также на культивацию в целях увеличения количества $T_{\text{рег}}$ и усиления их супрессорной функции, представляют собой наиболее актуальную альтернативу современным фармакологическим подходам, основанным во многом на неспецифической иммуносупрессии. Многочисленные доклинические модели продемонстрировали значительный потенциал $T_{\text{рег}}$ для лечения множества патологических состояний, включая аутоиммунные заболевания [32, 33], РТПХ [34] и индукцию толерантности в трансплантации органов [35].

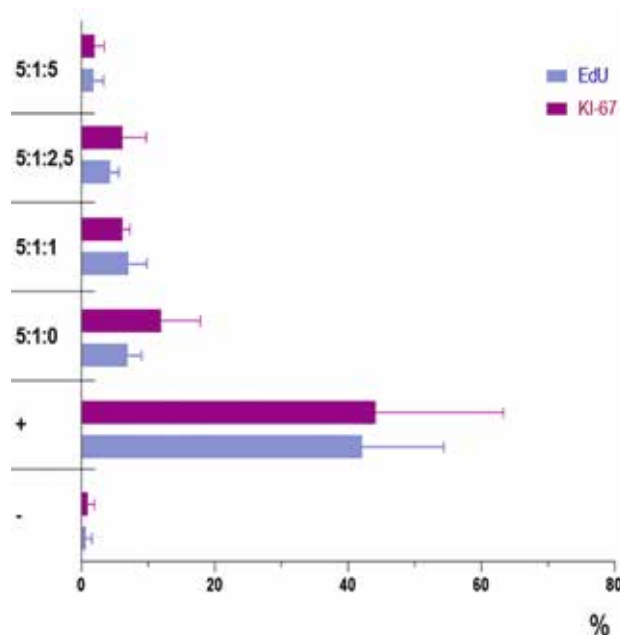
В настоящее время наиболее распространенным подходом является введение пациентам размноженных посредством культивирования *ex vivo* $T_{\text{рег}}$ КП [36, 37]. Процесс культивации обеспечивает доступность дополнительных манипуляций с КП, таких как антиген-направленная модификация, применяемая при ряде аутоиммунных состояний, а также позво-

Рисунок 5

Исследование способности $T_{\text{рег}}$ подавлять пролиферативную активность Т-лимфоцитов в ответ на аллоантигены в клеточной культуре с помощью протоколов оценки Click-i Plus EdU и Ki-67 ($T_{\text{эфф}}$:алло-МНК: $T_{\text{рег}}$). На графике указаны медианы процентного содержания Ki-67 и EdU в популяции $T_{\text{эфф}}$ ($n = 6$). «—» – отрицательный контроль (нестимулированные $T_{\text{эфф}}$); «+» – положительный контроль (активированные $T_{\text{эфф}}$)

Figure 5

An investigation of the ability of $T_{\text{рег}}$ cells to suppress the proliferative activity of T-lymphocytes in response to alloantigens in cell culture using the Click-iPlus EdU and Ki-67 assessment protocols ($T_{\text{эфф}}$:allo-MNC: $T_{\text{рег}}$). The graph shows the median percentages of Ki-67 and EdU in the population of T-effector cells ($n = 6$). “—” negative control (unstimulated $T_{\text{эфф}}$); “+” – positive control (activated $T_{\text{эфф}}$). Allo-MNC – allogeneic mononuclear cells



ляет достичь более высоких терапевтических доз, что является несомненным преимуществом такого подхода. Однако проблемой существующих протоколов культивации $T_{\text{рег}}$ является необходимость контроля клеточного состава конечного продукта, в частности уровней контаминации $T_{\text{эфф}}$ -популяциями, а также стабильности экспрессии FoxP3 при длительной культивации. Также нельзя не учитывать, что процесс культивации клеток ведет к усложнению соблюдения асептических условий в связи с увеличением рисков контаминации.

Преимуществом $T_{\text{рег}}$ КП, произведенных без использования культивации, является возможность точного контроля клеточного состава. Хотя такие протоколы и уступают в количественной составляющей КП стратегиям с культивацией, терапевтическая доза для них является достижимой. Согласно клиническим исследованиям ранней фазы, не существует единого мнения о терапевтической дозе $T_{\text{рег}}$, необходимой для лечения или профилактики РТПХ, и она может варьировать от $1E+05$ до $1E+08$ клеток/кг массы реципиента в зависимости от состояния

конкретного пациента и тяжести РТПХ [14, 22–24, 27]. Комбинация предложенного нами алгоритма последовательной иммуномагнитной селекции CD25⁺ и последующего клеточного сортинга позволила получить КП с их дальнейшей имплементацией в существующие клинические протоколы лечения РТПХ.

Все КП одобрены к клиническому применению в соответствии с критериями контроля качества и микробиологической безопасности и в дальнейшем были использованы в качестве терапии РТПХ у 6 пациентов по жизненным показаниям. Согласно оценке клеточного состава все произведенные T_{рег} КП были представлены жизнеспособными T_{рег}-лимфоцитами с фенотипом CD4⁺CD25^{high}FoxP3⁺CD127^{low} (медиана содержания T_{рег} 98%).

Важным аспектом при производстве КП в целях терапии РТПХ является отсутствие примеси алло-специфичных Т-лимфоцитов, способных развить или усугубить ее течение. При оценке полученных нами T_{рег} КП популяция CD4⁺ Т-лимфоцитов была представлена в незначительном количестве (~2%), остальные клеточные популяции практически полностью отсутствовали (~0,1%).

В настоящий момент известно, что после получения активационного сигнала Т-лимфоциты, не являющиеся T_{рег}, также способны экспрессировать фактор FoxP3, однако экспрессия имеет транзиторный характер и меньшую концентрацию внутри клетки [38, 39]. Экспрессия FoxP3 фактора временно позволяет Т-лимфоцитам снизить чувствительность к проапоптотическому механизму, отвечающему за клеточную гибель, индуцированную рестимуляцией Т-клеточного рецептора (restimulation-induced cell death) [40]. В связи с этим использование данных только об экспрессии FoxP3 может быть недостаточным для однозначной характеристики КП. Детальная оценка субпопуляционного состава T_{рег}, а также оценка статуса метилирования участка TSDR являются важными дополнительными характеристиками.

В полученных КП около четверти (26%) популяции T_{рег}-лимфоцитов имели наивный фенотип CD45RA⁺CD197⁺, ассоциированный с тимическими T_{рег}-лимфоцитами. В ряде работ была продемонстрирована связь экспрессии вышеупомянутых маркеров среди T_{рег} и деметилирования локуса TSDR, а также характерных для T_{рег} функциональных особенностей [19, 41]. К сожалению, в нашем исследовании изучение TSDR было выполнено лишь для одного из КП. Результаты наших исследований на этапе доклинической разработки в совокупности с результатом образца из данного исследования также подтверждают наличие корреляции между методом определения деметилированного статуса TSDR и оценкой

экспрессии FoxP3 с помощью проточной цитометрии (данные готовятся к публикации).

Со стороны технической составляющей процесса изготовления КП необходимо отметить, что в сравнении со стандартной процедурой афереза, например, в целях проведения алло-ТГСК, занимающей порядка 5–6 ч и при которой необходимо собрать около 40–60E+09 клеток, для производства T_{рег} КП требуется относительно небольшое стартовое число клеток. Так, медиана содержания тотального количества лейкоцитов в ПА составила 4E+09, длительность лейкофереза – 60–90 мин. Сокращение времени сбора ПА является более комфортным и безопасным для донора, а также может являться существенным преимуществом при работе с сиблингами, имеющими низкую массу тела.

Процедура сортирования из CD25⁺ КП в зависимости от содержания T_{рег} позволяет получить около 3 млн T_{рег} за 1 раунд с медианой чистоты популяции более 91% в конечном продукте. В зависимости от требуемой терапевтической дозы клеток в расчете на 1 кг массы тела реципиента требовалось от 2 до 6 раундов сортирования. Количество полученных Т-лимфоцитов не только соответствовало выбранному нами целевому значению, но и позволило провести криоконсервацию дополнительных доз для повторных введений продукта.

Эффективность клинического применения T_{рег} и их функциональность в отношении разрешения процесса РТПХ продолжает оставаться предметом активных исследований. Так, в работе C.S. Bader и соавт. [42] было показано, что моноиспользование T_{рег}-терапии без какого-либо дополнительного иммуносупрессивного сопровождения у пациентов после ТГСК недостаточно для предотвращения острой РТПХ. Ввиду этого появляются работы, нацеленные на усовершенствование T_{рег} КП с помощью генетической модификации, например снижения чувствительности к иммуносупрессивным препаратам, таким как ингибиторы кальциневрина [43, 44]. Другой подход основан на использовании низких доз интерлейкина-2 у пациентов с хронической формой РТПХ в качестве улучшающего функциональную активность T_{рег} *in vivo* фактора. Этот подход показал эффективность в лечении стероидорезистентных форм РТПХ, однако ввиду малочисленности дополнительных клинических исследований он также остается предметом дискуссии [45].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Согласно полученным результатам, нами был разработан и успешно внедрен протокол клинического производства T_{рег} КП для лечения РТПХ у пациентов, получивших ТГСК. В дальнейшем нами

планируется изучение клинической эффективности примененной терапии, а также оценка возможности использования данного протокола в качестве базового для производства генетически модифицированных КП, позволяющих расширить показания использования данного вида клеточной терапии.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Не указан.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

ORCID

Vedmedskaya V.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7247-4844>
Pershin D.E. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6148-7209>
Fadeeva M.S. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6553-2505>
Sozonova T.A. ORCID: <https://orcid.org/0009-0004-0057-2727>
Malakhova E.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7334-0706>
Kulakovskaya E.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9639-2779>
Lodoeva O.B. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2874-0014>
Musaeva E.Ya. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0581-9472>
Muzalevskii Ya.O. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3513-8299>
Kazachenok A.S. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0497-9175>
Osipova D.S. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9968-9332>
Badrin E.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8678-9705>
Belchikov V.E. ORCID: <https://orcid.org/0009-0001-7491-6906>
Melkova A.K. ORCID: <https://orcid.org/0009-0000-3801-0931>
Shelikhova L.N. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0520-5630>
Balashov D.N. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2689-0569>
Maschan M.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1735-0093>

Литература / References

- MacDonald K.P.A., Hill G.R., Blazar B.R. Chronic graft-versus-host disease: biological insights from preclinical and clinical studies. *Blood* 2017; 129: 13–21. DOI: 10.1182/blood-2016-06-686618
- Martin P.J., Counts G.W., Appelbaum F.R., Lee S.J., Sanders J.E., Deeg H.J., et al. Life Expectancy in Patients Surviving More Than 5 Years After Hematopoietic Cell Transplantation. *J Clin Oncol* 2010; 28: 1011–6. DOI: 10.1200/JCO.2009.25.6693
- Wingard J.R., Majhail N.S., Brazauskas R., Wang Z., Sobocinski K.A., Jacobsohn D., et al. Long-term survival and late deaths after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *J Clin Oncol* 2011; 29: 2230–9. DOI: 10.1200/JCO.2010.33.7212
- Ferrara J.L., Levine J.E., Reddy P., Holler E. Graft-versus-host disease. *Lancet* 2009; 373: 1550–61. DOI: 10.1016/S0140-6736(09)60237-3
- Magenau J., Runaas L., Reddy P. Advances in understanding the pathogenesis of graft-versus-host disease. *Br J Haematol* 2016; 173: 190–205. DOI: 10.1111/bjh.13959
- Ikegawa S., Matsuoka K. Harnessing T_{reg} Homeostasis to Optimize Posttransplant Immunity: Current Concepts and Future Perspectives. *Front Immunol* 2021; 12: 713358. DOI: 10.3389/fimmu.2021.713358
- Guo W., Su X., Wang M., Han M., Feng X., Jiang E. Regulatory T Cells in GVHD Therapy. *Front Immunol* 2021; 12: 697854. DOI: 10.3389/fimmu.2021.697854
- Del Papa B., Ruggeri L., Urbani E., Baldoni S., Cecchini D., Zei T., et al. Clinical-Grade-Expanded Regulatory T Cells Prevent Graft-versus-Host Disease While Allowing a Powerful T Cell-Dependent Graft-versus-Leukemia Effect in Murine Models. *Biol Blood Marrow Transplant* 2017; 23: 1847–51. DOI: 10.1016/j.bbmt.2017.07.009
- Taylor P.A., Noelle R.J., Blazar B.R. Cd4⁺Cd25⁺ Immune Regulatory Cells Are Required for Induction of Tolerance to Alloantigen via Costimulatory Blockade. *J Exp Med* 2001; 193: 1311–8. DOI: 10.1084/jem.193.11.1311
- Hara M., Kingsley C.I., Niimi M., Read S., Turvey S.E., Bushell A.R., et al. IL-10 Is Required for Regulatory T Cells to Mediate Tolerance to Alloantigens In Vivo. *J Immunol* 2001; 166: 3789–96. DOI: 10.4049/jimmunol.166.6.3789
- Lederer K., Maillard I. New mechanisms of GVHD suppression by T_{reg}s. *Blood* 2023; 141: 1655–7. DOI: 10.1182/blood.2022019396
- Wood K.J., Sakaguchi S. Regulatory T cells in transplantation tolerance. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 199–210. DOI: 10.1038/nri1027
- Taylor P.A., Lees C.J., Blazar B.R. The infusion of ex vivo activated and expanded CD4⁺CD25⁺ immune regulatory cells inhibits graft-versus-host disease lethality. *Blood* 2002; 99: 3493–9. DOI: 10.1182/blood.V99.10.3493
- Hippen K.L., Merkel S.C., Schirm D.K., Nelson C., Tennis N.C., Riley J.L., et al. Generation and Large-Scale Expansion of Human Inducible Regulatory T Cells That Suppress Graft-Versus-Host Disease. *Am J Transplant* 2011; 11: 1148–57. DOI: 10.1111/j.1600-6143.2011.03558.x
- Sakaguchi S., Sakaguchi N., Asano M., Itoh M., Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 1995; 155: 1151–64.
- Shevryev D., Tereshchenko V. T_{reg} Heterogeneity, Function, and Homeostasis. *Front Immunol* 2020; 10: 3100. DOI: 10.3389/fimmu.2019.03100
- Polansky J.K., Kretschmer K., Freyer J., Floess S., Garbe A., Baron U., et al. DNA methylation controls Foxp3 gene expression. *Eur J Immunol* 2008; 38: 1654–63. DOI: 10.1002/eji.200838105
- Lal G., Zhang N., van der Touw W., Ding Y., Ju W., Bottinger E.P., et al. Epigenetic regulation of Foxp3 expression in regulatory T cells by DNA methylation. *J Immunol* 2009; 182 (1): 259–73. DOI: 10.4049/jimmunol.182.1.259
- Miyara M., Yoshioka Y., Kitoh A., Shima T., Wing K., Niwa A., et al. Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4⁺ T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity* 2009; 30: 899–911. DOI: 10.1016/j.immuni.2009.03.019
- Gratz I.K., Rosenblum M.D., Maurano M.M., Paw J.S., Truong H.-A., Marshak-Rothstein A., et al. Cutting Edge: Self-Antigen Controls the Balance between Effector and Regulatory T Cells in Peripheral Tissues. *J Immunol* 2014; 192: 1351–5. DOI: 10.4049/jimmunol.1301777
- Rosenblum M.D., Way S.S., Abbas A.K. Regulatory T cell mem-

- ory. Nat Rev Immunol 2016; 16: 90–101. DOI: 10.1038/nri.2015.1
22. Trzonkowski P., Bieniaszewska M., Juścińska J., Dobyszek A., Krzystyniak A., Marek N., et al. First-in-man clinical results of the treatment of patients with graft versus host disease with human *ex vivo* expanded CD4⁺CD25⁺CD127⁻ T regulatory cells. Clin Immunol 2009; 133: 22–6. DOI: 10.1016/j.clim.2009.06.001
 23. Landwehr-Kenzel S., Müller-Jensen L., Kuehl J.-S., Abou-el-Enein M., Hoffmann H., Muench S., et al. Adoptive transfer of *ex vivo* expanded regulatory T cells improves immune cell engraftment and therapy-refractory chronic GVHD. Mol Ther 2022; 30: 2298–314. DOI: 10.1016/j.ymthe.2022.02.025
 24. Amini L., Kaeda J., Fritsche E., Roemhild A., Kaiser D., Reinke P. Clinical adoptive regulatory T Cell therapy: State of the art, challenges, and prospective. Front Cell Dev Biol 2023; 10: 1081644. DOI: 10.3389/fcell.2022.1081644
 25. MacMillan M.L., Hippen K.L., McKenna D.H., Kadidlo D., Sumstad D., DeFor T.E. First-in-human phase 1 trial of induced regulatory T cells for graft-versus-host disease prophylaxis in HLA-matched siblings. Blood Adv 2021; 5 (5): 1425–36. DOI: 10.1182/bloodadvances.2020003219
 26. Beres A.J., Drobycki W.R. The Role of Regulatory T Cells in the Biology of Graft Versus Host Disease. Front Immunol 2013; 4: 163. DOI: 10.3389/fimmu.2013.00163
 27. MacDonald K.N., Piret J.M., Levings M.K. Methods to manufacture regulatory T cells for cell therapy. Clin Exp Immunol 2019; 197: 52–63. DOI: 10.1111/cei.13297
 28. Irvine D.J., Maus M.V., Mooney D.J., Wong W.W. The Future of Engineered Immune Cell Therapies. Science 2022; 378: 853–8. DOI: 10.1126/science.abq6990
 29. Jarvis L.B., Rainbow D.B., Coppard V., Howlett S.K., Georgieva Z., Davies J.L., et al. Therapeutically expanded human regulatory T-cells are super-suppressive due to HIF1A induced expression of CD73. Commun Biol 2021; 4: 1186. DOI: 10.1038/s42003-021-02721-x
 30. Puckrin R., Chi Fung Kwan A., Blosser N., Leyshon C., Duggan P., Daly A. Corticosteroids as graft-versus-host disease prophylaxis for allogeneic hematopoietic cell transplant recipients with calcineurin inhibitor intolerance. Cytotherapy 2023; 25 (10): 1101–6. DOI: 10.1016/j.jcyt.2023.05.010
 31. Goptu M., Antin J.H. GVHD Prophylaxis 2020. Front Immunol 2021; 12: 605726. DOI: 10.3389/fimmu.2021.605726
 32. Peters J.H., Preijers F.W., Woestenink R., Hilbrands L.B., Koenen H.J.P.M., Joosten I. Clinical Grade T_{reg}: GMP Isolation, Improvement of Purity by CD127pos Depletion, T_{reg} Expansion, and T_{reg} Cryopreservation. PLoS One 2008; 3 (9): e3161. DOI: 10.1371/journal.pone.0003161
 33. Seay H.R., Putnam A.L., Cserny J., Posgai A.L., Rosenau E.H., Wingard J.R., et al. Expansion of Human T_{regs} from Cryopreserved Umbilical Cord Blood for GMP-Compliant Autologous Adoptive Cell Transfer Therapy. Mol Ther Methods Clin Dev 2017; 4: 178–91. DOI: 10.1016/j.omtm.2016.12.003
 34. Doglio M., Crossland R.E., Alho A.C., Penack O., Dickinson A.M., Stary G., et al. Cell-based therapy in prophylaxis and treatment of chronic graft-versus-host disease. Front Immunol 2022; 13: 1045168. DOI: 10.3389/fimmu.2022.1045168
 35. Chandran S., Tang Q., Sarwal M., Laszik Z.G., Putnam A.L., Lee K., et al. Polyclonal Regulatory T Cell Therapy for Control of Inflammation in Kidney Transplants. Am J Transplant 2017; 17: 2945–54. DOI: 10.1111/ajt.14415
 36. Di Ianni M., Falzetti F., Carotti A., Terenzi A., Castellino F., Bonifacio E. T_{regs} prevent GVHD and promote immune reconstitution in HLA-haploidentical transplantation. Blood 2011; 117 (14): 3921–8. DOI: 10.1182/blood-2010-10-311894
 37. Edinger M., Hoffmann P. Regulatory T cells in stem cell transplantation: strategies and first clinical experiences. Curr Opin Immunol 2011; 23: 679–84. DOI: 10.1016/j.coi.2011.06.006
 38. Gavin M.A., Torgerson T.R., Houston E., DeRoos P., Ho W.Y., Stray-Pedersen A., et al. Single-cell analysis of normal and FOXP3-mutant human T cells: FOXP3 expression without regulatory T cell development. Proc Natl Acad Sci U S A 2006; 103 (17): 6659–64. DOI: 10.1073/pnas.0509484103
 39. Roncador G., Brown P.J., Maestre L., Hue S., Martínez-Torrecuadrada J.L., Ling K.-L., et al. Analysis of FOXP3 protein expression in human CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells at the single-cell level. Eur J Immunol 2005; 35 (6): 1681–91. DOI: 10.1002/eji.200526189
 40. Voss K., Lake C., Luthers C.R., Lott N.M., Dorjbal B., Arjunaraja S., et al. FOXP3 protects conventional human T cells from premature restimulation-induced cell death. Cell Mol Immunol 2021; 18 (1): 194–205. DOI: 10.1038/s41423-019-0316-z
 41. Hoffmann P., Eder R., Boeld T.J., Doser K., Piseshka B., Andreesen R., Edinger M. Only the CD45RA⁺ subpopulation of CD4⁺CD25^{high} T cells gives rise to homogeneous regulatory T-cell lines upon *in vitro* expansion. Blood 2006; 108 (13): 4260–7. DOI: 10.1182/blood-2006-06-027409
 42. Bader C.S., Pavlova A., Lowsky R., Muffy L.S., Shiraz P., Arai S., et al. Single-center randomized trial of T-reg graft alone vs T-reg graft plus tacrolimus for the prevention of acute GVHD. Blood Adv 2024; 8: 1105–15. DOI: 10.1182/bloodadvances.2023011625
 43. Amini L., Wagner D.L., Rössler U., Zarrinrad G., Wagner L.F., Vollmer T., et al. CRISPR-Cas9-Edited Tacrolimus-Resistant Antiviral T Cells for Advanced Adoptive Immunotherapy in Transplant Recipients. Mol Ther 2021; 29: 32–46. DOI: 10.1016/j.ymthe.2020.09.011
 44. Peter L., Wendering D.J., Schlickeiser S., Hoffmann H., Noster R., Wagner D.L., et al. Tacrolimus-resistant SARS-CoV-2-specific T cell products to prevent and treat severe COVID-19 in immunosuppressed patients. Mol Ther Methods Clin Dev 2022; 25: 52–73. DOI: 10.1016/j.omtm.2022.02.012
 45. Koreth J., Matsuoka K.-ichi, Kim H.T., McDonough S.M., Bindra B., Alyea E.P. 3rd, et al. Interleukin-2 and Regulatory T Cells in Graft-versus-Host Disease. N Engl J Med 2011; 365 (22): 2055–66. DOI: 10.1056/NEJMoa1108188

© 2024 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ
им. Дмитрия Рогачева»
Минздрава России
Поступила 08.04.2024
Принята к печати 27.04.2024



EDN: XXETQQ

Контактная информация:

Паина Олеся Владимировна,
канд. мед. наук, врач-гематолог,
заведующая отделением трансплантации
костного мозга для детей №1 НИИ ДГОИ
им. Р.М. Горбачевой ФГБОУ ВО ПСПбГМУ
им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России
Адрес: 197022, Санкт-Петербург,
ул. Льва Толстого, 6–8
E-mail: paina@mail.ru

DOI: 10.24287/1726-1708-2024-23-2-60-70

Инотузумаб озогамицин в качестве “bridge”-терапии у детей с резистентным и рецидивирующим течением острого В-лимфобластного лейкоза перед аллогенной трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток

О.В. Паина, Л.А. Цветкова, Ж.З. Рахманова, П.В. Кожокар, А.А. Осипова, А.В. Евдокимов,
О.С. Епифановская, Т.Л. Гиндина, И.М. Бархатов, Е.В. Семенова, А.Д. Кулагин,
Л.С. Зубаровская

Научно-исследовательский институт детской онкологии, гематологии и трансплантологии
им. Р.М. Горбачевой ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский
университет им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России, Санкт-Петербург

У детей, больных острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ), рецидивы по-прежнему являются основной причиной неудачи лечения и возникают в 10–15% случаев. Общая выживаемость после рецидива достигает плато на уровне 50–60%, тогда как бессобытийная выживаемость после второго и третьего рецидивов составляет примерно 25% и 15% соответственно. Внедрение в терапию новых иммунотерапевтических агентов, таких как биспецифический активатор Т-клеток блинатумаб, моноклональное антитело анти-CD22⁺ инотузумаб озогамицин (ИНО) и химерный антигенный Т-клеточный рецептор к CD19⁺, позволяет существенно повысить эффективность противорецидивного лечения, достичь ремиссии в более короткие сроки и тем самым приблизить этап аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК). Однако на сегодняшний день остается вопрос о токсичности проводимой терапии и влиянии на исход алло-ТГСК. В наше исследование включены 55 пациентов с резистентным течением В-клеточного ОЛЛ в возрасте от 3 до 17 лет (медиана 10 лет). Данное исследование одобрено независимым этическим комитетом и утверждено решением ученого совета ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. И.П. Павлова Минздрава России. Все пациенты в зависимости от терапии были разделены на 2 группы: в группу «ИНО+» вошли 24 (43,6%) пациента, получавших ИНО, в группу «ИНО–» – 31 (56,4%) пациент, не получавший данный препарат. В большинстве случаев была выполнена алло-ТГСК от гаплоидентичного донора – 53 (96,4%), совместимая родственная алло-ТГСК проведена 1 (1,8%) больному, совместимая неродственная алло-ТГСК – также 1 (1,8%) пациенту. Режимы кондиционирования перед алло-ТГСК были следующими: миелоаблативное кондиционирование – 20 (36,4%) больных, миелоаблативное кондиционирование со сниженной токсичностью – 5 (9,1%), режим кондиционирования со сниженной интенсивностью – 30 (54,5%). Профилактику острой реакции «трансплантат против хозяина» на основе посттрансплантационного циклофосфида провели 49 (87,7%) реципиентам, серопротекцию получили 6 (12,3%) больных. Базовая комбинированная иммуносупрессивная терапия в составе ингибитора кальциневрина и ингибитора m-TOR применялась в 35 (63,6%) случаях, ингибитор m-TOR в монорежиме – у 20 (36,4%) пациентов. В группе «ИНО+» перед алло-ТГСК клинико-гематологической ремиссии (КГР) с неполным восстановлением достиг 21 (87,5%) пациент: позитивный статус минимальной остаточной болезни (МОБ) отмечен в 5 (23,8%) случаях, отрицательный статус МОБ – у 16 (76,2%) реципиентов. В группе «ИНО–» ремиссия с неполным восстановлением перед алло-ТГСК зафиксирована у 15 (48,4%) пациентов: позитивный статус МОБ диагностирован в 3 (9,7%) случаях, негативный – у 12 (38,7%) больных ($p = 0,003$). В дальнейшем все пациенты вне зависимости от ответа на терапию получили алло-ТГСК. Приживления трансплантата после алло-ТГСК в группе «ИНО+» достигли 20 (83,3%) детей, медиана Д+22, в группе «ИНО–» – 25 (80,6%) реципиентов, медиана Д+19. Рецидив после алло-ТГСК в группе «ИНО+» зафиксирован у 11 (55%) пациентов, медиана Д+164, в группе «ИНО–» – у 15 (60%) больных, медиана Д+203 ($p = n. s.$). При более детальном анализе в подгруппе «ИНО+» с КГР с неполным восстановлением и отрицательным статусом МОБ 5 (31,25%) из 16 пациентов развили рецидив В-клеточного ОЛЛ после алло-ТГСК, медиана наступления Д+105 (Д+58 – Д+169). В группе «ИНО–» КГР с неполным восстановлением и отрицательным статусом МОБ у 6 (50%) из 12 больных подтвержден рецидив после алло-ТГСК с медианой Д+296 (Д+108 – Д+929). Ввиду малочисленности групп с помощью корреляционно-регрессионного анализа установлена слабая связь между фактором использования ИНО перед алло-ТГСК и наступлением рецидива заболевания после трансплантации (коэффициент сопряженности Пирсона 0,178). Потеря HLA-гаплотипа при рецидиве обнаружена у 1 (4,2%) пациента из группы «ИНО+» и у 2 (6,5%) – из группы «ИНО–» ($p = n. s.$). Тромботическая микроангиопатия, ассоциированная с алло-ТГСК, в группе «ИНО+» диагностирована у 6 (25%) реципиентов, в группе «ИНО–» – у 3 (9,7%). Развитие клинической картины синдрома синусоидальной обструкции в группе «ИНО+» зафиксировано в 8 (32%) случаях, в группе «ИНО–» – в 3 (9,7%). По-нашему мнению, ИНО эффективен для лечения рецидива В-клеточного ОЛЛ у детей перед алло-ТГСК, наиболее оправдан у детей с большой

опухолевой массой, высокой экспрессией CD22⁺ и предлеченностью. Подготовка с использованием режима кондиционирования со сниженной интенсивностью после терапии моноклональным антителом анти-CD22⁺ существенно повышает общую выживаемость благодаря снижению ранней трансплантационной летальности и дает возможности для дальнейшей иммуноадоптивной терапии. Современные стратегии алло-ТГСК и подходы к профилактике острой реакции «трансплантат против хозяина» позволяют контролировать развитие тяжелых осложнений в ранний период. Как показало наше исследование, при развитии рецидива после алло-ТГСК с потерей HLA-гаплотипа у пациентов, получавших ИНО, возможно проведение иммуноадоптивной терапии с введением донорских лимфоцитов.

Ключевые слова: острый лимфобластный лейкоз, рецидив, резистентность, инотузумаб озогамидин, трансплантация гемопоэтических стволовых клеток, режимы кондиционирования

Паина О.В. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2024; 23 (2): 60–70.
DOI: 10.24287/1726-1708-2024-23-2-60-70

Inotuzumab ozogamicin as a bridging therapy to allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in children with refractory/relapsed B-cell acute lymphoblastic leukemia

O.V. Paina, L.A. Tsvetkova, Zh.Z. Rakhmanova, P.V. Kozhokar, A.A. Osipova, A.V. Evdokimov, O.S. Epifanovskaya, T.L. Gindina, I.M. Barkhatov, E.V. Semenova, A.D. Kulagin, L.S. Zubarovskaya

R.M. Gorbacheva Research Institute for Pediatric Oncology, Hematology and Transplantation, I.P. Pavlov First Saint Petersburg State Medical University of Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Saint-Petersburg

In children with acute lymphoblastic leukemia (ALL), relapse is still the leading cause of treatment failure occurring in 10–15% of cases. Overall survival after relapse plateaus at 50–60%, whereas event-free survival after second and third relapse is approximately 25% and 15%, respectively. The introduction of new immunotherapeutic agents such as blinatumomab (a bispecific T-cell engager), inotuzumab ozogamicin (InO; a CD22⁺ monoclonal antibody) and a chimeric antigen T-cell receptor targeted to CD19⁺ can significantly increase the effectiveness of treatment for relapsed ALL and help patients achieve remission faster and thus shorten the time to allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT). However, the toxicity of these novel agents and their impact on the results of allo-HSCT are still to be investigated. Our study included 55 patients with refractory B-cell ALL aged from 3 to 17 years (the median age was 10 years). The study was approved by the Independent Ethics Committee and the Scientific Council of the I.P. Pavlov First Saint Petersburg State Medical University. The patients were divided into two groups based on whether they received inotuzumab ozogamicin or not: InO⁺ group ($n = 24$; 43.6%) and InO[−] group ($n = 31$; 56.4%). The majority of the patients underwent haploidentical HSCT ($n = 53$; 96.4%); 1 (1.8%) patient received HSCT from a matched related donor, and 1 (1.8%) from a matched unrelated donor. Conditioning regimens before allo-HSCT included: myeloablative conditioning ($n = 20$; 36.4%), reduced toxicity myeloablative conditioning ($n = 5$; 9.1%), and reduced intensity conditioning ($n = 30$; 54.5%). Acute graft-versus-host disease prophylaxis with post-transplant cyclophosphamide was given to 49 (87.7%) recipients; 6 (12.3%) patients received seroprophylaxis. Basic combined immunosuppressive therapy consisting of a calcineurin inhibitor and an mTOR inhibitor was used in 35 (63.6%) cases, and single m-TOR inhibitor treatment was administered to 20 (36.4%) patients. In the InO⁺ group, 21 (87.5%) patients achieved complete remission with incomplete hematologic recovery before allo-HSCT: 5 (23.8%) patients had minimal residual disease (MRD), and 16 (76.2%) patients were MRD negative. In the InO[−] group, remission with incomplete hematologic recovery before allo-HSCT was achieved in 15 (48.4%) patients: 3 (9.7%) cases were MRD positive and 12 (38.7%) were MRD negative ($p = 0.003$). All the patients underwent allo-HSCT, regardless of response to prior therapy. Engraftment was achieved in the InO⁺ group in 20 (83.3%) children in a median of 22 days (D+22) and in the InO[−] group in 25 (80.6%) children in a median of 19 days (D+19). Relapse was observed in 11 (55%) patients in the InO⁺ group and in 15 (60%) patients in the InO[−] group at a median of 164 days and 203 days post-transplant, respectively ($p = n. s.$). In the InO⁺ group, 5 (31.25%) out of 16 patients in complete remission with incomplete hematologic recovery and negative MRD status relapsed after allo-HSCT within a median of 105 days (D+58 – D+169). In the InO[−], 6 (50%) out of 12 patients in complete remission with incomplete hematologic recovery and negative MRD status relapsed within a median of 296 days (D+108 – D+929). Due to the small number of patients in the groups, a correlation and regression analysis showed a weak correlation between the use of InO before allo-HSCT and the occurrence of post-transplant relapse (Pearson's contingency coefficient was 0.178). Loss of the HLA haplotype at relapse was found in 1 (4.2%) patient from the InO⁺ group and in 2 (6.5%) patients from the InO[−] group ($p = n. s.$). Transplant-associated thrombotic microangiopathy was diagnosed in 6 (25%) recipients in the InO⁺ group and in 3 (9.7%) recipients in the InO[−] group. Eight (32%) patients in the InO⁺ group and 3 (9.7%) patients in the InO[−] group had clinical manifestations of sinusoidal obstruction syndrome. Our study suggests the effectiveness of inotuzumab ozogamicin for the treatment of relapsed B-ALL in children before allo-HSCT. Patients with large tumor burden and high expression of CD22⁺ would benefit the most from therapy with InO. The application of reduced intensity conditioning regimen after CD22⁺ directed monoclonal antibody therapy significantly improves the overall survival rates by reducing early transplant-related mortality and makes it possible to use adoptive immunotherapy as a next line of treatment. Current allo-HSCT protocols and approaches to acute graft-versus-host disease prevention help control the development of severe complications in the early post-transplant period. Our study showed that adoptive immunotherapy via donor lymphocyte infusions can be applied in patients treated with InO who experience loss of the HLA haplotype at relapse after allo-HSCT.

Key words: acute lymphoblastic leukemia, relapse, refractory disease, inotuzumab ozogamicin, hematopoietic stem cell transplantation, conditioning regimens

Paina O.V., et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology 2024; 23 (2): 60–70.
DOI: 10.24287/1726-1708-2024-23-2-60-70

Острый В-лимфобластный лейкоз (В-ОЛЛ) является наиболее распространенной опухолью кроветворной ткани у детей до 18 лет. На сегодняшний день достигнуты впечатляющие результаты лечения этой категории больных при применении стандартной химиотерапии. Однако примерно 10–20% детей рецидивируют, и заболевание приобретает резистентный характер [1, 2].

Проведение аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК) является потенциально излечивающей возможностью у этой категории больных. Однако выполнение алло-ТГСК вне ремиссии заболевания существенно повышает риск неудачи лечения. Решающее значение в преодолении резистентности имеют методы лечения, сочетающиеся с алло-ТГСК, способствующие достижению

© 2024 by «D. Rogachev NMRCPOI»

Received 08.04.2024

Accepted 27.04.2024

Correspondence:

Olesya V. Paina,
Cand. Med. Sci., a hematologist, Head
of Department of Bone Marrow
Transplantation for Children No. 1
at the R.M. Gorbacheva Research Institute
for Pediatric Oncology, Hematology and
Transplantation, the I.P. Pavlov First Saint
Petersburg State Medical University, Ministry
of Healthcare of the Russian Federation
Address: 6–8 Lva Tolstogo St., 197022,
Saint Petersburg, Russia
E-mail: paina@mail.ru

ответа до трансплантации, уменьшению токсичности и, соответственно, повышающие ее эффективность.

CD22 является антигеном на клеточной поверхности большинства нормальных В-клеток (60–90%) [3] и экспрессируется на бластной популяции более чем в 90% случаев у детей с В-ОЛЛ [4, 5]. Инотузумаб озогамидин (ИНО) представляет собой CD22-направленный конъюгат антитело–лекарственное средство. В качестве антитела используется гуманизированное антитело IgG4, которое специфически связывается с CD22 человека. Небольшая молекула N-ацетил-гамма-калихеамицин является цитотоксическим полусинтетическим натуральным веществом. N-ацетил-гамма-калихеамицин ковалентно связывается с антителом с помощью линкера. Противоопухолевая активность ИНО обусловлена связыванием конъюгата моноклонального антитела и химического препарата с опухолевыми клетками, экспрессирующими CD22, с последующей интернализацией комплекса конъюгата моноклонального антитела и химического препарата CD22 и высвобождением внутри клетки N-ацетил-гамма-калихеамицина диметилтиазида в результате гидролитического расщепления линкера. Активация N-ацетил-гамма-калихеамицина диметилтиазида индуцирует разрыв двухцепочечной ДНК, что в последующем приводит к остановке клеточного цикла и апоптотической гибели опухолевой клетки [6]. По результатам проведенного исследования на взрослой популяции больных с рецидивирующим и резистентным течением В-ОЛЛ ИНО-VATE применение ИНО в монорежиме имело преимущества по частоте достижения ремиссии заболевания с отрицательной минимальной остаточной болезнью (МОБ), длительности ремиссии и частоте выхода на этап алло-ТГСК по сравнению со стандартной противорецидивной полихимиотерапией [7]. По результатам 2 проведенных ретроспективных исследований по применению ИНО у детей с В-ОЛЛ частота достижения ремиссии составила 67% [8, 9]. В опубликованном исследовании I фазы E. Brivio и соавт. (2020) показана общая частота ответа 80% (95% доверительный интервал (ДИ) 59–93), а среди ответивших 84% (95% ДИ 60–97) достигли отрицательного статуса МОБ [10]. Результаты II фазы исследования Children's Oncology Group в 2022 г. продемонстрировали частоту ремиссии на уровне 58,3% (90% ДИ 46,5–69,3) у 48 пациентов, включенных в анализ с суммарной дозой ИНО 1,8 мг/м² (первое введение – 0,8 мг/м², второе и третье введения – по 0,5 мг/м² с частотой 1 раз в 7 дней) [11].

Несомненным преимуществом препарата является высокая эффективность при экстрамедуллярном поражении В-ОЛЛ. Эффективность ИНО и его влияние на исход алло-ТГСК от гаплоидентичного донора (гапло-ТГСК) у детей с В-ОЛЛ мало изучены.

Опасения при использовании препарата у детей с резистентным и рецидивирующим В-ОЛЛ перед гапло-ТГСК обусловлены развитием возможных тяжелых осложнений: синдрома синусоидальной обструкции (ССО) и длительным вторичным иммунодефицитом, особенно у тяжело предлеченных больных с использованием множественных курсов алкиляторов [12–14].

Цель исследования – оценить частоту достижения ремиссии В-ОЛЛ при применении ИНО в монорежиме у детей с резистентным и рецидивирующим течением перед гапло-ТГСК, влияние проведенной терапии на развитие осложнений в раннем посттрансплантационном периоде и возможность выполнения эффективной последующей иммуноадаптивной терапии при развитии рецидива после алло-ТГСК с использованием инфузии донорских лимфоцитов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследование включены 55 пациентов в возрасте от 3 до 17 лет (медиана 10 лет) с резистентным/рецидивирующим течением В-ОЛЛ. Данное исследование одобрено независимым этическим комитетом и утверждено решением ученого совета ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. И.П. Павлова Минздрава России. Все пациенты в зависимости от терапии были разделены на 2 группы: в группу «ИНО+» вошли 24 (43,6%) пациента, получавших до гапло-ТГСК моноклональное антитело анти-CD22⁺ ИНО, в группу «ИНО–» (группа сравнения) – 31 (56,4%) пациент, не получавший данный препарат. Для оценки уровня экспрессии CD22⁺ в костном мозге использовали проточную цитометрию. У пациентов, получивших ИНО, в анамнезе не отмечали развития эндотелиальной дисфункции, тромботической микроангиопатии (ТМА) и ССО во время проведения стандартной блоковой полихимиотерапии.

В группе «ИНО+» экспрессия аберрантного иммунофенотипа CD22⁺ на бластной популяции составила от 50 до 100% (медиана 74%). Пациенты получили 1 цикл терапии, состоящий из 3 введений. Препарат применяли в стандартной дозе и режиме введения: 0,8 мг/м² в 1-й день терапии, по 0,5 мг/м² в 8-й и 15-й дни. Особенностью проведения терапии ИНО в монорежиме является возможность применения препарата в условиях дневного стационара. Пациенты группы «ИНО–» перед гапло-ТГСК получили стандартные блоки противорецидивной полихимиотерапии с включением высокодозного метотрексата или резервную флударабин-содержащую схему в стационаре круглосуточного пребывания. Все пациенты до начала терапии получили интратекальное введение 3 цитостатиков. Оценку эффективности проведенной терапии в группе «ИНО+» выполняли через 14 дней от

последнего введения препарата, в группе «Ино–» – после восстановления показателей кроветворения и всем больным – после алло-ТГСК в декретированные сроки – Д+30. Методология включала аспирацию костного мозга с цитологической оценкой миелограммы, выполнение кариотипирования клеток костного мозга, молекулярно-биологическое исследование на предмет поломок, оценку донорского химеризма. Отрицательный статус МОБ оценивали как < 0,01% бластов в костном мозге и анализировали в лаборатории с использованием многоцветной (8-цветной) многопараметрической проточной цитометрии.

После терапии Ино или полихимиотерапии гапло-ТГСК получили 53 (96,4%) реципиента, стимулированный неманипулированный костный мозг в качестве источника трансплантата использовали у 46 (86,8%) больных, стимулированные неманипулированные периферические клетки крови трансплантированы 7 (13,2%) реципиентам. Родственная алло-ТГСК от полностью совместимого сиблинга выполнена 1 (1,8%) пациенту, алло-ТГСК от неродственного полностью совместимого донора получил 1 (1,8%) больной.

При проведении гапло-ТГСК характеристики трансплантата были следующими: медиана клеточности костного мозга по CD34⁺ составила $4,8 \times 10^6/\text{кг}$, по CD3⁺ – $7,1 \times 10^7/\text{кг}$; медиана клеточности периферических стволовых клеток крови по CD34⁺ – $6,4 \times 10^6/\text{кг}$, по CD3⁺ – $7,57 \times 10^7/\text{кг}$. Клеточность трансплантата при совместимой родственной трансплантации костного мозга по CD34⁺ составила $1,6 \times 10^6/\text{кг}$, по CD3⁺ – $2,3 \times 10^7/\text{кг}$ и неродственной трансплантации по CD34⁺ – $0,6 \times 10^6/\text{кг}$, по CD3⁺ – $1,25 \times 10^7/\text{кг}$.

Миелоаблативный режим кондиционирования (МАК) на основе перорального или внутривенного бусульфана в суммарной дозе 12 мг/кг получили 20 (36,4%) больных, МАК со сниженной токсичностью на основе треосульфана применяли у 5 (9,1%) реципиентов, режим со сниженной интенсивностью доз (РИК) на основе мелфалана в суммарной дозе 140 мг/м² использовали у 30 (54,5%) пациентов. Профилактику острой реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ) с посттрансплантационным циклофосфамидом в дозе 50 мг/кг в Д+3, Д+4 получили 49 (87,7%) реципиентов, серо-профилактику применяли у 6 (12,3%) больных. Базовую комбинированную иммуносупрессивную терапию ингибитором кальциневрина и ингибитором m-TOR получили 35 (63,6%) реципиентов, базовая иммуносупрессивная терапия только ингибитором m-TOR применялась в 20 (36,4%) случаях. Общая характеристика пациентов представлена в *таблице 1*.

Статистический анализ выполнен с использованием программы SPSS Statistics v.20. Общая (ОВ) и безрецидивная выживаемость, а также ранняя трансплантационная летальность (ТЛ) были рассчитаны с использованием метода Каплана–Майера. Сравнение выживаемости выполняли при помощи теста log-rank, сравнительный анализ разности долей – с использованием точного теста Фишера. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$. Частота первичного неприживания, токсичности и острой РПТХ III–IV степени была установлена с помощью критериев Манна–Уитни и Крускала–Уоллиса. Пациенты, живущие в ремиссии на момент анализа данных, цензурированы 01.01.2024.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценка эффективности терапии до аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток

В группе «Ино+» КГР достигнута в 21 (87,5%) случае: с отрицательным статусом МОБ у 16 (76,2%) пациентов, с персистенцией МОБ у 5 (23,8%) больных. Не достигнут ответ в 3 (12,5%) случаях. В группе сравнения КГР подтвердили у 15 (48,4%) детей: отрицательного статуса МОБ перед алло-ТГСК достигли 12 (38,7%) реципиентов, с персистенцией МОБ – 3 (9,7%) пациента, не достигли ремиссии 16 (51,6%) больных ($p = 0,003$). Вне зависимости от ответа на проведенную терапию все пациенты получили алло-ТГСК. Медиана проведения алло-ТГСК в группе «Ино+» составила 30 дней, в группе «Ино–» – 35 дней.

Токсичность в группе «Ино+» была следующей: гематологическая с уровнем нейтрофилов менее 500 клеток отмечалась у всех больных, тромбоцитопения менее $20 \times 10^9/\text{л}$ также зафиксирована у всех пациентов; ССО не развился в исследуемой группе. Фебрильная нейтропения диагностирована у 3 (12,5%) больных, которая не привела к развитию инфекционного эпизода.

В группе сравнения («Ино–») токсические осложнения носили следующий характер: гематологическая токсичность (аплазия кроветворения) – 31 (100%) пациент, полинейропатия – 2 (6,5%), мукозит желудочно-кишечного тракта II степени – 31 (100%), фебрильная нейтропения – 13 (41,9%), с последующим развитием инфекции кровотока у 2 (6,5%) детей. Сравнительная частота осложнений показана в *таблице 2*.

Оценка влияния выбранных тактик лечения рецидива на исход аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток в обеих группах

Приживление трансплантата в группе «Ино+» зафиксировано у 20 (83,3%) реципиентов, в группе

Таблица 1
Общая характеристика пациентов
Tables 1
The patient characteristics

Параметр Parameter	Значение Value
Возраст, годы Age, years	3–17 (медиана 10) 3–17 (the median age is 10)
Общее число пациентов, n (%) Total number of patients, n (%)	55 (100)
Статус на момент алло-ТГСК в группе «Ино+» (n = 24; 43,6%), n (%) Status at the time of allo-HSCT in the InO+ group (n = 24; 43.6%), n (%)	
КГР с неполным восстановлением: CR with incomplete hematologic recovery:	21 (87,5)
МОБ+ MRD+	5 (23,8)
МОБ– MRD–	16 (76,2)
Резистентный рецидив Refractory relapse	3 (12,5)
Статус на момент алло-ТГСК в группе «Ино–» (n = 31; 56,4%), n (%) Status at the time of allo-HSCT in the InO– group (n = 31; 56.4%), n (%)	
КГР с неполным восстановлением: CR with incomplete hematologic recovery:	15 (48,4)
МОБ+ MRD+	3 (9,7)
МОБ– MRD–	12 (38,7)
Резистентный рецидив Refractory relapse	16 (51,6)
Тип донора, n (%) Donor type, n (%)	
Гаплоидентичный Haploidentical donor	53 (96,4)
Родственный Matched related donor	1 (1,8)
Неродственный Matched unrelated donor	1 (1,8)
Режим кондиционирования, n (%) Conditioning regimen, n (%)	
МАК на основе бусульфана (12 мг/кг, пероральная/внутривенная формы) MAC based on Busulfan (12 mg/kg per os or intravenous)	20 (36,4)
РИК на основе мелфалана (140 мг/м²) RIC based on Melphalan (140 mg/m²)	30 (54,5)
МАК со сниженной токсичностью на основе треосульфана Reduced toxicity MAC based on Treosulfan	5 (9,1)
Профилактика острой РТПХ, n (%) Prophylaxis of acute GVHD, n (%)	
Посттрансплантационный циклофосфамид Post-transplant cyclophosphamide	49 (87,7)
Серопротекция Seroprophylaxis	6 (12,3)
Базовая комбинированная иммуносупрессивная терапия: ингибитор кальциневрина + m-TOR-ингибитор Basic combined immunosuppressive therapy: calcineurin inhibitor + mTOR inhibitor	35 (63,6)
Базовая иммуносупрессивная терапия: моно-m-TOR-ингибитор Basic immunosuppressive therapy: single mTOR inhibitor	20 (36,4)

Note. B-ALL – B-cell acute lymphoblastic leukemia; InO – inotuzumab ozogamicin; allo-HSCT – allogeneic hematopoietic stem cell transplantation; CR – complete remission; MRD – minimal residual disease; MAC – myeloablative conditioning; RIC, reduced intensity conditioning; GVHD – graft-versus-host disease.

«Ино–» – у 25 (80,6%). Медиана приживления была следующей: в группе «Ино+» – Д+22, в группе «Ино–» – Д+19. Восстановление лимфоцитов > 0,3 × 10⁹/л к Д+30 констатировано у 14 (58,3%) и 15 (48,4%) пациентов соответственно. Восстановление тромбоцитов > 50 × 10⁹/л без потребности в заместительных гемотрансфузиях в группе «Ино+» зафиксировано у 22 (92%) реципиентов, медиана Д+33, в группе «Ино–» – у 20 (80%) больных, медиана Д+26 (p = 0,04).

Острая РТПХ III–IV степени в группе «Ино+» диагностирована в 3 (30%) случаях, в группе «Ино–» – в 5 (45,4%). В группе «Ино+» ТМА, ассоциированная с алло-ТГСК, отмечена у 6 (25%) реципиентов,

развитие ССО – в 8 (32%) случаях, с летальным исходом у 4 (50%) пациентов. Три пациента из этой группы получили МАК, 1 больной – РИК. Пациенты в группе «Ино–» имели следующие результаты: ТМА, ассоциированная с алло-ТГСК, диагностирована у 3 (9,7%) больных, ССО – у 3 (9,7%) реципиентов, приведший к летальному исходу в 1 (33%) случае.

Основная проблема группы резистентных больных – развитие рецидива заболевания после алло-ТГСК в ранний период. По результатам нашего анализа частота и сроки были следующими: в группе «Ино+» возврат болезни диагностирован у 11 (55%) больных, медиана развития Д+164, в группе «Ино–»

Таблица 2
Сравнительная частота осложнений после противорецидивной терапии перед алло-ТГСК

Tables 2
A comparative analysis of complications after treatment for relapsed disease before allo-HSCT

Параметр Parameter	Значение Value	
	Группа «Ино+» (n = 24) InO+ group (n = 24)	Группа «Ино-» (n = 31) InO- group (n = 31)
Токсичность, n (%) Toxicity, n (%)		
ССО SOS	0	0
Гематологическая: hematological:		
нейтрофилы ≤ 500 клеток neutrophil count ≤ 500 cells	24 (100)	31 (100)
тромбоцитопения ≤ 20 × 10 ⁹ /л thrombocytopenia ≤ 20 × 10 ⁹ /L	24 (100)	31 (100)
Инфекции Infections	0	2 (6,5)
Фебрильная нейтропения Febrile neutropenia	3 (12,5)	13 (41,9)
Сепсис/инфекция кровотока Sepsis/Bloodstream infection	0	2 (6,5)
Полинейропатия Polyneuropathy	0	2 (6,5)
Ответ на терапию (p = 0,003) Response to therapy (p = 0.003)		
КГР с неполным восстановлением: CR with incomplete hematologic recovery:	21 (87,5)	15 (48,4)
МОБ+ MRD+	16 (76,2)	12 (38,7)
МОБ- MRD-	5 (23,8)	3 (9,7)
Не ответили No response	3 (12,5)	16 (51,6)

Notes. SOS – sinusoidal obstruction syndrome.

рецидив зафиксирован в 15 (60%) случаях, медиана развития Д+203.

На сегодняшний день имеются данные о механизмах развития рецидива после алло-ТГСК, одним из которых может быть потеря HLA-гаплотипа. Потеря пациент-специфичного HLA-гаплотипа на поверхности бластной популяции является одним из способов «ускользания» опухоли из-под иммунного надзора донорских клеток. Данный феномен наблюдается примерно в 30% случаев рецидивов после частично совместимой алло-ТГСК и наиболее часто при гапло-ТГСК. В исследуемой группе больных лабораторное тестирование с использованием метода STR (анализ высокополиморфных микросателлитных маркеров) по 6 маркерам HLA-гаплотипа было выполнено у 10 реципиентов. Данная методика впервые была описана нами в 2023 г. [15]. В группе пациентов с рецидивом ОЛЛ после гапло-ТГСК потеря гаплотипа обнаружена в 3 случаях: 2 больных из группы «Ино-» и 1 – из группы «Ино+». Медиана развития рецидива составила Д+166 (Д+41 – Д+545). У 2 пациентов отмечали развитие костномозгового рецидива и у 1 реципиента – комбинированный костномозговой рецидив с вовлечением центральной нервной системы (ЦНС). Рецидив без потери HLA-гаплотипа развился в 7 случаях, медиана наступления Д+136 (Д+59 – Д+300). Костномозговой рецидив зафиксирован у 5 больных, комбинированный костномозговой рецидив с экстрамедуллярным вовлечением –

у 2 пациентов. На данный момент сложно оценить влияние моноклонального антитела на вероятную потерю HLA-гаплотипа при развитии рецидива из-за малочисленности группы. Данное обстоятельство пока не указывает непосредственно на роль Ино в возможности ответа при проведении иммунотерапии с использованием инфузии донорских лимфоцитов при рецидиве после алло-ТГСК.

В таблице 3 сведены вышеперечисленные данные.

Учитывая значимость статуса заболевания перед алло-ТГСК, мы провели анализ частоты развития рецидива после трансплантации в обеих группах с КГР с неполным восстановлением. Результаты были следующими: в группе «Ино+» с КГР с неполным восстановлением из 21 пациента 10 (47,6%) развили рецидив после алло-ТГСК, медиана Д+106 (Д+53 – Д+213), костномозговой рецидив зафиксирован у 4 реципиентов, экстрамедуллярный – у 6. В этой группе у 1 больного была обнаружена потеря HLA-гаплотипа при развитии рецидива. В группе «Ино-» с КГР с неполным восстановлением из 15 больных рецидив зафиксирован у 8 (53,3%), медиана наступления Д+422 (Д+108 – Д+929), локализация в костном мозге у 4 пациентов, у 3 с экстрамедуллярным поражением и у 1 больного диагностирован комбинированный рецидив с поражением костного мозга и ЦНС. Потеря HLA-гаплотипа выявлена у 1 больного. Корреляционно-регрессионный анализ

Таблица 3
Сравнение результатов алло-ТГСК у больных в группах «Ино+» и «Ино–»

Tables 3
A comparison of the results of allo-HSCT in the patients in the InO+ and InO– groups

Параметр Parameter	Значение Value		p-значение p value
	Группа «Ино+» (n = 24) InO+ group (n = 24)	Группа «Ино–» (n = 31) InO– group (n = 31)	
Восстановление нейтрофилов > 0,5 × 10 ⁹ /л, медиана Neutrophil recovery > 0.5 × 10 ⁹ /L, the median	Д+22 D+22	Д+19 D+19	n. s.
Восстановление лимфоцитов на Д+30 > 0,3 × 10 ⁹ /л, n (%) Lymphocyte recovery on D+30 > 0.3 × 10 ⁹ /L, n (%)	14/24 (58,3)	15/31 (48,4)	n. s.
Приживление трансплантата, n (%) Engraftment, n (%)	20/24 (83,3)	25/31 (80,6)	n. s.
Восстановление тромбоцитов > 50 × 10 ⁹ /л, n (%), медиана Platelet recovery > 50 × 10 ⁹ /L, n (%), the median day of recovery	22/24 (92), Д+33 22/24 (92), D+33	20/25 (80), Д+26 20/25 (80), D+26	0,04
Острая РТПХ, n (%): Acute GVHD, n (%): III–IV степени III–IV grade	10/24 (41,7) 3/10 (30)	11/25 (44) 5/11 (45,4)	n. s.
Посттрансплантационный рецидив, n (%), медиана Post-transplant relapse, n (%), the median day of relapse	11/20 (55), Д+164 11/20 (55), D+164	15/25 (60), Д+203 15/25 (60), D+203	n. s.
Посттрансплантационный рецидив, n (%): Post-transplant relapse, n (%): с потерей HLA-гаплотипа with loss of heterozygosity of HLA genes без потери HLA-гаплотипа without loss of heterozygosity of HLA genes	1/24 (4,2) 3/24 (12,5)	2/31 (6,5) 4/31 (12,9)	n. s.
ТМА, ассоциированная с алло-ТГСК TMP associated with allo-HSCT	6/24 (25)	3/31 (9,7)	n. s.
ССО SOS	8/24 (32)	3/31 (9,7)	
Смерть, ассоциированная с ССО Death associated with SOS	4/8 (50)	1/3 (33)	

Notes. TMA – thrombotic microangiopathy.

не установил связи между фактором использования Ино перед алло-ТГСК и наступлением рецидива заболевания после трансплантации (коэффициент сопряженности Пирсона 0,056). При более детальном анализе в группе «Ино+» с КГР с неполным восстановлением и отрицательным статусом МОБ мы получили следующие результаты: из 16 пациентов у 5 (31,25%) зафиксирован рецидив В-ОЛЛ после алло-ТГСК, медиана наступления Д+105 (Д+58 – Д+169). Локализация: изолированный костномозговой – 2 случая, экстрамедуллярный (ЦНС) – 3. У 1 пациента определена потеря HLA-гаплотипа во время рецидива. В группе «Ино–» с КГР с неполным восстановлением и отрицательным статусом МОБ из 12 больных 6 (50%) развили рецидив после алло-ТГСК, медиана наступления Д+296 (Д+108 – Д+929). Изолированное поражение костного мозга диагностировано у 2 реципиентов, экстрамедуллярное поражение – в 3 случаях и у 1 ребенка развился комбинированный рецидив с поражением костного мозга и вовлечением ЦНС. В анализируемой группе не было больных с потерей HLA-гаплотипа по технической причине. С помощью корреляционно-регрессионного анализа установлена слабая связь между фактором использования Ино перед алло-ТГСК и наступлением рецидива заболевания после трансплантации (коэффициент сопряженности Пирсона 0,178). Слабая связь обусловлена небольшой численностью исследуемой группы.

Сравнительный анализ общей выживаемости и трансплантационной летальности в обеих группах

Сравнивая ОВ в группе резистентных и рецидивирующих больных, необходимо отметить важность периода оценки. До 2015 г. в арсенале терапевтических опций не было возможным применение Ино. ОВ после алло-ТГСК не превышала 27,4% в группе гапло-ТГСК и была на уровне 20,3% после совместимой родственной и неродственной алло-ТГСК. Существенный сдвиг произошел в 2015 г. По данным нашего анализа ОВ с медианой наблюдения 3 года в группе «Ино+» после гапло-ТГСК составила 50% (рисунки 1).

При анализе ОВ в группах «Ино+» и «Ино–» результаты были следующими: 56,5% против 48,4% соответственно. Основной причиной неудачи остается рецидив после алло-ТГСК. В сравниваемых группах частота была следующей: 55% и 60% соответственно (рисунки 2).

Пациенты в группе «Ино+» имели более предлеченный статус и анамнез резистентного течения заболевания. Этот факт можно объяснить периодом проведения терапии Ино (с 2015 г.). Ранее эта категория больных была бы признана паллиативной и не получила алло-ТГСК. И, напротив, больные в группе «Ино–» до 2015 г. хоть и относились к группе резистентных и рецидивирующих больных, но количество курсов предшествующей терапии было значительно

Рисунок 1

ОВ после гапло-ТГСК у детей с резистентным и рецидивирующим течением В-ОЛЛ (медиана наблюдения 3 года)

Figure 1

The overall survival (OS) rates in the pediatric patients with refractory/relapsed B-ALL after haplo-HSCT (the median follow-up is 3 years)

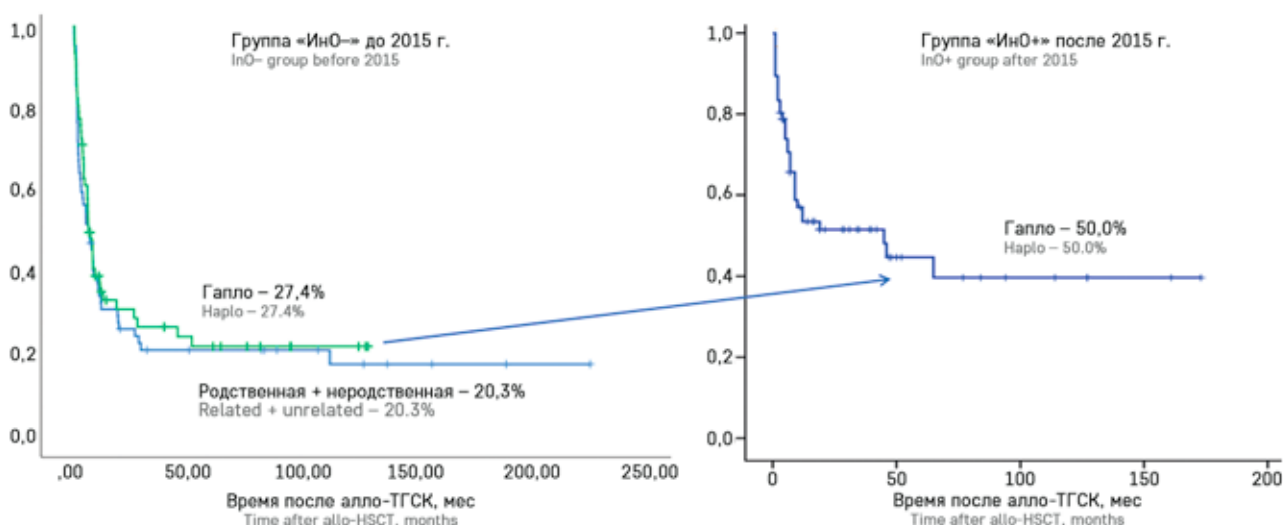
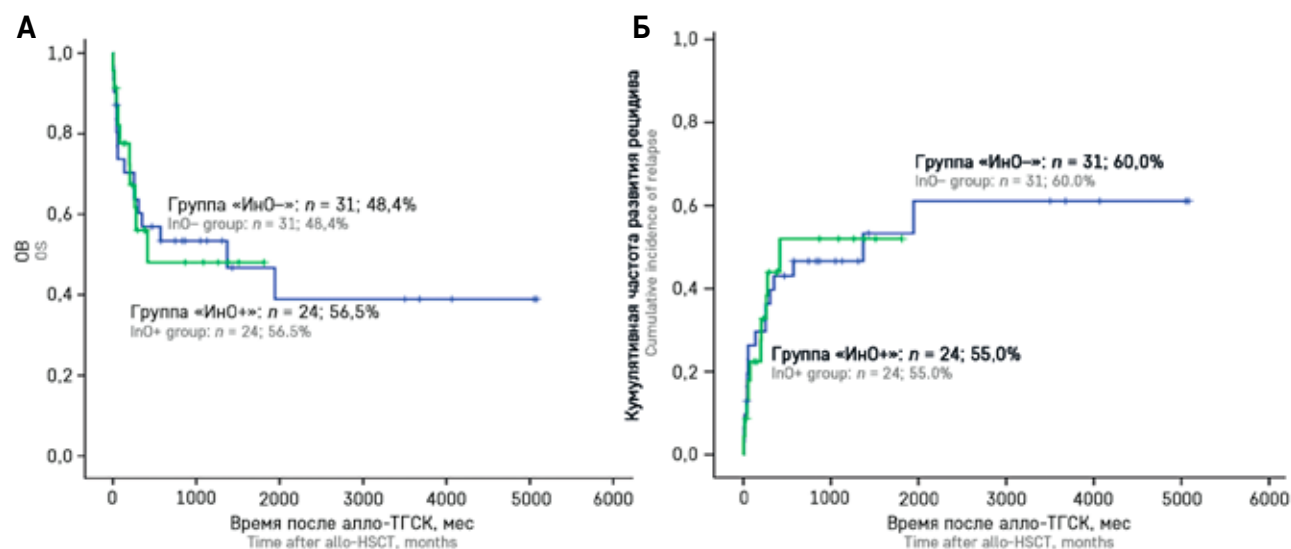


Рисунок 2

ОВ (А) и кумулятивная частота развития рецидива (Б) в группах «Ино+» и «Ино-» после алло-ТГСК ($p = n. s.$)

Figure 2

OS (A) and cumulative incidence of relapse (Б) in the InO+ and InO- groups after allo-HSCT ($p = n. s.$)



меньше. Отсутствие различий в ОВ между группами может быть связано с частотой развития токсических осложнений при применении МАК в группе «Ино+», приведших к летальному исходу, что существенно ухудшает ОВ. В связи с этим мы выполнили анализ ОВ в группе «Ино+» в зависимости от режима кондиционирования.

Применение ИНО в качестве «мостика» перед алло-ТГСК повышает риски токсических осложнений и ранней ТЛ. Снижение токсичности – основная задача в группе резистентных и рецидивирующих больных. В результате нашего анализа применение РИК существенно улучшило ОВ в группе «Ино+»: 61,1% против 25% в группе с МАК ($p = 0,02$) (рисунки 3).

Анализ осложнений, развившихся в ранний период после алло-ТГСК (до Д+100) в группе «Ино+» в зависимости от используемого режима кондиционирования, показал следующее: в группе «Ино+» с РИК инфекционные осложнения диагностированы у 10 (55,5%) пациентов, ТМА – у 1 (5,5%) больного, ССО – у 5 (27,8%) детей, рецидив заболевания – у 7 (38,9%) реципиентов. Причинами летального исхода в группе были резистентный рецидив в 5 (27,8%) случаях, ТЛ, обусловленная ССО, – в 2 (11,1%) случаях. В группе «Ино+» с МАК у всех 6 (100%) больных развились инфекционные осложнения, ТМА – в 1 (16,7%) случае, ССО – у 3 (50%) детей, рецидив заболевания – у 3 (50%) реципиентов. Летальный исход по причине рецидива случился у 1 (16,7%)

больного, ТЛ, обусловленная ССО, – у 4 (66,7%). Таким образом, применение МАК после ИНО являлось фактором, ассоциированным с развитием ССО, что привело к ТЛ в ранние сроки после алло-ТГСК. Вероятно, применение ИНО до алло-ТГСК с последующим РИК наиболее оправданная стратегия. В таблице 4 приведены вышеперечисленные результаты.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

В последние годы многообещающие результаты достигнуты в терапии ОЛЛ у детей благодаря использованию иммунотерапии, включая биспецифический активатор Т-клеток блинатумаб, моноклональное антитело анти-CD22⁺ ИНО и CAR-T-клеточные технологии. Однако потенциально излечивающим методом остается алло-ТГСК.

Проведение алло-ТГСК в резистентном/рецидивирующем течении ОЛЛ без предварительной попытки достичь ответа существенно снижает эффективность данного метода. На сегодняшний день не существует официальных рекомендаций по подготовке этой сложной категории больных к трансплантации. По результатам нашего исследования, применение ИНО до алло-ТГСК по сравнению со стандартной циторедукцией статистически достоверно повышает процент ответа резистентных и рецидивирующих больных В-ОЛЛ: КГР с неполным восстановлением достигнута у 21 (87,5%) больного, в том числе с отрицательным статусом МОБ – 16 (76,2%) пациентов, с персистенцией МОБ – 5 (23,8%) больных; в группе сравнения КГР с неполным восстановлением подтверждена у 15 пациентов: отрицательного статуса МОБ перед алло-ТГСК достигли 12 (38,7%) реципиентов, с персистенцией МОБ – 3 (9,7%) пациента ($p = 0,003$). Полученные результаты сопоставимы с международным опытом применения ИНО [7]. Восстановление тромбоцитарного звена более $50 \times 10^9/\text{л}$ и отсутствие потребности в заместительных трансфузиях тромбоконцентрата в группе «ИНО+» у 92% пациентов после алло-ТГСК по сравнению с группой контроля – 80% может косвенно свидетельствовать об эффективности предтрансплантационной терапии ИНО [14].

На сегодняшний день существует гипотеза о корреляции между клиническим ответом на терапию ИНО, экспрессией CD22 и альтернативным сплай-

сингом предшественника матричной РНК (мРНК). Процесс, в ходе которого экзоны, вырезаемые из предшественника мРНК, объединяются в различных комбинациях, порождает различные формы зрелой мРНК. В результате один ген может образовывать не одну, а множество форм белка. Экзон одного варианта сплайсинга может оказаться интроном в альтернативном пути. Поэтому молекулы мРНК, образованные в результате альтернативного сплайсинга, различаются набором экзонов. Это приводит к образованию различных мРНК и различных белков одного первичного транскрипта. Этот механизм был описан у пациентов с острым миелобластным лейкозом, где продемонстрирована связь между альтернативным сплайсингом антигена CD33 и клиническим ответом, которые получили терапию гемтузумабом озогамцином [16]. В 2021 г. Y. Zhao и соавт. опубликовали результаты исследования, где показали негативное влияние повышенной экспрессии изоформы CD19 при внутриэкзонном сплайсинге во втором экзоне на эффективность терапии блинатумабом [17]. Еще одним предиктором плохого ответа на терапию ИНО является исходный уровень экспрессии CD22 < 70% на опухолевой популяции. Такие данные были получены у взрослых больных В-ОЛЛ [18].

Главной проблемой в группе резистентных и рецидивирующих больных при проведении алло-ТГСК после терапии с применением моноклональных

Рисунок 3
ОВ после алло-ТГСК в зависимости от режима кондиционирования в группе «ИНО+» ($p = 0,02$)

Figure 3
OS after allo-HSCT according to the conditioning regimen in the InO+ groups ($p = 0.02$)

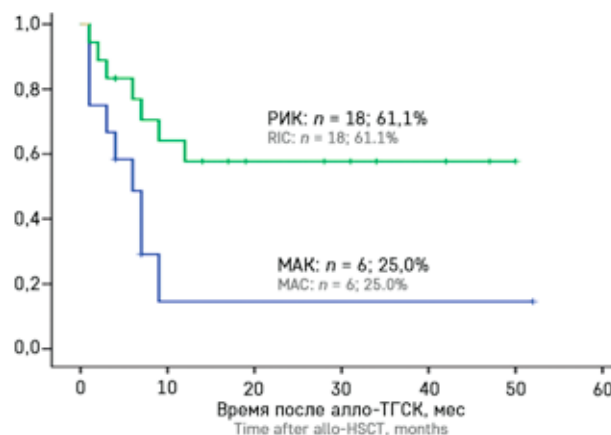


Таблица 4

Осложнения в группе «ИНО+» в ранний период после алло-ТГСК, ассоциированные с режимом кондиционирования ($n = 24$)

Tables 4

Complications in the InO+ group after allo-HSCT before D+100 associated with the conditioning regimen ($n = 24$)

Режим кондиционирования Conditioning regimen	Инфекции Infections	ТМА TTP	ССО SOS	Рецидив Relapse	Летальный исход Death
РИК ($n = 18$), n (%) RIC ($n = 18$), n (%)	10 (55,5)	1 (5,5)	5 (27,8)	7 (38,9)	7 (38,9)
МАК ($n = 6$), n (%) MAC ($n = 6$), n (%)	6 (100)	1 (16,7)	3 (50)	3 (50)	4 (66,7)

антител являются токсические осложнения и ранняя ТЛ. Результаты неблагоприятного исхода и частота развития токсических осложнений при терапии ИНО описаны для взрослой популяции больных [3, 18]. Вклад в развитие ТМА, ассоциированной с алло-ТГСК, вносит компонент профилактики острой РТПХ – ингибитор кальциневрина – такролимус. В марте 2023 г. опубликованы данные о частоте и факторах развития данного осложнения у детей [19]. В нашем исследовании применение ИНО с последующим РИК, отказ от использования ингибиторов кальциневрина существенно улучшили результаты гапло-ТГСК ввиду снижения частоты развития ССО, инфекционных осложнений.

По результатам нашего исследования применение ИНО в качестве “bridge”-терапии не повлияло на частоту развития рецидива с потерей гаплотипа после алло-ТГСК, однако данный тезис требует дальнейшего изучения на большей популяции пациентов. В группе больных «ИНО» с неполным восстановлением возврат болезни отмечался значительно позже – медиана развития Д+422 по сравнению с группой «ИНО+» с неполным восстановлением (Д+213). В нашей предыдущей статье был описан феномен развития позднего рецидива с потерей HLA-гаплотипа [15], это позволяет предположить, что необследованные пациенты в этой группе могли иметь потерю пациент-специфичного HLA-гаплотипа на поверхности бластной популяции. При более детальном анализе в группе «ИНО+» КГР с отрицательным статусом МОБ частота рецидивов после алло-ТГСК составила 31,25% по сравнению с группой «ИНО» – 50%, что было связано с применением ИНО. По-нашему предположению, пациенты в группе «ИНО+» с неполным восстановлением имеют шанс ответить на иммуноадоптивную терапию с введением донорских лимфоцитов при развитии рецидива после алло-ТГСК.

В настоящее время предложенная стратегия позволяет в будущем применять иммуноадоптивную терапию с включением донорских лимфоцитов для профилактики рецидива В-ОЛЛ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

ИНО продемонстрировал эффективность лечения резистентного и рецидивирующего В-ОЛЛ у детей по сравнению с традиционными режимами химиотерапии в качестве подготовки к трансплантации. Применение моноклонального анти-CD22⁺ антитела наиболее оправдано в группе резистентных больных, которым планируется алло-ТГСК. Применение ИНО перед гапло-ТГСК у детей с резистентным и рецидивирующим В-ОЛЛ, большой опухолевой массой и высокой экспрессией CD22⁺ является наиболее предпочтительной опцией.

Современные стратегии гапло-ТГСК с использованием РИК, профилактикой РТПХ и наблюдения в ранний период позволяют контролировать развитие таких тяжелых осложнений, как ССО у детей. Понимание различий в механизме развития рецидива после алло-ТГСК способствует разделению подходов к их профилактике и терапии и превентивному введению с возможностью более эффективного применения иммуноадоптивной терапии донорскими лимфоцитами.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда №22-15-00491 (<https://rscf.ru/project/22-15-00491/>).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

ORCID

Paina O.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7263-4326>
Tsvetkova L.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4952-0704>
Rakhmanova Z.Z. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3386-0942>
Kozhokar P.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5721-0207>
Osipova A.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7629-4293>
Evdokimov A.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3809-421X>
Epifanovskaya O.S. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8168-6811>
Gindina T.L. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1302-3311>
Barkhatov I.M. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8000-3652>
Semenova E.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5077-9225>
Kulagin A.D. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9589-4136>
Zubarovskaya L.S. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2594-7703>

Литература / References

1. Hunger S.P., Mullighan C.G. Acute lymphoblastic leukemia in children. *N Engl J Med* 2015; 373: 1541–52.
2. Nguyen K., Devidas M., Cheng S.C., La M., Raetz E.A., Carroll W.L., et al. Factors influencing survival after relapse from acute lymphoblastic leukemia: A Children's Oncology Group study. *Leukemia* 2008; 22: 2142–50.
3. Lanza F., Maffini E., Rondoni M., Massari E., Faini A.C., Malavasi F. CD22 expression in b-cell acute lymphoblastic leukemia: Biological significance and implications for inotuzumab therapy in adults. *Cancers* 2020; 12: 303.
4. Iwamoto S., Deguchi T., Ohta H., Kiyokawa N., Tsurusawa M., Yamada T., et al. Flow cytometric analysis of *de novo* acute lymphoblastic leukemia in childhood: Report from the Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group. *Int J Hematol* 2011; 94: 185–92.
5. Shah N.N., Stevenson M.S., Yuan C.M., Richards K., Delbrook C., Kreitman R.J., et al. Characterization of CD22 expression in acute lympho-

- blastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer* 2015; 62: 964–9.
6. Shor B., Gerber H.P., Sapra P. Pre-clinical and clinical development of inotuzumab-ozogamicin in hematological malignancies. *Mol Immunol* 2015; 67: 107–16.
 7. Kantarjian H.M., DeAngelo D.J., Stelljes M., Martinelli G., Liedtke M., Stock W., et al. Inotuzumab ozogamicin versus standard therapy for acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 2016; 375: 740–53.
 8. Bhojwani D., Sposto R., Shah N.N., Rodriguez V., Yuan C., Stetler-Stevenson M., et al. Inotuzumab ozogamicin in pediatric patients with relapsed/refractory acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2019; 33: 884–92.
 9. Calvo C., Cabannes-Hamy A., Adjaoud D., Bruno B., Blanc L., Boissel N., et al. Inotuzumab ozogamicin compassionate use for French paediatric patients with relapsed or refractory CD22-positive B-cell acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 2020; 190: e53–6.
 10. Brivio E., Locatelli F., Lopez-Yurda M., Malone A., Diaz de Heredia C., Bieleorai B., et al. A Phase I study of inotuzumab ozogamicin in pediatric relapsed/refractory acute lymphoblastic leukemia (ITCC-059 study). *Blood* 2020; 137: 1582–90.
 11. O'Brien M.M., Ji L., Shah N.N., Rheingold S.R., Bhojwani D., Yuan C.M., et al. Phase II Trial of Inotuzumab Ozogamicin in Children and Adolescents With Relapsed or Refractory B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia: Children's Oncology Group Protocol AALL1621. *J Clin Oncol* 2022; 40: 956–67.
 12. Shah N.N., Stevenson M.S., Yuan C.M., Richards K., Delbrook C., Kreitman R.J., et al. Characterization of CD22 expression in acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer* 2015; 62: 964–9.
 13. Kantarjian H.M., De Angelo D.J., Stelljes M., Liedtke M., Stock W., Gökbuget N., et al. Inotuzumab ozogamicin versus standard of care in relapsed or refractory acute lymphoblastic leukemia: final report and long-term survival follow-up from the randomized, phase 3 INO-VATE study. *Cancer* 2019; 125: 2474–87.
 14. Jabour E., Gökbuget N., Advani A. Impact of minimal residual disease status in patients with relapsed/refractory acute lymphoblastic leukemia treated with inotuzumab ozogamicin in the phase III INO-VATE trial. *Leuk Res* 2020; 88: 1062832.
 15. Цветкова Л.А., Евдокимов А.В., Бархатов И.М., Паина О.В., Епифановская О.С., Бабенко Е.В. и др. Прогностическое значение потери гетерозиготности HLA после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток при развитии рецидива острого лейкоза у детей. *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии* 2023; 22 (2): 44–53. DOI: 10.24287/1726-1708-2023-22-2-44-53 [Tsvetkova L.A., Evdokimov A.V., Barkhatov I.M., Paina O.V., Epifanovskaya O.S., Babenko E.V., et al. The prognostic value of HLA loss of heterozygosity after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in children with relapsed acute leukemia. *Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology* 2023; 22 (2): 44–53. (In Russ.)].
 16. Lamba J.K., Chauhan L., Shin M., Loken M.R., Pollard J.A., Wang Y.C., et al. CD33 splicing polymorphism determines gemtuzumab ozogamicin response in de novo acute myeloid leukemia: Report from randomized phase III children's oncology group trial AAML0531. *J Clin Oncol* 2017; 35: 674–2682.
 17. Zhao Y., Aldoss I., Qu C., Crawford J.C., Gu Z., Allen E.K., et al. Tumor-intrinsic and extrinsic determinants of response to blinatumomab in adults with B-ALL. *Blood* 2021; 137: 471–84.
 18. Rafei H., Kantarjian H.M., Sasaki K., Short N.G., Ravandi F., Huang X., et al. CD22 Expression Level As a Predictor of Survival in Patients (Pts) with Relapsed/Refractory (R-R) Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) Treated with Inotuzumab Ozogamicin (INO) in Combination with Low-Intensity Chemotherapy (mini-hyper-CVD) with or without Blinatumomab: Results from a Phase 2 Study. *ASH* 2020; 136: 23–5. (Supplement 1, 5).
 19. Luo L., Xiong H., Chen Z., Yang L., Sun M., Lu W., et al. Clinical characteristics of pediatric allogeneic hematopoietic stem cell transplantation-associated thrombotic microangiopathy (TA-TMA): a retrospective single-center analysis. *Clin Transl Oncol* 2023; 25: 2451–61. DOI: 10.1007/s12094-023-03129-1

DOI: 10.24287/1726-1708-2024-23-2-71-77

Применение тиотепы в кондиционировании с редуцированной токсичностью перед трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток при первичных иммунодефицитах

Д.Н. Балашов¹, А.Л. Лаберко^{1, 2}, Ю.В. Скворцова¹, А.П. Васильева¹, А.К. Идармачева¹, Э.Р. Султанова¹, Е.И. Гутовская¹, Л.Н. Шелихова¹, М.А. Масчан¹

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, Москва

²Научно-исследовательский институт детской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р.М. Горбачевой ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России, Санкт-Петербург

Применение режимов кондиционирования со сниженной токсичностью у пациентов с первичными иммунодефицитами (ПИД) направлено на снижение токсических эффектов трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК). В результате проведенной трансплантации пациенты должны получить не только хороший шанс на контроль заболевания, но и возможность сохранить высокое качество жизни после терапии. В работе представлен опыт проведения ТГСК при ПИД на платформе TCR $\alpha\beta$ /CD19⁺-деплеции трансплантата и кондиционирования на базе треоосульфана с включением тиотепы в качестве второго алкилирующего препарата. Исследование одобрено независимым этическим комитетом и утверждено решением ученого совета НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева. Проанализирована группа из 79 пациентов в возрасте 0,5–17,6 года (медиана 3,1 года) с различными вариантами ПИД, трансплантированных от HLA-совместимого родственного ($n = 5$), неродственного ($n = 34$) и гаплоидентичного родственного ($n = 40$) доноров. Вероятность развития реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ) > II стадии составила 21%, при этом РТПХ III стадии наблюдалась у 3,8% пациентов, IV стадии РТПХ не выявлено ни у одного пациента. Тяжелых висцеральных токсических осложнений (веноокклюзионная болезнь, тромботическая микроангиопатия и др.) не зарегистрировано ни в одном случае. Вероятность первичной и вторичной недостаточности трансплантата составила 15,4%. Общая выживаемость в исследуемой группе – 82,3%. Статистически значимых различий в общей выживаемости пациентов, трансплантированных от разных типов донора, выявлено не было ($p = 0,164$). Все ассоциированные с проведенной ТГСК летальные случаи являлись следствием тяжелых инфекционных осложнений. Полученные результаты указывают на эффективность, безопасность и целесообразность использования режима кондиционирования с редуцированной токсичностью с включением тиотепы для ТГСК при ПИД.

Ключевые слова: тиотепа, кондиционирование, трансплантация гемопоэтических стволовых клеток, первичные иммунодефициты, токсические осложнения

Балашов Д.Н. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2024; 23 (2): 71–77.
DOI: 10.24287/1726-1708-2024-23-2-71-77

The use of thioteпа in reduced toxicity conditioning regimens before hematopoietic stem cell transplantation in primary immunodeficiencies

D.N. Balashov¹, A.L. Laberko^{1, 2}, Yu.V. Skvortsova¹, A.P. Vasilieva¹, A.K. Idarmacheva¹, E.R. Sultanova¹, E.I. Gutovskaya¹, L.N. Shelikhova¹, M.A. Maschan¹

¹Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology of Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow

²R.M. Gorbacheva Research Institute for Pediatric Oncology, Hematology and Transplantation of the I.P. Pavlov First Saint Petersburg State Medical University of Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Saint Petersburg

The use of reduced toxicity conditioning regimens in patients with primary immunodeficiencies (PID) leads to the reduction of toxic effects of hematopoietic stem cell transplantation (HSCT). Currently, HSCT should result not only in disease control, but also in the improvement of the quality of life. We report the experience of HSCT in PID with TCR $\alpha\beta$ /CD19⁺ graft depletion after conditioning regimen containing treosulfan in combination with thioteпа as a second alkylating agent. The study was approved by the Independent Ethics Committee and the Scientific Council of the Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology. A group of 79 PID patients aged 0.5–17.6 years (the median age was 3.1 years) received HSCT from HLA matched related ($n = 5$), unrelated ($n = 34$) and haploidentical ($n = 40$) donors. The incidence of acute graft-versus-host disease (GVHD) $\geq$ grade II was 21%, grade III GVHD was observed in 3.8%, and none of the patients had GVHD grade IV. There were no cases of severe toxicity, including venoocclusive disease and thrombotic microangiopathy. The incidence of primary and secondary graft failure was 15.4%. The overall survival was 82.3%. There was no statistical difference between overall survival rates of patients who underwent transplantation from different types of donors ($p = 0.164$). All deaths were transplant-related and were due to infections. The use of thioteпа in reduced toxicity conditioning regimen is effective and safe, and can be considered as an option for HSCT in PID.

Key words: thioteпа, conditioning, hematopoietic stem cell transplantation, primary immunodeficiency, toxicity

Balashov D.N., et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology 2024; 23 (2): 71–77.
DOI: 10.24287/1726-1708-2024-23-2-71-77

© 2024 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России

Поступила 13.03.2024
Принята к печати 08.04.2024



EDN: ZMNWYI

Контактная информация:

Балашов Дмитрий Николаевич,
д-р мед. наук, заведующий отделением
трансплантации гемопоэтических
стволовых клеток №2 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ
им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России
Адрес: 117997, Москва,
ул. Саморы Машела, 1
E-mail: bala8@yandex.ru

© 2024 by «D. Rogachev NMRCPHOI»

Received 13.03.2024
Accepted 08.04.2024

Correspondence:

Dmitry N. Balashov,
Dr. Med. Sci., Head of the Department
of Hematopoietic Stem Cell Transplantation
No.2 of the Dmitry Rogachev National Medical
Research Center of Pediatric Hematology,
Oncology and Immunology, Ministry of
Healthcare of the Russian Federation
Address: 1 Samory Mashela St.,
Moscow 117997, Russia
E-mail: bala8@yandex.ru

Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) является эффективным куративным методом лечения пациентов с тяжелыми формами первичных иммунодефицитов (ПИД). В настоящее время целый ряд факторов потенциально предрасполагает к улучшению исходов ТГСК. К ним можно отнести раннюю диагностику заболеваний, новые технологии клеточного инжиниринга при подготовке трансплантата и других клеточных продуктов, более широкую доступность трансплантата за счет расширения пула неродственных доноров и широкого использования парциально совместимых родственных доноров, а также значительный прогресс в области сопроводительной терапии и целый ряд других факторов [1].

К сожалению, одной из чрезвычайно важных проблем у пациентов с ПИД после ТГСК являются первичная и вторичная недостаточность трансплантата, которая может варьировать от 16 до 50% в различных нозологических группах, по результатам ряда клинических исследований [2–7]. Именно риски развития таких осложнений обуславливают целесообразность использования миелоаблативных режимов кондиционирования для более эффективной миело/иммуноабляции. С другой стороны, потребность в редукции негематологической токсичности подготовительной терапии также остается актуальной задачей, учитывая риски клинически значимых жизнеугрожающих последствий при применении стандартных классических режимов кондиционирования, в частности с использованием оральных форм бусульфана и высоких доз циклофосфамида.

Нельзя также игнорировать вероятность развития отдаленных проблем, ассоциированных с ТГСК (асептические некрозы, эндокринные осложнения, нарушение фертильности и т. д.), приводящих к инвалидизации и снижению качества жизни. Именно таким вопросам в последние годы уделяется много внимания, что, безусловно, является поводом для поиска новых решений и подходов к проведению ТГСК.

Цель кондиционирования на современном этапе сводится к применению препаратов с минимальными ранними и поздними токсическими эффектами, но при этом с хорошим миелоаблативным и иммуносупрессивным потенциалом, что важно как для лечения основного заболевания, так и для обеспечения хорошей функции трансплантата.

Принципиально важным переходным этапом в сторону реализации безопасного профиля ТГСК стало и широкое использование треосульфана, структурного аналога бусульфана, в качестве базового миелоаблативного агента. В работе М.А. Slatter и соавт. [6] было продемонстрировано, что кондиционирование с треосульфаном у паци-

ентов с незлокачественными заболеваниями является достаточно безопасным. Однако в связи с тем, что использование одного алкилирующего агента у пациентов с высоким риском тяжелой недостаточности трансплантата угрожаемо в плане обеспечения полноценной функции трансплантата, в данном исследовании часть пациентов получили второй алкилирующий препарат в кондиционировании – тиотепу или мелфалан. В работе показано, что использование тиотепы было эффективным и не увеличивало частоту токсических осложнений после ТГСК в отличие от группы пациентов с мелфаланом, где частота такого рода проблем значительно выше [6].

Первый опыт использования кондиционирования с одним алкилирующим агентом при ТГСК на платформе TCR $\alpha\beta$ ⁺CD19⁺-деплеции у пациентов с ПИД в НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева также продемонстрировал хорошие результаты в плане общей выживаемости (ОВ) и редукции посттрансплантационной токсичности, но при этом была зарегистрирована высокая вероятность развития первичной и вторичной недостаточности трансплантата (36,7%; 95% доверительный интервал (ДИ) 21–60,9) [8]. Полученные результаты стали основанием для пересмотра протоколов кондиционирования и эскалации их интенсивности, в том числе за счет добавления тиотепы в треосульфан-содержащие режимы.

В работе представлен опыт применения тиотепы в режимах кондиционирования с редуцированной токсичностью у пациентов с ПИД, трансплантированных в НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева. Исследование одобрено независимым этическим комитетом и утверждено решением ученого совета НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

С 2013 по 2022 г. в НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева были трансплантированы 97 пациентов с различными вариантами ПИД с использованием технологии TCR $\alpha\beta$ ⁺/CD19⁺-деплеции и кондиционирования на основе треосульфана и с добавлением тиотепы в качестве второго алкилирующего агента.

Из дальнейшего анализа были исключены пациенты с тяжелой комбинированной иммунной недостаточностью в связи со значимым отличием от основной группы пациентов ввиду отягощенного соматического статуса в большинстве случаев на момент ТГСК (в первую очередь за счет тяжелых инфекционных осложнений). Кроме того, тяжесть состояния пациентов не позволяла унифицировать подход к кондиционированию при тяжелой комбинированной иммунной недостаточности, что в большинстве случаев было основанием для персонифицированного подхода к подготовительной терапии.

Таким образом, в результате были обработаны данные, полученные при анализе 79 пациентов с остальными вариантами ПИД (таблица). Медиана возраста пациентов составила 3,1 года (разброс 0,5–17,6 года). Диагноз был поставлен на основании критериев, разработанных Европейской группой по лечению ПИД [9].

Пациентам проводилось кондиционирование со сниженной токсичностью в следующем составе: треосульфан 36–42 г/м², флударабин 150 мг/м², тиотепа 10 мг/м², ритуксимаб 100 мг/м². У 16 пациентов в кондиционировании дополнительно использовались гранулоцитарный колониестимулирующий фактор 50 мкг/кг и плериксафор 720 мкг/кг (синдром Вискотта–Олдрича – 13; хроническая гранулематозная болезнь – 3) в соответствии с используемым локальным протоколом [10, 11].

В качестве серотерапии 74 пациента получали антилимфоцитарный иммуноглобулин (Тимоглобулин®, Genzyme Europe B.V., Нидерланды) в дозе 5 мг/кг, 1 пациенту был назначен алемтузумаб 1 мг/кг, в 4 случаях серотерапия не проводилась.

Источником гемопоэтических стволовых клеток были стволовые клетки периферической крови от HLA-совместимого родственного (СРД) ($n = 5$), неродственного (НРД) (9/10; $n = 8$; 10/10, $n = 26$) и гаплоидентичного родственного (ГРД) ($n = 40$) доноров.

Со всеми продуктами афереза проводили процедуру TCR $\alpha\beta^+$ /CD19⁺-деплеции на аппаратах CliniMACS или CliniMACS Prodigy в соответствии с инструкциями производителя (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Германия).

В качестве иммуносупрессивной терапии для профилактики реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ) после ТГСК у 19 пациентов использовались блокаторы кальциневрина, в 15 случаях дополнительно применялся абатацепт, в 3 – микофенолата мофетил. У 60 пациентов профилактика РТПХ после ТГСК не проводилась.

Приживление трансплантата регистрировалось в первый из 3 последующих дней, когда уровень нейтрофилов в периферической крови достигал значений более $0,5 \times 10^9/\text{л}$, за день приживления тромбоцитов принимался первый из 7 дней, когда уровень тромбоцитов в крови превышал $20 \times 10^9/\text{л}$. За неприживление трансплантата принималось отсутствие лабораторных признаков приживления до +30-го дня и/или собственный общий химеризм более 90% на +30-й день после ТГСК. Отторжение трансплантата регистрировалось при наличии более 90% собственных клеток по результатам исследования химеризма после зарегистрированного ранее приживления трансплантата. За недостаточность трансплантата принимались случаи его неприживления или отторжения. Диагностика и стадирование

Таблица

Варианты первичных иммунодефицитов у пациентов, включенных в исследование

Tables

Variants of primary immunodeficiency (PID) in the patients included in our study

Вариант ПИД PID variant	Число пациентов, n Number of patients, n
Дефицит DOCK2 DOCK2 deficiency	1
Комбинированная иммунная недостаточность неverified Combined immune deficiency, unverified	10
Синдром Мак-Кьюсика McKusick type metaphyseal chondrodysplasia	1
Дефицит CD40L CD40L deficiency	1
Дефицит DOCK8 DOCK8 deficiency	1
Дефицит PNP PNP deficiency	1
Дефицит STAT3 STAT3 deficiency	1
Дефицит CTLA4 CTLA4 deficiency	1
Гемофагоцитарный лимфогистиоцитоз неverified Hemophagocytic lymphohistiocytosis, unverified	6
Гемофагоцитарный лимфогистиоцитоз (мутация гена <i>UNC13D</i>) Hemophagocytic lymphohistiocytosis (<i>UNC13D</i> gene mutation)	6
Гемофагоцитарный лимфогистиоцитоз (мутация гена <i>STXBP2</i>) Hemophagocytic lymphohistiocytosis (<i>STXBP2</i> gene mutation)	1
Дефицит GATA2 GATA2 deficiency	2
Синдром Грисцелли Griscelli syndrome	1
Дефицит IL2RG IL2RG deficiency	1
Дефицит LRBA LRBA deficiency	1
Синдром PAMI PAMI syndrome	2
RALD	3
Тяжелая врожденная нейтропения Severe congenital neutropenia	7
Синдром Швахмана–Даймонда Shwachman–Diamond syndrome	2
Дефицит SMARCD2 SMARCD2 deficiency	1
Дефицит STAT1 GOF STAT1 GOF deficiency	1
WHIM-синдром WHIM syndrome	2
Синдром Вискотта–Олдрича Wiskott–Aldrich syndrome	13
Хроническая гранулематозная болезнь Chronic granulomatous disease	3
Х-сцепленный лимфопролиферативный синдром 1-го типа X-linked lymphoproliferative syndrome type 1	3
Х-сцепленный лимфопролиферативный синдром 2-го типа X-linked lymphoproliferative syndrome type 2	7
Всего Total number of patients	79

Примечание. RALD – RAS-ассоциированное аутоиммунное лейкопролиферативное заболевание; WHIM – бородавки, гипогаммаглобулинемия, миелокатексис; синдром PAMI – PSTPIP1-ассоциированный воспалительный синдром.

Note. RALD – RAS-associated autoimmune leukoproliferative disorder; WHIM – warts, hypogammaglobulinemia, myelokathexis; PAMI syndrome – PSTPIP1-associated inflammatory syndrome.

острой и хронической РТПХ проводились в соответствии со стандартными опубликованными критериями [12, 13].

Оценка риска развития недостаточности трансплантата и РТПХ проводилась методом кумулятивной вероятности (КВР) с учетом конкурирующих событий с указанием 95% ДИ. Вероятность выживаемости оценивалась по методу Каплана–Майера на момент последнего наблюдения или события. За событие принимались недостаточность трансплантата или смерть после ТГСК.

Сравнение результатов выживаемости, неприживления и отторжения трансплантата между группами пациентов проводилось с использованием теста log-rank. Различия между сравниваемыми параметрами считались статистически значимыми при $p\text{-value} < 0,05$.

За события при оценке бессобытийной выживаемости (БСВ) принимались смерть пациента, а также первичная и вторичная недостаточность трансплантата (неприживление, отторжение).

Статистическая обработка полученных данных проводилась с помощью программы XLSTAT 2023 (Lumivero, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Медиана периода наблюдения составила 4,8 года (разброс 0,04–9,1 года). Клеточный состав трансплантата: NC $2,9\text{--}21,0 \times 10^8/\text{кг}$ (медиана $8,7 \times 10^8/\text{кг}$), CD34⁺ $3,7\text{--}15,1 \times 10^6/\text{кг}$ (медиана $10,0 \times 10^6/\text{кг}$), CD3⁺TCRαβ⁺ $3,0\text{--}200,5 \times 10^3/\text{кг}$ (медиана $43,3 \times 10^3/\text{кг}$).

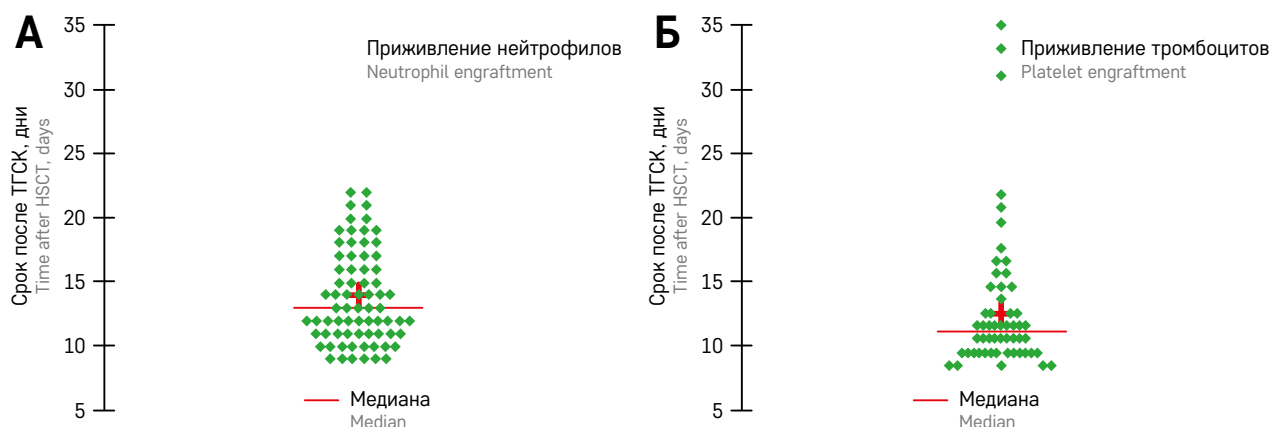
Приживление нейтрофилов было зарегистрировано у 72 из 79 пациентов на 9–22-й день после ТГСК (медиана +13-й день). Приживление тромбоцитов регистрировалось также у 72 из 79 пациентов на 9–35-й день после ТГСК (медиана +11,5-й день) (рисунок 1).

Рисунок 1

Сроки приживления трансплантата гемопоэтических стволовых клеток: А – нейтрофилов; Б – тромбоцитов

Figure 1

Time to hematopoietic stem cell engraftment: A – neutrophils; Б – platelets
HSCT – hematopoietic stem cell transplantation



Острая РТПХ > II стадии была выявлена у 17 пациентов (21%; 95% ДИ 14,4–33,3). Важно отметить, что в 14 (17,7%) из 17 случаев имела место острая РТПХ II стадии, у 3 (3,8%) пациентов – III стадии, а IV стадия не зарегистрирована ни в одном случае. Нельзя исключить, что триггером тяжелой острой РТПХ III стадии у всех 3 пациентов являлись вирусные инфекции, протекающие с доказанными висцеральными проявлениями: цитомегаловирусной инфекцией (ЦМВ; $n = 1$), аденовирусной инфекцией (АДВ; $n = 1$), ЦМВ с АДВ ($n = 1$).

КВР острой РТПХ > II стадии была наиболее высокой при ТГСК от СРД (60%; 95% ДИ 29,3–100), при ТГСК от НРД она составила 18,2% (95% ДИ 8,8–37,5), при использовании ГРД – 20,2% (95% ДИ 10,8–37,4). Однако статистически значимых различий в КВР острой РТПХ в зависимости от типа донора не выявлено ($p = 0,097$) (рисунок 2).

Хроническая РТПХ выявлена у 5 пациентов (6,8%; 95% ДИ 2,9–15,8): в 1 случае (ГРД) – поражение кожи, среднетяжелая форма, в 4 – тяжелая форма (НРД – 1; СРД – 2; ГРД – 1).

Ранние токсические осложнения были ограничены тресульфат-ассоциированной токсикодермией с умеренными проявлениями, а также мукозитами, тяжелые проявления которых зарегистрированы у 6 пациентов, нуждавшихся в использовании наркотических анальгетиков. Тяжелых висцеральных токсических осложнений (веноокклюзионная болезнь, тромботическая микроангиопатия и др.) не зарегистрировано ни в одном случае.

Реактивация ЦМВ в виде виремии после ТГСК определялась у 33 (41,7%) из 79 пациентов. При этом висцеральные ЦМВ-инфекции выявлены в 16 (20%) случаях: хориоретинит ($n = 7$), пневмония ($n = 4$), колит ($n = 1$), сочетание хориоретинита и пневмонии ($n = 3$), пневмония и энцефалит ($n = 1$). Реактивация АДВ зарегистрирована у 19 пациентов, среди которых

висцеральные проявления инфекций отмечались в 9 случаях: пневмония ($n = 2$), энтероколит ($n = 3$), пневмония в сочетании с энтероколитом ($n = 5$).

Первичная и вторичная недостаточность трансплантата зарегистрирована в 12 случаях (15,4%; 95% ДИ 9,1–25,9). Неприживление отмечалось у 7 пациентов, а отторжение – в 5 случаях на ранних сроках после ТГСК (от 0,6 до 1,9 мес, медиана 0,9 мес). Наиболее часто первичные и вторичные дисфункции трансплантата выявлены при ТГСК от ГРД (22,5% (95% ДИ 12,7–40); КВР тяжелой недостаточности трансплантата при ТГСК от НРД составила 9,1% (95% ДИ 3,1–26,7); при ТГСК от РСД ни первичной, ни вторичной недостаточности трансплантата выявлено не было (рисунок 3).

С учетом зарегистрированных случаев недостаточности трансплантата БСВ в исследуемой группе составила 73,5% (рисунок 4).

В настоящее время живы 65 из 79 пациентов, 12 из 14 смертельных исходов связаны с выпол-

ненной ТГСК (вирусные инфекции – 7, инвазивный микоз – 1, бактериальная инфекция – 1, инфекция смешанной этиологии – 3). Другие 2 случая летальности связаны с РТПХ после повторной ТГСК в другой трансплантационной клинике ($n = 1$), с рецидивом опухоли, ассоциированной с основным заболеванием ($n = 1$). ОВ в исследуемой группе составила 82,3% (рисунок 4).

При стратификации пациентов на группы в зависимости от типа донора выживаемость в группе пациентов, трансплантированных от СРД, составила 100%, от НРД – 85,3%, а от ГРД – 77,5% ($p = 0,164$) (рисунок 5).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

В данном исследовании выполнен анализ основных эффектов и исходов терапии пациентов с ПИД, которым выполнена ТГСК на платформе TCR $\alpha\beta^+$ /CD19 $^+$ -деплеции с использованием тиотепы в

Рисунок 2
КВР острой РТПХ при использовании различных типов донора

Figure 2
The cumulative probability (CP) of acute graft-versus-host MRD – matched related donor; HRD – haploidentical related donor; URD – unrelated donor; CI – confidence interval

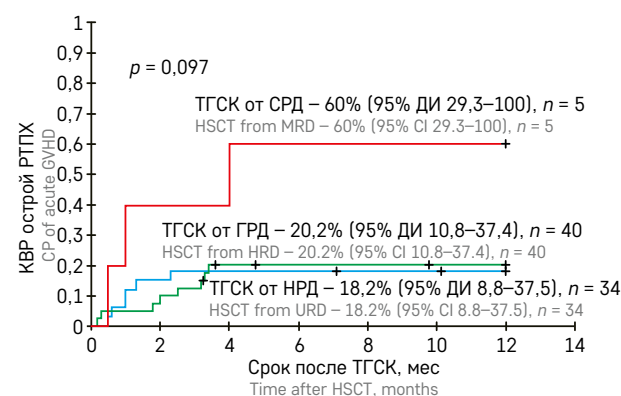


Рисунок 3
КВР первичной и вторичной недостаточности трансплантата при использовании различных типов донора для ТГСК

Figure 3
CP of primary and secondary graft failure with different types of donors for HSCT

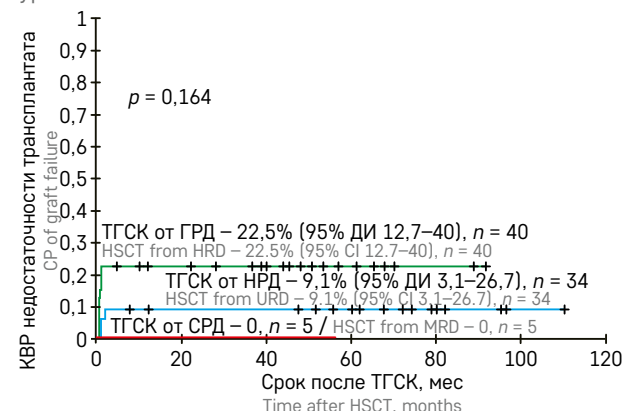


Рисунок 4
ОВ и БСВ (события для расчета БСВ: смерть, неприживление, отторжение)

Figure 4
Overall (OS) and event-free (EFS) survival (events for the calculation of EFS: death, graft failure, graft rejection)

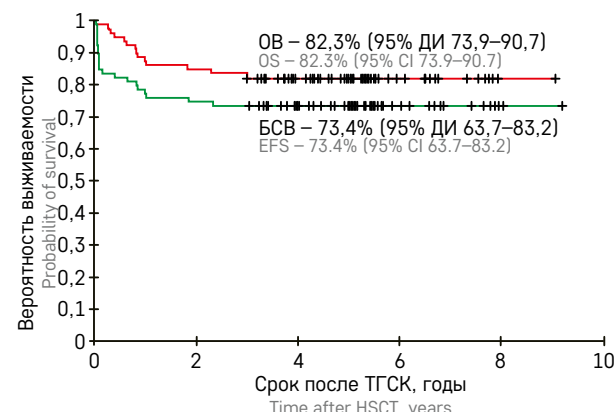
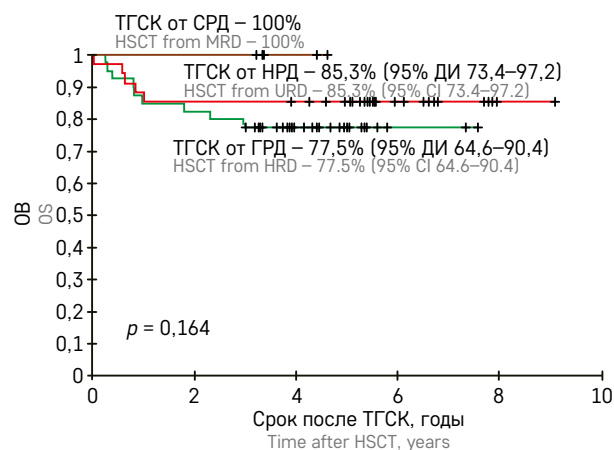


Рисунок 5
ОВ при использовании различных типов донора для ТГСК

Figure 5
OS with different types of donors for HSCT



качестве дополнительного алкилирующего агента в кондиционировании с редуцированной токсичностью.

TCR $\alpha\beta^+$ /CD19 $^-$ -деплегция трансплантата в очередной раз продемонстрировала высокую эффективность в плане редукции частоты развития РТПХ. Важно обратить внимание на то, что при общей вероятности развития острой РТПХ (21%) выше II стадии ни у одного пациента не было выявлено острой РТПХ IV стадии, а III стадия данного осложнения зарегистрирована лишь в 3,8% случаев. Это существенно меньше, чем в ряде исследований на аналогичных группах пациентов, но без использования полной или парциальной Т-клеточной деплеции. В частности, по данным M.A. Slatter и соавт. [6], 10% пациентов имели острую РТПХ III–IV стадии, что почти в 3 раза превышает риск данного осложнения в нашей группе.

Различия в КВР острой РТПХ в зависимости от типа донора не являются статистически значимыми ($p = 0,097$). Более высокая частота острой РТПХ в группе пациентов, трансплантированных от РСД, по сравнению с альтернативными донорами не может свидетельствовать в пользу недостатка технологии при выполнении трансплантации от совместимого сиблинга, так как эта группа крайне малочисленна ($n = 5$).

Вирусные инфекции являлись частыми осложнениями в исследуемой группе. Эти данные соответствуют опубликованным ранее результатам ТГСК с TCR $\alpha\beta^+$ /CD19 $^-$ -деплецией у пациентов с ПИД [14–16]. Наиболее частой висцеральной проблемой у пациентов с ЦМВ-инфекцией были хориоретиниты, что раньше уже было продемонстрировано в ряде публикаций как характерная особенность пациентов с ПИД [17, 18].

Ранняя токсичность кондиционирования была крайне невысокой в нашем исследовании, так как не зарегистрировано ни одного случая тяжелых токсических осложнений (веноокклюзионная болезнь, тромботическая микроангиопатия и др.). Это, безусловно, подтверждает безопасный профиль использовавшегося режима кондиционирования с применением тиотепы в качестве второго алкилятора. Наши результаты соответствуют опубликованным ранее данным об отсутствии увеличения частоты токсических осложнений при добавлении тиотепы в треосульфан-содержащий режим кондиционирования для ТГСК у пациентов с незлокачественными заболеваниями [6].

Показатель КВР первичной и вторичной недостаточности трансплантата был невысоким и составил 15,4%, что соотносится с результатами ряда крупных исследований. В частности, по данным M.A. Slatter и соавт. [6], этот показатель составил 16,5%, а по результатам A. Bertaina и соавт. [7] – 16,2%.

Также следует обратить внимание на существующий ранее опыт НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева по применению кондиционирования с треосульфаном без тиотепы или других дополнительных алкилирующих препаратов, где частота первичной и вторичной недостаточности достигала 36,7% [8]. С учетом значимого снижения данного показателя при добавлении тиотепы по результатам проведенного анализа можно сделать вывод о высокой эффективности включения данного препарата в кондиционирование на базе треосульфана у пациентов с ПИД.

КВР тяжелой недостаточности трансплантата была выше при использовании трансплантата от ГРД, что коррелирует с более высокими рисками развития данного осложнения при таком типе донора [6].

ОВ в исследуемой группе составила 82,3%, что является достаточно высоким показателем, тем более с учетом использования в 94% случаев альтернативных доноров (НРД и ГРД) для ТГСК. Интересно, что вопреки имеющимся данным о том, что ОВ при использовании ГРД достоверно ниже, чем при применении СРД и НРД [19], статистически значимых различий в показателях ОВ в зависимости от типа донора в нашем исследовании получено не было ($p = 0,164$). Все случаи ассоциированной с ТГСК летальности связаны с инфекционными, но не токсическими осложнениями, что ожидаемо при применении кондиционирования с редуцированной токсичностью.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

ТГСК реализована сегодня в виде доступной и эффективной технологии при лечении пациентов с многими тяжелыми формами ПИД. К сожалению, токсичность традиционных миелоаблативных режимов кондиционирования может поставить под сомнение эффективность терапии с учетом высокой вероятности развития клинически значимых и жизнеугрожающих осложнений. Отработка режимов кондиционирования с редуцированной токсичностью у пациентов с ПИД сегодня является важным направлением, ориентированным на снижение токсических эффектов ТГСК. Улучшение результатов трансплантации при оптимально подобранных режимах кондиционирования заключается не только в росте показателей выживаемости, но и в возможности обеспечить пациентам хорошее качество жизни после проведенной терапии.

Применение тиотепы в комбинации с треосульфаном не является принципиально новым решением. Однако использованная нами технология иммуномагнитного процессинга трансплантата в виде TCR $\alpha\beta^+$ /CD19 $^-$ -деплеции внесла определенные коррективы и стала аргументом для изучения исходов ТГСК, в том числе при различных вариантах конди-

онирования с редуцированной токсичностью. Полученные в исследовании результаты указывают на возможность использования кондиционирования с тиотепой в качестве дополнительного алкилирующего агента для ТГСК у пациентов с ПИД.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Не указан.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

ORCID

Balashov D.N. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2689-0569>

Laberko A.L. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2354-2588>

Skvortsova Yu.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0566-053X>

Vasilieva A.P. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3949-248X>

Idarmacheva A.K. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5962-1264>

Sultanova E.R. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0319-3699>

Gutovskaya E.I. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3800-8927>

Shelikhova L.N. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0520-5630>

Maschan M.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0016-6698>

Литература / References

- Lum S.H., Hoenig M., Gennery A.R., Slatter M.A. Conditioning Regimens for Hematopoietic Cell Transplantation in Primary Immunodeficiency. *Curr Allergy Asthma Rep* 2019; 19: 52. DOI: 10.1007/s11882-019-0883-1
- Wehr C., Gennery A.R., Lindemans C., Schulz A., Hoenig M., Marks R., et al. Multicenter experience in hematopoietic stem cell transplantation for serious complications of common variable immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol* 2015; 135: 988–97.e6. DOI: 10.1016/j.jaci.2014.11.029
- Güngör T., Teira P., Slatter M., Stussi G., Stepensky P., Moshous D., et al. Reduced-intensity conditioning and HLA-matched haematopoietic stem-cell transplantation in patients with chronic granulomatous disease: a prospective multicentre study. *Lancet* 2014; 383 (9915): 436–48. DOI: 10.1016/S0140-6736(13)62069-3
- Shah N.N., Freeman A.F., Su H., Cole K., Parta M., Moutsopoulos N.M., et al. Haploidentical related donor hematopoietic stem cell transplantation for dedicator-of-cytokinesis 8 deficiency using post-transplantation cyclophosphamide. *Biol Blood Marrow Transplant* 2017; 23: 980–90. DOI: 10.1016/j.bbmt.2017.03.016
- Leiding J.W., Okada S., Hagin D., Abinun M., Shcherbina A., Balashov D.N., et al. Hematopoietic stem cell transplantation in patients with gain-of-uncoupling signal transducer and activator of transcription 1 mutations. *J Allergy Clin Immunol* 2018; 141: 704–17. DOI: 10.1016/j.jaci.2017.03.049
- Slatter M.A., Boztug H., Potschger U., Sykora K.W., Lankester A., Yaniv I., et al. Treosulfan-based conditioning regimens for allogeneic haematopoietic stem cell transplantation in children with non-malignant diseases. *Bone Marrow Transplant* 2015; 50 (12): 1536–41. DOI: 10.1038/bmt.2015.171
- Bertaina A., Merli P., Rutella S., Pagliara D., Bernardo M.E., Masetti R., et al. HLA-haploidentical stem cell transplantation after removal of $\alpha\beta^+$ T and B cells in children with nonmalignant disorders. *Blood* 2014; 124: 822–6. DOI: 10.1182/blood-2014-03-563817
- Balashov D., Shcherbina A., Maschan M., Trakhtman P., Skvortsova Y., Shelikhova L., et al. Single-Center Experience of Unrelated and Haploidentical Stem Cell Transplantation with TCR $\alpha\beta$ and CD19 Depletion in Children with Primary Immunodeficiency Syndromes. *Biol Blood Marrow Transplant* 2015; 21: 1955–62. DOI: 10.1016/j.bbmt.2015.07.008
- [Electronic resource] URL: <http://esid.org/Working-Parties/Registry/Diagnosis-criteria> (accessed 06.06.2024).
- Балашов Д.Н., Гутовская Е.И., Козловская С.Н., Радыгина С.А., Лаберко А.Л., Масчан А.А. Применение плексиафора и гранулоцитарного колониестимулирующего фактора в кондиционировании перед трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток у пациентов с синдромом Вискотта–Олдрича. *Вопросы гематологии/онкологии и иммунологии в педиатрии* 2017; 16 (3): 55–8. DOI: 10.24287/1726-1708-2017-16-3-55-58 [Balashov D.N., Gutovskaya E.I., Kozlovskaya S.N., Radygina S.A., Laberko A.L., Maschan A.A. The use of plerixafor and G-CSF during conditioning for hematopoietic stem cell transplantation in a patient with Wiskott–Aldrich syndrome. *Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology* 2017; 16 (3): 55–8. (In Russ.)]
- Balashov D., Laberko A., Shcherbina A., Trakhtman P., Abramov D., Gutovskaya E., et al. Conditioning Regimen with Plerixafor Is Safe and Improves the Outcome of TCR $\alpha\beta^+$ and CD19 $^+$ Cell-Depleted Stem Cell Transplantation in Patients with Wiskott–Aldrich Syndrome. *Biol Blood Marrow Transplant* 2018; 24 (7): 1432–40. DOI: 10.1016/j.bbmt.2018.03.006
- Jagasia M.H., Greinix H.T., Arora M., Williams K.M., Wolff D., Cowen E.W., et al. National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease: I. The 2014 Diagnosis and Staging Working Group report. *Biol Blood Marrow Transplant* 2015; 21 (3): 389–401.e1. DOI: 10.1016/j.bbmt.2014.12.001
- Arora M., Cutler C.S., Jagasia M.H., Pidala J., Chai X., Martin P.J., et al. Late Acute and Chronic Graft-versus-Host Disease after Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2016; 22 (3): 449–55. DOI: 10.1016/j.bbmt.2015.10.018
- Shah R.M., Elfeky R., Nademi Z., Quasim W., Amorolia P., Chiesa R., et al. T-cell receptor $\alpha\beta^+$ and CD19 $^+$ cell-depleted haploidentical and mismatched hematopoietic stem cell transplantation in primary immune deficiency. *J Allergy Clin Immunol* 2017; 141 (4): 1417–26. DOI: 10.1016/j.jaci.2017.07.008
- Laberko A., Bogoyavlenskaya A., Shelikhova L., Shekhovtsova Z., Balashov D., Voronin K., et al. Risk factors for and the clinical impact of cytomegalovirus and Epstein-Barr virus infections in pediatric recipients of TCR $\alpha\beta^+$ and CD19-depleted grafts. *Biol Blood Marrow Transplant* 2017; 23 (2): 483–90. DOI: 10.1016/j.bbmt.2016.12.635
- Богоявленская А.А., Лаберко А.Л., Шелихова Л.Н., Шеховцова Ж.Б., Балашов Д.Н., Воронин К.А. и др. Герпес-вирусные инфекции у реципиентов аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток с TCR $\alpha\beta^+$ и CD19-деплецией: факторы риска и прогноз. *Вопросы гематологии/онкологии и иммунологии в педиатрии* 2017; 16 (1): 10–21. DOI: 10.24287/1726-1708-2017-16-1-10-21 [Bogoyavlenskaya A.A., Laberko A.L., Shelikhova L.N., Shekhovtsova Z.B., Balashov D.N., Voronin K.A., et al. Herpesvirus infection following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation with TCR $\alpha\beta^+$ and CD19 depletion: risk factors and outcome. *Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology* 2017; 16 (1): 10–21. (In Russ.)]
- Laberko A., Sultanova E., Gutovskaya E., Shipitsina I., Shelikhova L., Kurnikova E., et al. Mismatched related vs matched unrelated donors in TCR $\alpha\beta$ /CD19-depleted HSCT for primary immunodeficiencies. *Blood* 2019; 134 (20): 1755–63. DOI: 10.1182/blood.2019001757
- Hiwarkar P., Gajdosova E., Qasim W., Worth A., Breuer J., Chies R., et al. Frequent Occurrence of Cytomegalovirus Retinitis During Immune Reconstitution Warrants Regular Ophthalmic Screening in High-Risk Pediatric Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients. *Clin Infect Dis* 2014; 58 (12): 1700–6. DOI: 10.1093/cid/ciu021
- Gennery A.R., Slatter M.A., Grandin L., Taupin P., Cant A.J., Veys P., et al. European Society for Immunodeficiency. Transplantation of hematopoietic stem cells and long-term survival for primary immunodeficiencies in Europe: entering a new century, do we do better? *J Allergy Clin Immunol* 2010; 126 (3): 602–10. DOI: 10.1016/j.jaci.2010.06.015

© 2024 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ
им. Дмитрия Рогачева»
Минздрава России
Поступила 29.08.2023
Принята к печати 08.04.2024



EDN: BLWHBQ

Контактная информация:

Вашура Андрей Юрьевич,
заведующий отделом научных основ
питания и нутритивно-метаболической
терапии ЛРНЦ «Русское поле»
ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева»
Минздрава России
Адрес: 117997, Москва,
ул. Саморы Машела, 1
E-mail: avashura@gmail.com

DOI: 10.24287/1726-1708-2024-23-2-78-89

Оценка изменений состава тела у детей после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток с использованием метода разведения дейтерия и рентгеноденситометрии: результаты пилотного исследования

Ю.А. Алымова¹, А.Ю. Вашура^{1,2}, А.И. Ефимова³, С.Г. Руднев⁴, В.М. Сенявин³

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, Москва

²ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, Москва

³ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова»

⁴ФГБУН Институт вычислительной математики им. Г.И. Марчука РАН, Москва

Комплексное изучение нутритивного статуса детей с онкологическими заболеваниями с использованием эталонных методов оценки состава тела представляет интерес для оптимизации режимов нутритивной коррекции в процессе лечения и после его окончания. В статье представлен опыт первой российской апробации метода разведения дейтерия для оценки состава тела у детей в раннем периоде после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК). Исследование проводится в рамках проекта МАГАТЭ по применению ядерных методов оценки нутритивного статуса у детей с онкологическими заболеваниями, одобрено независимым этическим комитетом и утверждено решением ученого совета НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева. С февраля 2021 г. по апрель 2023 г. в исследование были включены 39 пациентов в возрасте от 5 до 17 лет, из которых 4 впоследствии были исключены. Из оставшихся 35 пациентов (25 мальчиков и 10 девочек, медиана возраста 9,7 года) 25 имели диагноз острого лимфобластного лейкоза, 4 – острого миелоидного лейкоза, 3 – апластической анемии, 2 – острого билинейного лейкоза и в 1 случае была установлена лимфома. Обследование проводилось в несколько этапов: за 30–10 сут до ТГСК (этап 1), между –2-ми и +2-ми сутками от ТГСК (этап 2), между 30-ми и 45-ми сутками после ТГСК (этап 3), между 100-ми и 125-ми сутками после ТГСК (этап 4), а также между 280-ми и 380-ми сутками после ТГСК (этап 5). Двое из 35 пациентов прошли все 5 этапов обследования, 21 – 4 этапа, 11 – 3 этапа и 1 – 2 этапа обследования. Все пациенты нуждались в парентеральной нутритивной поддержке, которая проводилась на этапах 2 и 3 ($n = 35$) и на этапе 4 ($n = 7$). Начиная с этапа 3 все пациенты получали энтеральную нутритивную поддержку. Процедура обследования включала оценку клинического статуса и лабораторных показателей, биоимпедансный анализ (БИА), антропометрические измерения, оценку фактического питания, объема и качества нутритивной поддержки, а также применение метода разведения дейтерия (МРД) и двухэнергетической рентгеновской абсорбциометрии (ДРА) – только на этапах 1, 4 и 5. МРД был реализован у 8 из 35 пациентов. Число пациентов, для которых состав тела хотя бы на одном этапе был оценен с применением всех 3 рассматриваемых методов (МРД, ДРА и БИА), составило 7 человек, а тех, у кого такие измерения были доступны для двух соседних этапов – 3 человека. Сопоставляли результаты оценки состава тела пациентов на основе МРД, ДРА и БИА. Статистическую значимость индивидуальных изменений и парных оценок состава тела определяли на основе критерия знаковых рангов Вилкоксона для зависимых данных при пороговом уровне значимости $p = 0,05$. Перед проведением ТГСК 17 из 35 пациентов, согласно классификации значений индекса массы тела Всемирной организации здравоохранения, имели избыточный вес или ожирение, и только 2 из 35 – пониженный вес, что соответствует общим представлениям об адекватном состоянии питания пациентов перед ТГСК. Вместе с тем по данным БИА у 11 из 18 пациентов с нормальным или недостаточным весом наблюдалось повышенное или высокое ожирение, что может указывать на повышенную вероятность наличия у них катаболических изменений. На этом фоне в раннем периоде после ТГСК (между этапами 1–4) наблюдалось резкое снижение средних значений массы тела и индекса массы тела за счет уменьшения тощей массы (ТМТ) и в меньшей степени жировой массы (ЖМТ), что указывает на прогрессирование катаболических изменений. При сравнении оценок состава тела, полученных с использованием разных методов, наименьшие расхождения наблюдались между результатами МРД и БИА (–1,0 кг для ТМТ). В то же время оценки ТМТ методом ДРА были значимо ниже, чем на основе МРД и БИА (на 2,3 кг и 3,3 кг соответственно), а ЖМТ и %ЖМТ – значимо выше (на 2,6 кг и 3,8 кг, а также на 7,8% и 10,9% соответственно), что может объясняться увеличением гидратации ТМТ. Полученные начальные данные свидетельствуют о согласованности МРД, ДРА и БИА при оценке изменений ТМТ, ЖМТ и %ЖМТ на групповом, но не индивидуальном уровне. Для уточнения этих результатов и сравнения клинической значимости рассмотренных методов оценки состава тела у детей с онкологическими заболеваниями на этапе ТГСК необходимо увеличение размера выборки.

Ключевые слова: дети, трансплантация гемопоэтических стволовых клеток, нутритивный статус, состав тела, биоимпедансный анализ, двухэнергетическая рентгеновская абсорбциометрия, метод разведения дейтерия

Алымова Ю.А. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2024; 23 (2): 78–89. DOI: 10.24287/1726-1708-2024-23-2-78-89

Evaluation of body composition changes in children after hematopoietic stem cell transplantation using the deuterium dilution method and double-energy X-ray absorptiometry: results from a pilot study

Yu.A. Alymova¹, A.Yu. Vashura^{1,2}, A.I. Efimova³, S.G. Rudnev⁴, V.M. Senyavin³

¹Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology of Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow

²N.I. Pirogov Russian National Research Medical University of Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow

³M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow

⁴Marchuk Institute of Numerical Mathematics of the Russian Academy of Sciences, Moscow

A comprehensive investigation of nutritional status of children with oncological diseases using reference methods of body composition analysis is of interest for optimizing nutritional support during and after cancer treatment. In this paper, we report the first clinical use of the deuterium dilution method for body composition assessment in children in the early period after hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) in Russia. Our study is carried out as a part of the IAEA project on applying nuclear methods for the evaluation of nutritional status in childhood cancer. It was approved by the Independent Ethics Committee and the Scientific Council of the Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology. From February 2021 to April 2023, the study enrolled 39 patients aged 5 to 17 years, 4 of whom were subsequently excluded. Out of the remaining 35 patients (25 boys and 10 girls with the median age of 9.7 years), 25 were diagnosed with acute lymphoblastic leukemia, 4 with acute myeloid leukemia, 3 with aplastic anemia, 2 with acute bilineal leukemia, and 1 with lymphoma. The children were assessed at the following time points: between day –30 and day –10 of HSCT (time point 1); between day –2 and day +2 of HSCT (time point 2); between day +30 and day +45 after HSCT (time point 3), between day +100 and day +125 after HSCT (time point 4), and between day +280 and day +380 after HSCT (time point 5). Two patients were assessed at all 5 time points, 21 patients – at 4 time points, 11 patients – at 3 time points, and 1 patient – at two time points. All the patients required parenteral nutrition between time points 2 and 3 ($n = 35$). Out of these, 7 patients also received parenteral nutrition support from time point 3 to 4. All the patients were given enteral nutrition support starting from time point 3. Evaluations at each time point included clinical status assessment, laboratory testing, a bioimpedance analysis (BIA), anthropometric measurements, the assessment of oral intake as well as the amount and quality of nutritional support. Measurements using the deuterium dilution method (DDM) and a dual-energy X-ray absorptiometry (DXA) were performed only at time points 1, 4, and 5. The DDM was applied in 8 out of 35 patients. Body composition was measured using all three methods (DDM, DXA, and BIA) at least at one time point in 7 patients and at two adjacent time points in 3 patients. The results of body composition assessment using the DDM, DXA and BIA were compared. The statistical significance of individual changes and differences between paired measurements of body composition were evaluated using the Wilcoxon signed-rank test for dependent data with a threshold significance level of $p = 0.05$. Before HSCT, 17 out of 35 patients were overweight or obese according to the body mass index (BMI) thresholds set by the World Health Organization, and only 2 out of 35 patients were underweight, which corresponds to the common understanding of nutritional status in children before HSCT. Nevertheless, according to BIA findings, 11 out of 18 patients with normal or reduced BMI had an increased or high body fat percentage (%BF), which may be an evidence of a catabolic state. Between time points 1 and 4, there was a sharp decrease in mean body weight and BMI due to a reduction in fat-free mass (FFM) and, to a lesser extent, in fat mass (FM), indicating the progression of catabolic changes. A comparison of body composition estimates obtained by the DDM, DXA, and BIA revealed the smallest differences between the DDM and BIA measurements (–1.0 kg difference for FFM). However, the estimates of FFM obtained by DXA were significantly lower than those obtained by the DDM and BIA (by 2.3 kg and 3.3 kg, respectively), while FM and %BF estimated by DXA were significantly higher than those estimated by the DDM and BIA (by 2.6 kg and 3.8 kg, and by 7.8% and 10.9%, respectively) which could be explained by an increase in FFM hydration. Our preliminary data demonstrate good agreement between the DDM, DXA and BIA in assessing FFM, FM and %BF changes at a group level, but not at an individual level. A larger sample size is needed to clarify the obtained results and to compare the clinical significance of these methods of body composition assessment in children with cancer during and after HSCT.

Key words: children, hematopoietic stem cell transplantation, nutritional status, body composition, bioelectrical impedance analysis, dual-energy X-ray absorptiometry, deuterium dilution method

Alymova Yu.A., et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology 2024; 23 (2): 78–89.
DOI: 10.24287/1726-1708-2024-23-2-78-89

© 2024 by «D. Rogachev NMRCPOI»

Received 29.08.2023

Accepted 08.04.2024

Correspondence:

Andrey Yu. Vashura,
Head of the Department of Scientific Basics of Nutrition and Nutrition and Metabolic Therapy, the Russkoe Pole Treatment and Rehabilitation Center, the Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Ministry of Healthcare of the Russian Federation
Address: 1 Samory Mashela St.,
Moscow 117997, Russia
E-mail: avashura@gmail.com

Известно, что дети, проходящие противоопухолевое лечение, часто имеют выраженные нутритивные, метаболические нарушения и изменения состава тела [1–3], поэтому адекватная оценка нутритивного статуса таких пациентов является первой и важнейшей задачей их нутритивного сопровождения [4]. Причинами указанных нарушений являются алиментарные (связанные с проблемами приема пищи, нарушениями пищевого поведения, аппетита и проч.), гастроинтестинальные (прежде всего ассоциированные с нарушением пищеварительной функции и снижением эффективности энтеральной нутритивной поддержки), метаболические (нарушение обмена макронутриентов со снижением толерантности к проводимой нутритивной терапии, нефро- и гепатопатия, а также инсулинорезистентность) и патологические (с калом, мочой, рвотой и т. д.) потери нутриентов. Указанные состояния могут иметь место не только в процессе активного противоопухолевого лечения, но и после его окончания, что существенным образом негативно влияет на возмож-

ности реабилитации пациента [5, 6]. Так, в одном из наших исследований была показана тесная корреляция динамики моторной функции и величины соматического пула белка у детей, завершивших лечение от опухолей центральной нервной системы [7].

Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) является альтернативным (а в некоторых случаях – единственным) методом лечения детей с онкологическими, гематологическими и неонкологическими заболеваниями и, кроме того, является методом выбора для противоопухолевого лечения у наиболее тяжелых пациентов и при состояниях, не позволяющих проводить дальнейшую плановую химиотерапию [8, 9]. В посттрансплантационном периоде все дети имеют высокий риск развития нутритивных и метаболических нарушений, степень выраженности которых у них может быть выше, чем у пациентов, проходящих противоопухолевое лечение без ТГСК [10]. Длительность таких нарушений может составлять годы [11, 12], при этом возможно наличие скрытых нарушений, не определяемых рутинными

методами оценки нутритивного статуса. Между тем своевременно не скорректированные нутритивные и метаболические нарушения имеют тенденцию усугубляться. Вместе с неврологическими, гастроинтестинальными и другими негативными последствиями лечения они оказывают выраженный инвалидизирующий эффект и снижают реабилитационный потенциал [13]. Следовательно, адекватная оценка нутритивного статуса необходима для обеспечения нутритивной коррекции в процессе лечения и после его окончания.

К методам оценки нутритивного статуса относятся антропометрия (включая измерение кожно-жировых складок) и анализ состава тела. При этом простые антропометрические индикаторы, такие как индекс массы тела (ИМТ), окружность плеча и кожно-жировая складка над трицепсом, могут не отражать реальных изменений нутритивного статуса у детей, проходящих противоопухолевое лечение [1, 4]. Одним из наиболее часто используемых методов оценки состава тела в норме и при заболеваниях является биоимпедансный анализ (БИА). Несмотря на косвенный характер оценки состава тела, БИА остается важным практическим инструментом, поскольку он прост в применении, неинвазивен, относительно дешев и не требует длительной подготовки персонала и пациентов [14]. БИА наряду с определением окружности мышц плеча доказал свою значимость для прогнозирования осложнений противоопухолевого лечения [15]. Однако его точность при оценке параметров состава тела в онкопедиатрии, особенно в раннем периоде после ТГСК, неясна. Для более точной характеристики состава тела применяются рентгеноденситометрия, воздушная плетизмография, определение естественной радиоактивности всего тела, изотопные и другие методы [16–18]. Изотопные методы являются прецизионными и безопасными [19] для определения объема водных секторов организма, но крайне дорогими в применении. Эталонным и при этом весьма дорогостоящим методом оценки общей гидратации является метод разведения дейтерия (МРД), поэтому он редко используется в клинической практике рутинно и, как правило, применяется для калибровки и проверки точности косвенных методов оценки состава тела [20, 21]. Рентгеноденситометрия (или двухэнергетическая рентгеновская абсорбциометрия, ДРА) является эталонным методом оценки минеральной плотности костной ткани и «золотым стандартом» диагностики остеопороза и, кроме того, рассматривается в качестве условного эталона при определении тощей (ТМТ) и жировой (ЖМТ) массы тела (МТ) [22, 23]. Его преимуществами являются очень низкая доза облучения (порядка 4–5 мкЗв на 1 обследование) и простота использования, к недостаткам относятся сравнительно высокая цена и

ограниченная доступность. Известно, что воспроизводимость результатов оценки ТМТ и ЖМТ методом ДРА зависит от степени жиротложения [24], при этом точность может также варьировать в зависимости от модели денситометра, исследуемой группы, состояния кровоснабжения тканей, гидратации и других факторов [25–28]. Для эталонного уровня точности оценки ТМТ и ЖМТ ДРА целесообразно использовать в сочетании с другими методами в четырехкомпонентных моделях состава тела.

В 2019 г. Международным агентством по атомной энергии (МАГАТЭ) был организован научный проект с участием исследовательских коллективов из 10 стран мира, включая Россию, направленный на применение ядерных методов оценки нутритивного статуса, таких как МРД, ДРА и компьютерная томография, для повышения эффективности лечения и реабилитации детей с онкологическими заболеваниями [18, 29]. Российская часть проекта связана с оценкой изменений состава тела у детей после ТГСК с использованием МРД.

Цель данного исследования, проводимого в рамках проекта, – апробация МРД для оценки состава тела у детей с онкологическими заболеваниями на этапе ТГСК.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Проспективное обсервационное исследование состава тела и нутритивного статуса детей с онкологическими заболеваниями на этапе ТГСК проводится с февраля 2021 г. на базе ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, пациенты и/или их законные представители подписали протоколы информированного согласия. Исследование одобрено независимым этическим комитетом (заключение №9/2020 от 18.12.2020) и утверждено решением ученого совета НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева. В нашей статье приводятся данные, полученные с момента начала включения пациентов до апреля 2023 г. Критериями включения пациентов являются возраст от 5 до 18 лет, наличие острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ), острого миелоидного лейкоза (ОМЛ), острого билинейного лейкоза (ОБЛ), лимфомы или апластической анемии, внесение ребенка в лист ожидания первой ТГСК, а также отсутствие противопоказаний для приема пищи/жидкости *per os* и для БИА состава тела. Критериями исключения являются невыполнение хотя бы одного из критериев включения, а также наличие психических и тяжелых неврологических нарушений.

Соответствующие критериям включения пациенты обследуются перед ТГСК и на различных этапах после ее проведения: за 30–10 сут до ТГСК (этап 1), между –2-ми и +2-ми сутками ТГСК (этап 2), между

30-ми и 45-ми сутками после ТГСК (этап 3), между 100-ми и 125-ми сутками после ТГСК (этап 4), между 280-ми и 380-ми сутками после ТГСК (этап 5).

Процедура обследования пациента включает оценку клинического статуса и лабораторных показателей, применение МРД и ДРА (только на этапах 1, 4 и 5), а также БИА, антропометрические измерения с оценкой соматотипа по схеме Хит–Картера, измерение силы сжатия кисти, оценку потребляемой пищи, объема и качества нутритивной поддержки (пищевой дневник, данные листа назначения) и оценку токсических эффектов по шкале CTCAE 5.0 (рисунок 1).

МРД применяли в соответствии с методическими рекомендациями МАГАТЭ [29] на основе анализа содержания дейтерированной воды в пробах слюны пациента через 3 и 4 ч после приема тяжелой воды. Измерения выполняли относительно образца слюны пациента до приема препарата. Использовали дейтерированную воду в изотопной концентрации 99,8% от компании Carl Roth (Германия) с дополнительным химическим и радиологическим анализом в Аналитическом центре МГУ им. М.В. Ломоносова на соответствие стандартам качества питьевой воды. Для обеспечения безмикробного фона проводили тройную тиндализацию тяжелой воды. Содержание дейтерированной воды в пробах слюны измеряли с использованием инфракрасного Фурье-спектрометра Bruker Tensor 27 (Bruker Optics GmbH, Германия). Определяли «дейтериевое пространство» V_d (кг) как отношение дозы введенной дейтерированной воды (мг) к разности ее содержания в слюне до и после приема препарата (мг/кг). Содержание воды в организме (СВО, кг) рассчитывали как отношение $V_d/1,041$. ТМТ (кг) рассчитывали на основе зависящего от возраста и пола коэффициента ее гидратации k [30] по формуле: $TMT = CVO/k$.

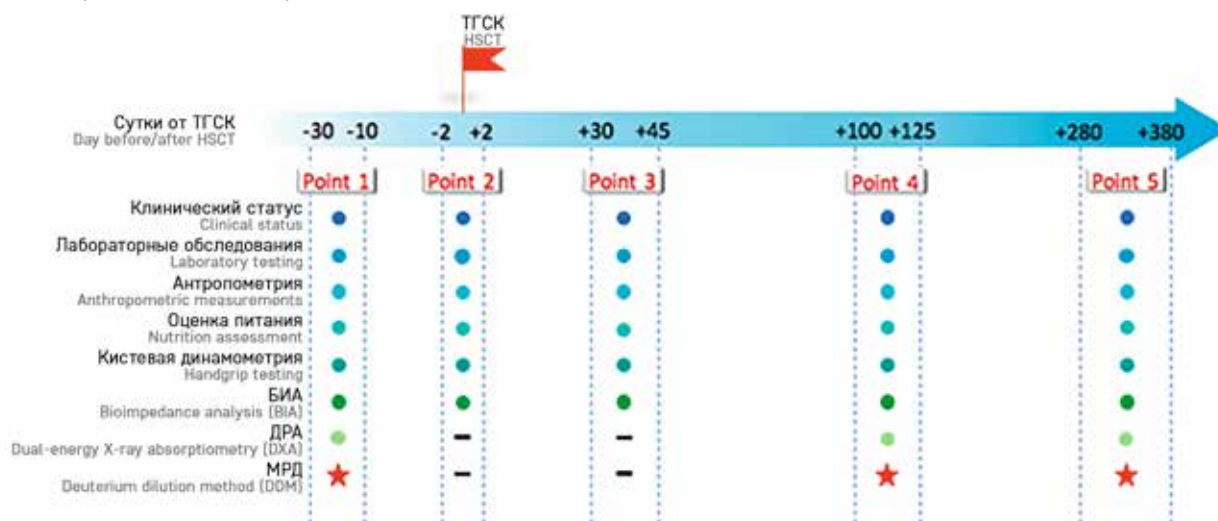
Рисунок 1

Этапы и методы исследования

Figure 1

Timing and methods of assessments

HSCT – hematopoietic stem cell transplantation



ДРА проводили в положении пациента лежа на спине с использованием денситометра Lunar Prodigy Advance (GE HealthCare, США) при стандартном режиме сканирования всего тела. Использовали показатели общей МТ (кг) и ЖМТ (кг) из протокола расширенного анализа состава тела. ТМТ (кг) рассчитывали как сумму массы обезжиренных мягких тканей и минеральной МТ.

БИА проводили с использованием анализатора ABC-01 «Медасс» (ООО НТЦ Медасс, Россия) на правой стороне тела в положении пациента лежа на спине с применением одноразовых биоадгезивных электродов F9049/RU2234TAB (FIAB, Италия). Фазовый угол импеданса рассчитывали как арктангенс величины $(X_c/R) \times 180^\circ/\pi$, где X_c и R – реактивная и активная составляющие импеданса (Ом), измеренные на частоте 50 кГц. ТМТ оценивали по формуле Хауткупер [31]: $TMT (кг) = 0,61 \times (DT^2/R) + 0,25 \times MT (кг) + 1,31$, где DT – длина тела (см). ЖМТ определяли как разность между МТ и ТМТ. Процентное содержание жира в МТ (%ЖМТ) рассчитывали как $ЖМТ/MT \times 100\%$.

МТ измеряли на медицинских весах ТВЕС-02 (АО «Тулиновский приборостроительный завод», Россия) с точностью измерений до 0,1 кг, а DT – в положении стоя ростомером ТВЕС РП (АО «Тулиновский приборостроительный завод», Россия) с точностью до 0,5 см. ИМТ рассчитывали как отношение МТ к квадрату DT (кг/м²). Для оценки соматотипа в конституциональной схеме Шелдона в модификации Хит–Картера [32] измеряли обхваты напряженного плеча и голени, ширину локтя (поперечный диаметр дистального эпифиза плеча) и колена (поперечный диаметр дистального эпифиза бедра), а также толщину кожно-жировых складок под лопаткой, на задней поверхности плеча (над трицепсом, КЖСТ),

на животе (латерально, над подвздошным гребнем) и на голени. Кроме того, измеряли обхват расслабленного плеча (ОП) и рассчитывали окружность мышц плеча (ОМП) как разность между ОП и умноженной на число π толщиной КЖСТ. Обхватные размеры тела измеряли гибкой сантиметровой лентой со специальным устройством, позволяющим оказывать при измерении одинаковое давление на мягкие ткани. Толщину кожно-жировых складок измеряли калипером Холтейн (Holtain Tanner/Whitehouse skinfold caliper). Ширину локтя и колена измеряли с использованием штангенциркуля.

Для характеристики нутритивного статуса пациентов использовали классификацию значений ИМТ Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) в зависимости от возраста и пола [33] с рекомендованными отрезными точками для избыточного веса (+1SD), ожирения (+2SD), недостаточного веса (–2SD) и истощения (–3SD). Также использовали локализованные критерии диагностики уровня жиротложения на основе БИА %ЖМТ [34], согласованные с вышеуказанной классификацией ВОЗ. Для выявления задержки роста (stunting) использовали значение –2SD ДТ для данного возраста и пола [33].

С ноября 2021 г. по апрель 2023 г. в исследование были включены 39 пациентов, в том числе 29 мальчиков и 10 девочек в возрасте от 5 до 17 лет. Четверо мальчиков были впоследствии исключены. Из оставшихся в исследовании 35 пациентов 25 имели ОПЛ, 4 – ОМЛ, 3 – апластическую анемию, 2 – ОБЛ и 1 – лимфому. Двое из 35 пациентов прошли все 5 этапов обследования, 21 – 4 этапа, 11 – 3 этапа и 1 – 2 этапа обследования. Все пациенты нуждались в парентеральной нутритивной поддержке, которая проводилась на этапах 2 и 3 ($n = 35$) и на этапе 4 ($n = 7$). Начиная с этапа 3 все пациенты получали энтеральную нутритивную поддержку.

МРД был реализован у 8 из 35 пациентов, в том числе у 4 – дважды (на этапах 1 и 4), и у 1 – трижды (на этапах 1, 4 и 5). Причинами ограниченного проведения МРД были необходимость отладки методики измерений в первые месяцы набора пациентов ($n = 15$), клинические проблемы, препятствующие приему дейтерированной воды, такие как тошнота, рвота и гиперсаливация ($n = 5$), отказ родителей в связи с радиофобией ($n = 6$) и отказ пациента во время проведения обследования ($n = 2$). У 4 из 8 пациентов МРД был выполнен только на этапе 1 (у 3 – в связи с невозможностью приема дейтерированной воды на этапе 4 из-за эметического и/или диарейного синдрома и у 1 – так как этап 4 для него еще не наступил). Кроме того, результаты оценки состава тела одного из пациентов на основе МРД на этапе 1 были аннулированы в связи с нарушением процедуры сбора данных. В итоге число пациентов,

для которых состав тела хотя бы на одном этапе был оценен с применением всех 3 рассматриваемых методов (МРД, ДРА и БИА), составило 7 человек, в том числе 3 пациента были обследованы таким образом на 2 этапах и 1 – на 3 этапах. Число пациентов, у которых такие измерения были доступны для 2 соседних этапов, составило 4 человека. Число пациентов, для которых было проведено хотя бы 1 парное измерение с использованием методов ДРА и БИА, составило 17 человек.

Сопоставляли результаты оценки состава тела пациентов на основе МРД, ДРА и БИА. Статистическую значимость межполовых различий определяли на основе критерия Манна–Уитни, а индивидуальные изменения и парные оценки состава тела с использованием различных методов – на основе критерия знаковых рангов Вилкоксона для зависимых данных при пороговом уровне значимости $p = 0,05$.

Также на всем периоде исследования проводили оценку объемов продленной инфузионной терапии. Для каждого дня рассчитывались отношения объемов суточной инфузии (мл/сут) к МТ. В случае отсутствия измерения пациента в данный день МТ вменялась линейной моделью на основании двух ближайших измерений, для обработки и анализа данных использовались библиотеки NumPy 1.25 и Pandas 2.0.3 для языка программирования Python 3.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Общая антропометрическая характеристика группы обследованных на этапе 1 представлена в *таблице 1*. Статистически значимые различия между подгруппами мальчиков и девочек отсутствовали.

Задержка роста отмечалась у 1 из 35 пациентов. В соответствии с классификацией значений ИМТ ВОЗ около половины (16 из 35) пациентов на этапе 1 имели нормальный вес в соответствии с возрастом и полом, примерно столько же (17 из 35) – избыточный вес и ожирение, еще 2 – недостаточный вес (*рисунок 2А*). Вместе с тем из 32 пациентов, прошедших на данном этапе биоимпедансное обследование, только 6 характеризовались нормальными значениями %ЖМТ, а остальные имели повышенное или высокое жиротложение (*рисунок 2Б*).

На *рисунке 3* показаны индивидуальные траектории относительных изменений антропометрических показателей, а на *рисунке 4* – параметров состава тела обследованных по данным биоимпедансных измерений. В подгруппе детей, прошедших не менее 4 этапов обследования ($n = 23$), на фоне увеличения средней ДТ (на 0,9 см) наблюдалось прогрессивное снижение МТ (в среднем на 4,2 кг) и ИМТ (в среднем на 2,1 кг/м²). В подгруппе пациентов, у которых на этапах 1 и 4 биоимпедансные измерения были прове-

Таблица 1

Общая характеристика группы обследованных на этапе 1 (среднее значение (стандартное отклонение))*

Tables 1

The general characteristics of the group of patients examined at time point 1 (presented as the mean value (standard deviation))*

Параметр Parameter	Мальчики (n = 25) Boys (n = 25)	Девочки (n = 10) Girls (n = 10)
Возраст, годы Age, years	10,5 (3,9)	9,9 (2,7)
Рост, см Height, cm	141,4 (22,5)	144,2 (19,5)
Вес, кг Weight, kg	40,9 (15,4)	42,9 (21,8)
ИМТ, кг/м ² Body mass index (BMI), kg/m ²	19,8 (3,3)	19,6 (5,9)
КЖСТ, мм Triceps skinfold thickness (TSFT), mm	12,1 (4,3)	14,9 (8,6)
ОМП, мм Arm muscle circumference (AMC), mm	193,5 (29,8)	193,1 (34,7)
СВО, кг Total body water (TBW), kg	21,7 (8,6)	22,2 (9,8)
ТМТ, кг Fat-free mass (FFM), kg	29,4 (11,9)	30,1 (13,5)
ЖМТ, кг Fat mass (FM), kg	12,2 (5,0)	14,7 (9,2)
%ЖМТ %BF	28,9 (6,0)	30,7 (7,6)
Фазовый угол, град. Phase angle, degrees	4,6 (0,7)	4,2 (0,6)

Примечание. * – оценка параметров СВО, ТМТ, ЖМТ, %ЖМТ и фазового угла по данным биоимпедансных измерений приводится для 23 мальчиков и 9 девочек, а для КЖСТ и ОМП – для 22 мальчиков и 9 девочек, у которых соответствующие измерения были выполнены.

Note. * – the values of TBW, FFM, FM, %BF, and phase angle measured by BIA are presented for 23 boys and 9 girls; the values of TSFT and AMC are presented for 22 boys and 9 girls.

дены ($n = 14$), МТ снизилась на 5,7 кг, а ИМТ – на 2,5 кг/м² (с 20,6 до 18,1 кг/м²). По данным БИА, это происходило преимущественно за счет снижения ТМТ (на 3,9 кг), и в меньшей степени – ЖМТ (на 1,8 кг) при сохранении низких средних значений фазового угла импеданса (4,5 град.). При этом показатель %ЖМТ снизился незначительно – на 0,5%. В подгруппе пациентов, у которых на 1-м и 4-м этапах были выполнены измерения КЖСТ и ОМП ($n = 16$), толщина КЖСТ уменьшилась в среднем на 2,7 мм, а ОМП – на 5,3 мм. Указанные изменения МТ, ИМТ, ТМТ и ЖМТ были статистически значимы.

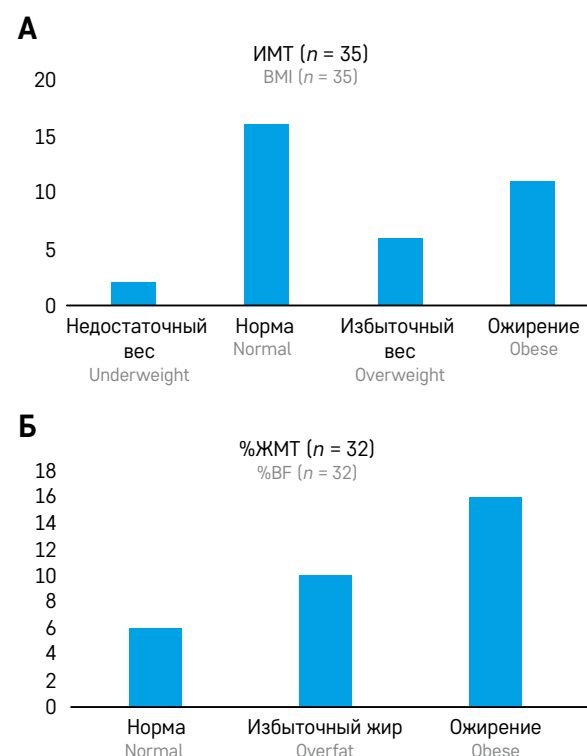
На рисунке 5 дано сравнение средних значений ТМТ, ЖМТ и %ЖМТ для подгруппы пациентов, у которых на соответствующем этапе проводилась оценка состава тела с использованием всех 3 рассматриваемых методов ($n = 7$, всего 11 троекратных измерений на различных этапах). Оценки ТМТ на основе ДРА были значимо ниже, а ЖМТ и %ЖМТ – значимо выше, чем с использованием 2 других методов. Так, например, разность средних значений оценок состава тела между МРД и ДРА составила +2,3 кг для ТМТ, –2,6 кг для ЖМТ и –7,8% для %ЖМТ (рисунк 5). Значимые различия оценок ТМТ, ЖМТ и %ЖМТ, полученных на основе МРД и БИА, в рассматриваемой подгруппе отсут-

Рисунок 2

Классификация значений ИМТ (А) и %ЖМТ (Б) в группе обследованных на этапе 1

Figure 2

The number of patients examined at time point 1 in each BMI (А) and %BF (Б) category



ствовали. Вместе с тем наблюдались разнонаправленные половые различия биоимпедансной оценки ТМТ в сравнении с МРД: у мальчиков ($n = 3$) она была несколько ниже (на 0,5 кг), а у девочек ($n = 4$) – на 1,5 кг выше оценки ТМТ на основе МРД.

Показанное на рисунке 5 соотношение между оценками состава тела на основе ДРА и БИА сохранялось (при статистически значимых различиях) и в подгруппе всех пациентов, у которых были проведены соответствующие парные измерения ($n = 17$, всего 22 парных измерения; рисунок 6). Амплитуда разности средних значений оценок ТМТ, ЖМТ и %ЖМТ на основе ДРА и БИА зависела от пола обследованных (рисунк 7) и слабо зависела от этапа измерений за исключением показателя %ЖМТ (рисунк 8).

По результатам оценки изменений параметров состава тела на этапах обследования (у тех пациентов, где соответствующие измерения были проведены с использованием всех 3 методов) наблюдалась согласованность указанных изменений на групповом уровне, в то время как индивидуальные изменения могли существенно различаться как по знаку, так и по амплитуде (таблица 2).

Рисунок 3

Индивидуальные изменения МТ, ИМТ, КЖСТ и ОМП обследованных по данным антропометрии

Figure 3

Individual changes in anthropometric measurements, such as body mass (BM), BMI, TSFT, and AMC

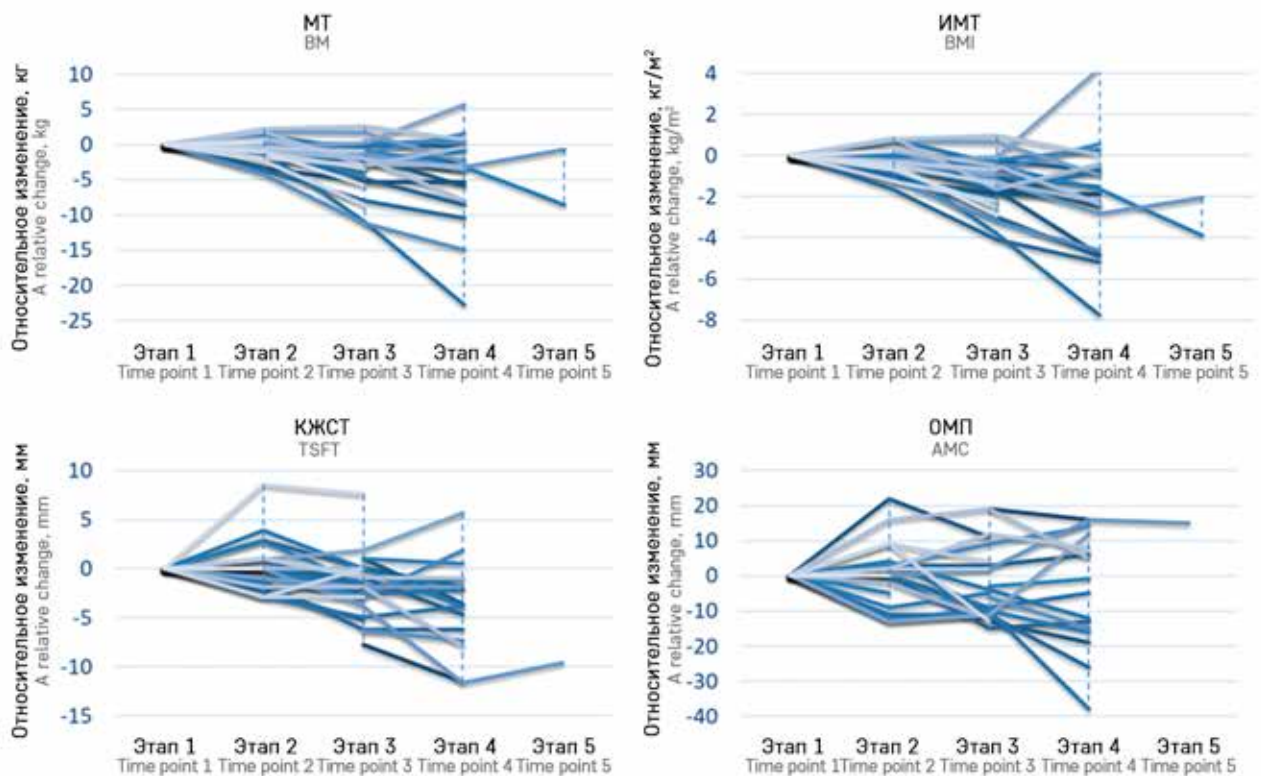


Рисунок 4

Индивидуальные изменения ТМТ, ЖМТ, %ЖМТ и фазового угла обследованных по данным биоимпедансных измерений

Figure 4

Individual changes in bioimpedance estimates of FFM, FM, %BF, and phase angle

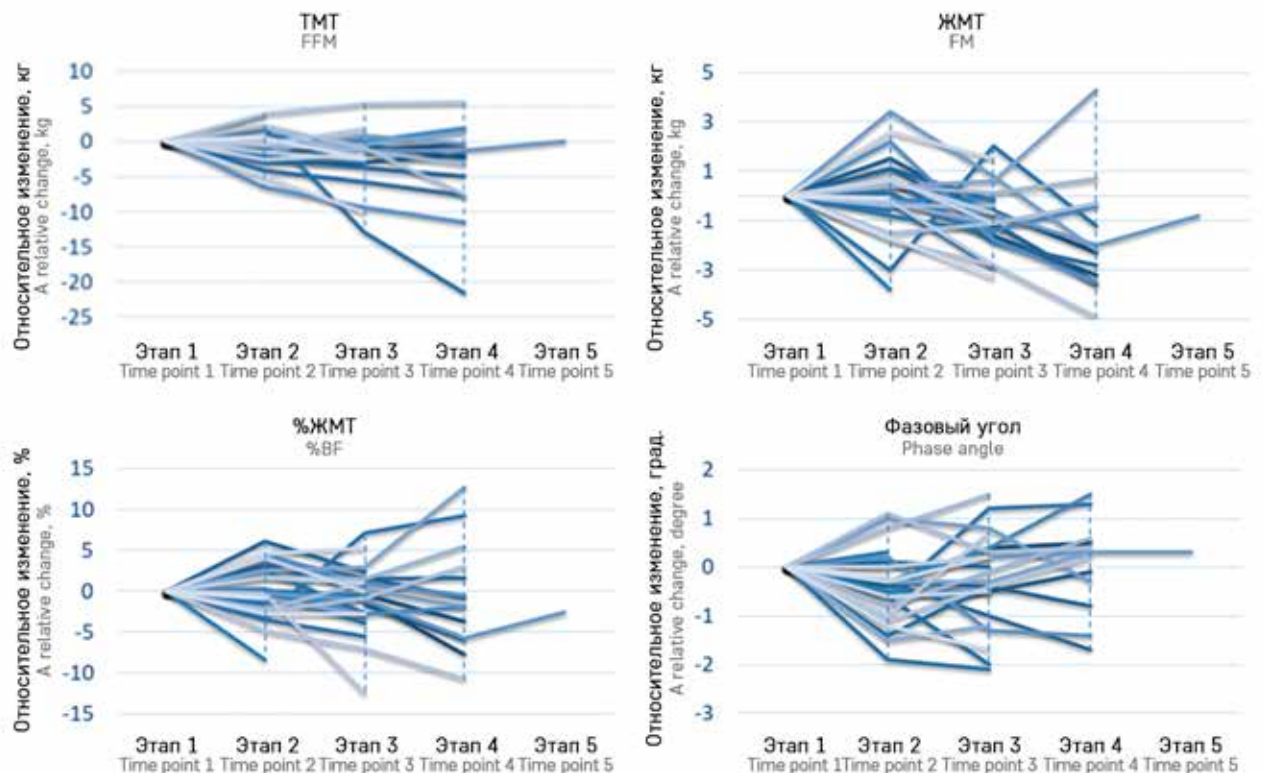
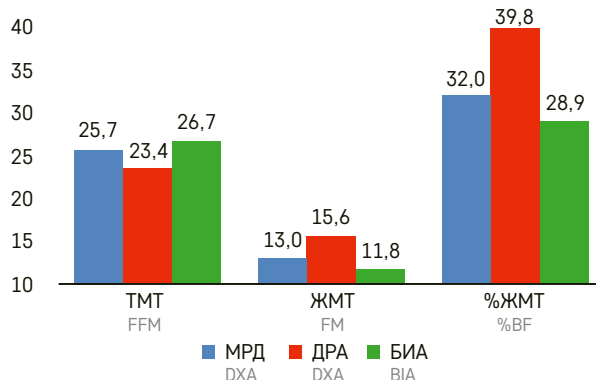


Рисунок 5

Сравнение оценок ТМТ, ЖМТ и %ЖМТ, полученных методами МРД, ДРА и БИА ($n = 7$, 11 измерений, проведенных 3 методами за 1 этап)

Figure 5

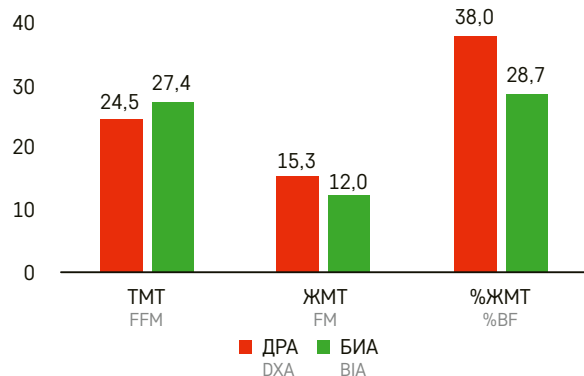
A comparison of FFM, FM, and %BF estimated by the DDM, DXA, and BIA ($n = 7$, a total of 11 measurements obtained simultaneously using three different methods)

**Рисунок 6**

Сравнение оценок ТМТ, ЖМТ и %ЖМТ, полученных методами ДРА и БИА ($n = 17$, всего 22 измерения, проведенных 2 методами за 1 этап)

Figure 6

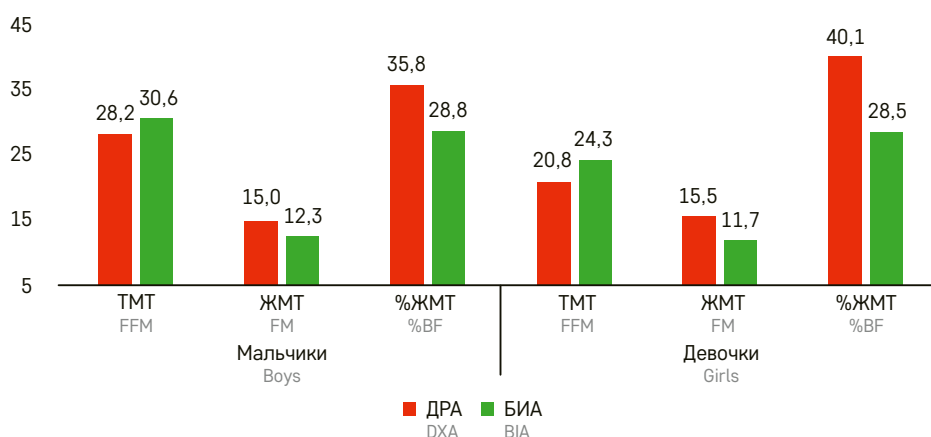
A comparison of FFM, FM, and %BF estimated by DXA and BIA ($n = 17$, a total of 22 measurements obtained simultaneously by two methods)

**Рисунок 7**

Половое различие оценок ТМТ, ЖМТ и %ЖМТ, полученных методами ДРА и БИА ($n = 17$, всего 11 парных измерений мальчиков и 11 парных измерений девочек)

Figure 7

Sex difference between FFM, FM, and %BF measured by DXA and BIA ($n = 17$, 11 measurements obtained simultaneously by two different methods in boys and 11 measurements obtained simultaneously by two different methods in girls)

**Рисунок 8**

Различие оценок ТМТ, ЖМТ и %ЖМТ, полученных методами ДРА и БИА, на разных этапах измерений ($n = 17$, всего 16 парных измерений на этапе 1 и 6 парных измерений на этапах 4 и 5)

Figure 8

Difference in FFM, FM, and %BF measured by DXA and BIA at different time points ($n = 17$, 16 measurements obtained simultaneously by 2 different methods at time point 1 and 6 measurements obtained simultaneously by 2 different methods at time points 4 and 5)

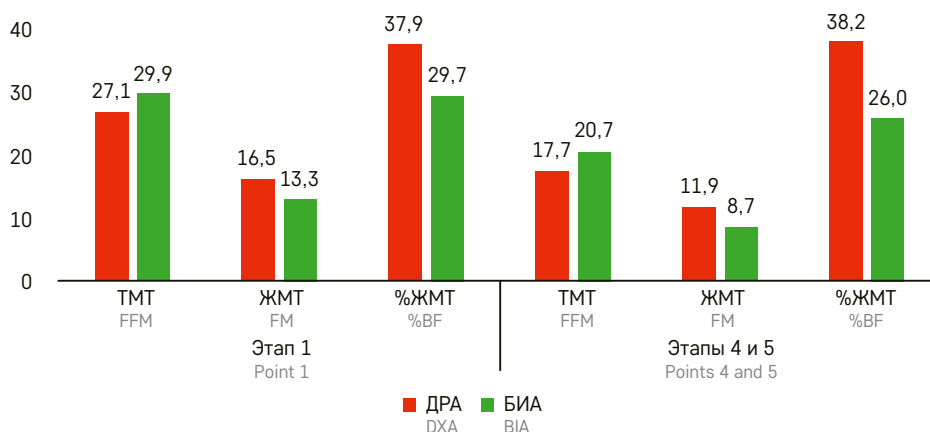


Таблица 2

Индивидуальные изменения параметров состава тела при оценке различными методами

Tables 2

Individual changes in the parameters of body composition measured by different techniques

	Изменение ТМТ, кг Change in FFM, kg			Изменение ЖМТ, кг Change in FM, kg			Изменение %ЖМТ Change in %BF		
	МРД DDM	ДРА DXA	БИА BIA	МРД DDM	ДРА DXA	БИА BIA	МРД DDM	ДРА DXA	БИА BIA
Пациент 23, этапы 1–4 Patient 23, time points 1–4	2,5	–0,5	–1,3	–5,8	–2,8	–2,0	–21,6	–6,3	–5,8
Пациент 25, этапы 1–4 Patient 25, time points 1–4	0,4	–1,3	–0,3	–3,6	–2,9	–2,2	–3,4	–1,4	–1,9
Пациент 30, этапы 1–4 Patient 30, time points 1–4	–3,7	–1,8	–3,3	0,5	–1,0	0,7	5,4	–0,2	5,5
Пациент 23, этапы 4–5 Patient 23, time points 4–5	–1,2	0,7	1,3	3,7	1,5	1,2	13,9	2,9	3,2
Среднее значение Mean value	–0,5	–0,7	–0,9	–1,3	–1,3	–0,6	–1,4	–1,3	0,3

Примечание. Пациент 23 – девочка 6 лет с ОЛЛ, эндомезоморфный тип телосложения, избыточный вес. Пациент 25 – девочка 14 лет с ОЛЛ, мезомезоморфный тип телосложения, избыточный вес. Пациент 30 – девочка 7 лет с ОЛЛ, эндомезоморфный (на этапе 1) и центральный (на этапе 4) тип телосложения, нормальный вес.

Note. Patient 23 is a 6-year-old girl with ALL, with an endo-mesomorph body type, overweight. Patient 25 is a 14-year-old with ALL, with a meso-endomorph body type, overweight. Patient 30 is a 7-year-old girl with ALL, with an endo-mesomorph body type at time point 1 and a central body type at time point 4, normal weight.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

В настоящей работе представлены первые результаты апробации МРД у детей с онкологическими заболеваниями на этапе ТГСК в проспективном обсервационном исследовании. В России данный метод оценки состава тела применяется впервые. Исследования состава тела в онкопедиатрии актуальны по целому ряду причин: высокая частота нарушений нутритивного статуса и его тесная связь с прогнозами, относительная нестабильность тканевого состава тела и баланса жидкости – все перечисленное диктует необходимость не только детального изучения таких изменений, но и определения методов или их комплекса, способных с возможно меньшей погрешностью выявить эти изменения. Важно отметить, что имеющиеся референсы показателей получены в здоровых популяциях и могут терять свою «нормативность» в условиях болезни и длительного токсичного противоопухолевого лечения.

В нашем исследовании перед проведением ТГСК 17 (48,6%) из 35 пациентов согласно классификации ВОЗ имели избыточный вес или ожирение и только 2 (5,7%) из 35 – пониженный вес, что соответствует общим представлениям об адекватном состоянии питания пациентов перед ТГСК [12]. Вместе с тем по данным БИА у 11 из 18 пациентов с нормальным или недостаточным весом наблюдалось повышенное или высокое жиротложение (рисунк 2), что может указывать на нарушение баланса ТМТ и ЖМТ и повышенную вероятность наличия у них катаболических изменений. На этом фоне в первые 100 дней после ТГСК (между этапами 1–4) наблюдалось резкое снижение средних значений МТ и ИМТ за счет уменьшения ТМТ и в меньшей степени ЖМТ (все указанные изменения были статистически значимы), что указывает на прогрессирование катаболических изменений в рассматриваемой группе пациентов и соответствует

данным зарубежных исследований по оценке изменений МТ и состава тела в раннем периоде после ТГСК у детей [35, 36]. Результаты длительного мониторинга нутритивного статуса свидетельствуют о сохранении более низких значений индекса ТМТ в сравнении с общей популяцией у детей на протяжении последующих 4–6 лет и более после ТГСК [12], а также сниженных значений ИМТ и ТМТ [11]. По данным М. Yan и соавт. [36], снижение веса более чем на 5% в раннем периоде после ТГСК было ассоциировано с увеличением срока госпитализации из-за осложнений, более высокой частотой перевода в отделение интенсивной терапии и более низкой общей выживаемостью за год. В нашем исследовании снижение МТ более чем на 5% в раннем периоде после ТГСК наблюдалось у 16 из 23 пациентов. Вместе с тем индивидуальная динамика антропометрических показателей и параметров состава тела могла отличаться от наблюдаемой общей тенденции (рисунки 3, 4). В работе K.J. Skaarud и соавт. [37], посвященной исследованию возможностей оптимизации режимов нутритивной поддержки у детей после ТГСК, было высказано предположение, что в ряде случаев отсутствие отрицательной динамики МТ или даже набор веса могут объясняться задержкой жидкости в организме и служить индикатором осложнений. Аналогичные по направленности и амплитуде значимые изменения МТ, ИМТ, ТМТ и ЖМТ наблюдаются в раннем периоде после ТГСК у взрослых пациентов [10].

При сравнении оценок состава тела, полученных с использованием МРД, ДРА и БИА, наименьшие (при отсутствии значимых различий), но разнонаправленные в зависимости от пола расхождения наблюдались между результатами МРД и БИА. В то же время оценки ТМТ методом ДРА были значимо ниже, а ЖМТ и %ЖМТ – значимо выше, чем на основе МРД и БИА. В этой связи можно отметить, что коэффициенты формулы Хауткупер, используемой в программном

Таблица 3
Характеристика объемов продленной парентеральной инфузионной терапии пациентов, прошедших однократное обследование с использованием МРД, ДРА и БИА (мл/кг/сут; среднее значение (стандартное отклонение))

Tables 3
The amounts of extended parenteral nutrition (mL/kg/day; presented as the mean (standard deviation)) in the patients who underwent simultaneous measurements by the DDM, DXA, and BIA

Код пациента Patient code	Анализируемые интервалы Analyzed time intervals			
	От начала 1-го до 2-го интервала, 30 дней From time point 1 to time point 2, 30 days	От начала 2-го до 3-го интервала, 32 дня From time point 2 to time point 3, 32 days	От начала 3-го до 4-го интервала, 70 дней From time point 3 to time point 4, 70 days	От начала 4-го до 5-го интервала, 180 дней From time point 4 to time point 5, 180 days
19	41,85 (39,43)	60,23 (19,99)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)
22	15,36 (26,38)	27,38 (9,12)	11,07 (13,10)	22,72 (8,46)
23	26,52 (41,17)	45,52 (18,64)	4,52 (10,90)	0,0 (0,0)
25	29,55 (24,24)	26,38 (14,26)	21,44 (13,09)	16,41 (10,06)
30	10,43 (20,47)	60,36 (19,95)	16,42 (10,01)	0,0 (0,0)
31	52,05 (29,44)	53,96 (25,11)	37,44 (12,35)	35,83 (18,53)
39	18,93 (32,26)	26,22 (18,51)	2,03 (4,63)	–

обеспечении биоимпедансного анализатора ABC-01 «Медасс» для оценки ТМТ, были получены путем настройки на результаты применения трехкомпонентной модели состава тела для условно здоровых детей, одним из двух эталонных методов в которой наряду с гидроденситометрией являлся МРД [31]. Оценки ТМТ на основе МРД в настоящем исследовании согласно используемому алгоритму [38] были получены путем деления СВО на зависящий от возраста и пола нормальный коэффициент гидратации ТМТ [30]. В связи с этим согласованность данных МРД и БИА вопросов не вызывает. С другой стороны, можно предположить, что различия результатов оценки ТМТ на основе МРД и ДРА связаны с нарушением водного баланса в рассматриваемой группе пациентов, так как при увеличении коэффициента гидратации оценка ТМТ на основе МРД будет получаться ближе к таковой (более низкой), полученной на основе ДРА. В нашем исследовании средний коэффициент нормальной гидратации ТМТ был равен 0,761, а совпадение средних значений оценок ТМТ на основе МРД и ДРА согласно расчету получается при значении коэффициента гидратации порядка 0,835. Вероятно, для оценки ТМТ на основе МРД у детей в раннем периоде после ТГСК целесообразно использовать иные, более высокие, коэффициенты гидратации, нежели те, которые рассчитаны для условно здоровых детей. Вместе с тем, как отмечается в ряде работ, результаты ДРА могут также зависеть от состояния кровоснабжения и величины гидратации тканей [26, 28]. Вопрос об интерпретации наблюдаемых различий между результатами оценки параметров состава тела на основе МРД и ДРА требует дальнейшего изучения. Отметим, что все пациенты на этапе исследования, предшествовавшем ТГСК, а также на раннем этапе после ТГСК (до начала 3-го этапа исследования, +30 дней от ТГСК) получали интенсивную инфузионную нагрузку

(в рамках сопутствующей терапии), что повышало вероятность нарушения гидратации. На более поздних этапах исследования инфузионная нагрузка заметно снижалась для большинства пациентов, а часть из них вовсе не получали продленную инфузию парентеральных растворов в эти периоды (таблица 3). Вместе с тем, как отмечалось выше, ДРА как метод оценки состава тела имеет определенные ограничения и при некоторых условиях может давать смещенные оценки ТМТ и ЖМТ [25, 27, 28]. «Золотым стандартом» оценки ТМТ и ЖМТ являются четырехкомпонентные модели состава тела, которые в настоящем исследовании были недоступны.

В связи со спецификой рассматриваемой группы пациентов (организационная доступность, наличие осложнений и др.) планируемые в соответствии с протоколом измерения на этапах обследования были выполнены не в полном объеме. Кроме того, в редких случаях измерения на этапах обследования были проведены асинхронно (в соседние дни), что могло повлиять на результат парных сравнений.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в рассматриваемой группе детей с онкологическими заболеваниями на этапе ТГСК выявлено более тесное соответствие средних значений оценок состава тела на основе МРД и БИА, в то время как оценки состава тела на основе МРД и ДРА значительно различались, что может объясняться увеличением гидратации ТМТ. Полученные начальные данные свидетельствуют о согласованности МРД, ДРА и БИА при оценке изменений ТМТ, ЖМТ и %ЖМТ на групповом, но не индивидуальном уровне. Для уточнения этих результатов и сравнения клинической значимости рассмотренных методов оценки состава тела у детей с онкологическими заболеваниями на этапе ТГСК необходимо увеличение размера выборки.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана грантом Международного агентства по атомной энергии (МАГАТЭ), проект CRP E43033.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

ORCID

Alymova Yu.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0949-6383>

Vashura A.Yu. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4296-3345>

Efimova A.I. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3575-4481>

Rudnev S.G. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5437-8429>

Senyavin V.M. ORCID: <https://orcid.org/0009-0001-4228-6903>

Литература / References

- Murphy A.J., White M., Davies P.S.V. The validity of simple methods to detect poor nutritional status in paediatric oncology patients. *Br J Nutr* 2009; 101 (9): 1388–92. DOI: 10.1017/S0007114508076241
- Orgel E., Sposto R., Malvar J., Seibel N.L., Ladas E., Gaynon P.S., Freyer D.R. Impact on survival and toxicity by duration of weight extremes during treatment for pediatric acute lymphoblastic leukemia: a report from the Children's Oncology Group. *J Clin Oncol* 2014; 32 (13): 1331–7. DOI: 10.1200/JCO.2013.52.6962
- Brinksma A., Sanderman R., Roodbol P.F., Sulkers E., Burgerhof J.G., de Bont E.S., Tissing W.J.E. Malnutrition is associated with worse health-related quality of life in children with cancer. *Support Care Cancer* 2015; 23 (10): 3043–52. DOI: 10.1007/s00520-015-2674-0
- Алымова Ю.А., Вашура А.Ю. Адекватная оценка нутритивного статуса в детской онкологии и гематологии – первый этап нутритивного сопровождения. *Трудный пациент* 2019; 17 (8–9): 54–9. DOI: 10.24411/2074-1995-2019-10065 [Alymova Yu.A., Vashura A.Yu. Adequate assessment of nutritional status in pediatric oncology and hematology – the first stage of nutritional support. *Trudnyj pacient* 2019; 17 (8–9): 54–9. (In Russ.)].
- Armstrong G.T., Stovall M., Robinson L.L. Long-term effects of radiation exposure among adult survivors of childhood cancer: results from the childhood cancer survivor study. *Radiat Res* 2010; 174 (6): 840–50. DOI: 10.1667/RR1903.1
- Fuemmeler B.F., Pendzich M.K., Clark K., Lovelady C., Rosoff P., Blatt J., Demark-Wahnefried W. Diet, physical activity, and body composition changes during the first year of treatment for childhood acute leukemia and lymphoma. *J Pediatr Hematol Oncol* 2013; 35 (6): 437–43. DOI: 10.1097/MPH.0b013e318279cd3e
- Вашура А.Ю., Рябова А.А., Касаткин В.Н., Карелин А.Ф., Румянцев А.Г. Результаты оценки моторной функции и нутритивного статуса у детей с опухолями ЦНС, находящихся в ремиссии. *Вестник восстановительной медицины* 2017; 6 (82): 68–74. [Vashura A.Yu., Ryabova A.A., Kasatkin V.N., Rummyantsev A.G. Results of assessment of motor function and nutritional status in children with CNS tumors in remission. *Bulletin of Rehabilitation Medicine* 2017; 6 (82): 68–74. (In Russ.)].
- Duarte R.F., Labopin M., Bader P., Basak G.W., Bonini C., Chabannon C., et al. Indications for haematopoietic stem cell transplantation for haematological diseases, solid tumours and immune disorders: current practice in Europe, 2019. *Bone Marrow Transplant* 2019; 54 (10): 1525–52. DOI: 10.1038/s41409-019-0516-2
- Масчан М.А., Скоробогатова Е.В., Шелихова Л.Н., Балашов Д.Н., Благоданова О.Л., Долгополов И.С., и др. Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток у детей в России: краткий обзор активности в 2015–2018 гг. *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии* 2020; 19 (2): 22–9. DOI: 10.24287/1726-1708-2020-19-2-22-29 [Maschan M.A., Skorobogatova E.V., Shelikhova L.N., Balashov D.N., Blagodarova O.L., Dolgoplov I.S., et al. Hematopoietic stem cell transplantation in children in Russia: a brief overview of activity in 2015–2018. *Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology* 2020; 19 (2): 22–9. (In Russ.)].
- Urbain P., Birlinger J., Lambert C., Finke J., Bertz H., Biesalski H.K. Longitudinal follow-up of nutritional status and its influencing factors in adults undergoing allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2013; 48 (3): 446–51. DOI: 10.1038/bmt.2012.158
- Inaba H., Yang J., Kaste S.C., Hartford C.M., Motosue M.S., Chemaitilly W., et al. Longitudinal changes in body mass and composition in survivors of childhood hematologic malignancies after allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation. *J Clin Oncol* 2012; 30 (32): 3991–7. DOI: 10.1200/JCO.2011.40.0457
- Kyle U.G., Chalandon Y., Miralbell R., Karsgaard V.L., Hans D., Trombetti A., et al. Longitudinal follow-up of body composition in hematopoietic stem cell transplant patients. *Bone Marrow Transplant* 2005; 35 (12): 1171–7. DOI: 10.1038/sj.bmt.1704996
- Joffe L., Ladas E.J. Nutrition during childhood cancer treatment: current understanding and a path for future research. *Lancet Child Adolesc Health* 2020; 4 (6): 465–75. DOI: 10.1016/S2352-4642(19)30407-9
- Kyle U.G., Bosaeus I., De Lorenzo A.D., Deurenberg P., Elia M., Manuel Gómez J., et al. Bioelectrical impedance analysis-part II: utilization in clinical practice. *Clin Nutr* 2004; 23 (6): 1430–53. DOI: 10.1016/j.clnu.2004.09.012
- Цейтлин Г.Я., Вашура А.Ю., Коновалова М.В., Балашов Д.Н., Масчан М.А., Бельмер С.В. Значение биоимпедансного анализа и антропометрии для прогнозирования осложнений у детей с онкологическими и неонкологическими заболеваниями после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток. *Онкогематология* 2013; 3 (8): 50–6. [Tseytlin G.Ya., Vashura A.Yu., Konovalova M.V., Balashov D.N., Maschan M.A., Belmer S.V. Value of bioimpedance analysis and anthropometry for complication prediction in children with malignant and non-malignant diseases after hematopoietic stem cells transplantation. *Oncohematology* 2013; 8 (3): 48–54. (In Russ.)].
- Баранов А.А., Намазова-Баранова Л.С., Беляева И.А., Скворцова В.А., Турти Т.В., Тарзян Э.О. Оценка нутритивного статуса

- недоношенных детей методом воздушной плетизмографии: первое российское проспективное наблюдение. Вестник РАМН 2013; 68 (4): 10–6. DOI: 10.15690/vramn.v68i4.605 [Baranov A.A., Namazova-Baranova L.S., Belyaeva I.A., Skvortsova V.A., Turti T.V., Tarzyan E.O. Evaluation of premature infants nutritional status by air plethysmography: first Russian prospective study. Annals of the Russian academy of medical sciences 2013; 68 (4): 10–6. (In Russ.)].
17. Brouwer C.A.J., Gietema J.A., Kamps W.A., de Vries E.G.E., Postma A. Changes in body composition after childhood cancer treatment: impact on future health status – a review. Crit Rev Oncol Hematol 2007; 63 (1): 32–46. DOI: 10.1016/j.critrevonc.2007.01.007
 18. Murphy-Alford A., Prasad M., Slone J., Stein K., Mosby T.T. Perspective: creating the evidence base for nutritional support in childhood cancer in low- and middle-income countries: priorities for body composition research. Adv Nutr 2020; 11 (2): 216–23. DOI: 10.1093/advances/nmz095
 19. Davies P.S.W. Stable isotopes: their use and safety in human nutrition studies. Eur J Clin Nutr 2020; 74 (3): 362–5. DOI: 10.1038/s41430-020-0580-0
 20. Kourkumelis N., Grujic V.R., Grabez M., Vidic A., Siksnal I., Lazda I., et al. New bioelectrical impedance analysis equations for children and adolescents based on the deuterium dilution technique. Clin Nutr ESPEN 2021; 44: 402–9. DOI: 10.1016/j.clnesp.2021.05.001
 21. Näsänen-Gilmore P., Kumwenda C., Nurhonen M., Hallamaa L., Mangani C., Ashom P., et al. Body composition among Malawian young adolescents: cross-validating predictive equations for bioelectric impedance analysis using deuterium dilution method. PLoS One 2023; 18 (4): e0284158. DOI: 10.1371/journal.pone.0284158
 22. Marra N., Sammarco R., De Lorenzo A., Iellamo F., Siervo M., Pietrobello A., et al. Assessment of body composition in health and disease using bioelectrical impedance analysis (BIA) and dual energy X-ray absorptiometry (DXA): a critical overview. Contrast Media Mol Imaging 2019; 2019: 3548284. DOI: 10.1155/2019/3548284
 23. Messina M., Albano D., Gitto S., Tofanelli L., Bazzocchi A., Olivieri F.M., et al. Body composition with dual energy X-ray absorptiometry: from basics to new tools. Quant Imaging Med Surg 2020; 10 (8): 1687–98. DOI: 10.21037/qims.2020.03.02
 24. Wosje K.S., Knipstein B.L., Kalkwarf H.J. Measurement error of DXA: interpretation of fat and lean mass changes in obese and non-obese children. J Clin Densitom 2006; 9 (3): 335–40. DOI: 10.1016/j.jocd.2006.03.016
 25. Toombs R.J., Ducher G., Shepherd J.A., De Sousa M.J. The impact of recent technological advances on the trueness and precision of DXA to assess body composition. Obesity (Silver Spring) 2012; 20 (1): 30–9. DOI: 10.1038/oby.2011.211
 26. Bosy-Westphal A., Müller M.J. Measuring the impact of weight cycling on body composition: a methodological challenge. Curr Opin Clin Nutr Metab Care 2014; 17 (5): 396–400. DOI: 10.1097/MCO.0000000000000092
 27. Kuriyan R., Thomas T., Ashok S., Jayakumar J., Kurpad A.V. A 4-compartment model based validation of air displacement plethysmography, dual energy X-ray absorptiometry, skinfold technique and bio-electrical impedance for measuring body fat in Indian adults. Indian J Med Res 2014; 139 (5): 700–7.
 28. Chaves L.G.C.M., Gonçalves T.J.M., Bitencourt A.G.V., Rstom R.A., Pereira T.R., Velludo S.F. Assessment of body composition by whole-body densitometry: what radiologists should know. Radiol Bras 2022; 55 (5): 305–11. DOI: 10.1590/0100-3984.2021.0155-en
 29. International Atomic Energy Agency. 2023. Applying nuclear nutrition techniques to improve outcomes for childhood cancer in low and middle income countries. [Electronic resource] URL: <https://www.iaea.org/projects/crp/e43033> (accessed 23.04.2024).
 30. Lohman T.G. Estimating body composition in children and the elderly. In: Lohman T.G. (ed.) Advances in Body Composition Assessment, Current Issues in Exercise Science, Monograph 3. Champaign, IL: Human Kinetics; 1992. Pp. 65–77.
 31. Houtkooper L.B. Assessment of body composition in youths and relationship to sport. Int J Sport Nutr 1996; 6 (2): 146–64. DOI: 10.1123/ijsn.6.2.146
 32. Carter J.E.L., Heath B.H. Somatotyping: development and applications. Cambridge: Cambridge University Press; 1990. 517 p.
 33. World Health Organisation. 2023. Growth reference data for 5–19 years. [Electronic resource] URL: <https://www.who.int/tools/growth-reference-data-for-5to19-years> (accessed 23.04.2024).
 34. Nikolaev D.V., Rudnev S.G., Starunova O.A., Eryukova T.A., Kolesnikov V.A., Ponomareva E.G., et al. Percentile curves for body fatness and cut-offs to define malnutrition in Russians. J Phys: Conf Ser 2013; 434 (1): 012063. DOI: 10.1088/1742-6596/434/1/012063
 35. Feng Y., Pan L.-Y., Chang P.P., Zhang B.H., Hong L. Changes in body composition in children with acute graft-versus-host disease within the first 100 days after hematopoietic stem cell transplantation. Eur J Clin Nutr 2018; 72 (8): 1167–75. DOI: 10.1038/s41430-017-0057-y
 36. Yan M., Pan J., Huang J., Liu C., Xia X., Zhu T., et al. Weight loss in children undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation within the first 100 days: its influencing factors and impact on clinical outcomes. Front Nutr 2023; 9: 974389. DOI: 10.3389/fnut.2022.974389
 37. Skaarud K.J., Veierød M.B., Lergenmuller S., Bye A., Iversen P.O., Tjønnfjord G.E. Body weight, body composition and survival after 1 year: follow-up of a nutritional intervention trial in allo-HSCT recipients. Bone Marrow Transplant 2019; 54 (12): 2102–9. DOI: 10.1038/s41409-019-0638-6
 38. International Atomic Energy Agency. Introduction to body composition assessment using the deuterium dilution technique with analysis of saliva samples by Fourier transform infrared spectrometry. IAEA Human Health Series, No. 12. Vienna: International Atomic Energy Agency; 2010. 96 p.

© 2024 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ
им. Дмитрия Рогачева»
Минздрава России
Поступила 04.03.2024
Принята к печати 08.04.2024



EDN: BMXODW

DOI: 10.24287/1726-1708-2024-23-2-90-97

Эндоскопические критерии повреждения слизистой оболочки толстой кишки у детей с подозрением на острую реакцию «трансплантат против хозяина» после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток

Т.С. Шубина¹, Д.Н. Балашов¹, М.М. Лохматов^{2,3}, И.В. Захаров¹, Д.С. Абрамов¹, Д.Г. Ахаладзе¹

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, Москва

²ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Минздрава России, Москва

³ФГАУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва

Контактная информация:

Шубина Татьяна Сергеевна,
врач-эндоскопист отдела эндоскопии
и отделения онкологии и детской хирургии
ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева»
Минздрава России
Адрес: 117997, Москва,
ул. Саморы Машела, 1
E-mail: tatya25@bk.ru

В настоящее время результаты использования аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК) являются весьма обнадеживающими, но, несмотря на это, у 25–75% пациентов развиваются осложнения и в 10–19% случаев наступает смертельный исход. Среди осложнений алло-ТГСК особое место занимают реакция «трансплантат против хозяина» (РТПХ) и вирусные инфекции. Диагностика интестинальной формы РТПХ остается сложной проблемой. Неправильная трактовка поражения желудочно-кишечного тракта чревата тяжелыми последствиями. Особое внимание в зарубежной литературе уделяется разработке эндоскопических критериев диагностики РТПХ. В исследование включены 33 пациента в возрасте 1–17 лет после алло-ТГСК, трансплантированных в период с 2020 по 2023 г. в ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, с клиникой энтероколита и подозрением на изолированное течение интестинальной формы РТПХ. Исследование одобрено независимым этическим комитетом и утверждено решением ученого совета НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева. Всем обследованным выполнялась колоноскопия в белом свете, в режиме i-scan, при необходимости – хромоэндоскопия, а также биопсия слизистой оболочки толстой кишки для гистопатологической оценки и выявления кишечных инфекций в биоптате. Статистическая обработка данных выполнялась на программном обеспечении IBM SPSS Statistics 23. У 84,8% пациентов в биоптате слизистой оболочки толстой кишки обнаружены вирусы. Преобладающими патогенами были вирус герпеса человека 6-го типа (50%), норовирус (46,4%) и аденовирус (35,7%). Высокая частота вирусного поражения толстой кишки у детей с РТПХ, вероятно, объясняется реактивацией вирусной инфекции после алло-ТГСК на фоне активной иммуносупрессивной терапии. У 78,8% пациентов с РТПХ выявлены изменения по типу «апельсиновой корки», что позволяет рассматривать данный критерий как основной при эндоскопической диагностике РТПХ у детей после алло-ТГСК вне зависимости от наличия или отсутствия вирусных инфекций. Данное исследование продемонстрировало достаточно высокую эффективность технологии улучшения визуализации методом хромоэндоскопии. Исследования по совершенствованию методов дифференциальной диагностики РТПХ необходимо продолжать.

Ключевые слова: эндоскопия, аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток, реакция «трансплантат против хозяина», диагностика

Шубина Т.С. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2024; 23 (2): 90–97.
DOI: 10.24287/1726-1708-2024-23-2-90-97

Endoscopic criteria for colonic mucosal damage in children with suspected acute graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation

T.S. Shubina¹, D.N. Balashov¹, M.M. Lokhmatov^{2,3}, I.V. Zakharov¹, D.S. Abramov¹, D.G. Akhaladze¹

¹The Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology of Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow

²National Medical Research Center for Children's Health of Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow

³The I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of Ministry of Healthcare of the Russian Federation (the Sechenov University), Moscow

© 2024 by «D. Rogachev NMRCPOI»

Received 04.03.2024

Accepted 08.04.2024

Today, results of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT) are very encouraging but nevertheless, 25–75% of patients still develop complications, and mortality rates reach as high as 10–19%. Two major complications of allo-HSCT are graft-versus-host disease (GVHD) and viral infections. The diagnosis of intestinal GVHD remains a challenge. Incorrect interpretation of gastrointestinal lesions may lead to grave consequences. The development of endoscopic criteria for GVHD is a major focal point in foreign literature. In our study, we included 33 patients aged 1–17 years with signs of enterocolitis and suspected isolated intestinal GVHD who had received allo-HSCT at the Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology of Ministry of Healthcare of Russia between 2020 and 2023. The study was approved by the Independent Ethics Committee and the Scientific Council of the Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology of Ministry of Healthcare of Russia. All the patients underwent white-light colonoscopy with i-scan and, if necessary, chromoendoscopy; as well as colonic mucosal biopsy for further histopathological evaluation and intestinal infection testing. Statistical analysis was performed using the IBM SPSS Statistics 23 software. Viruses were identified in the colonic mucosal samples of 84.8% of the patients. The most common pathogens were: HHV-6 (in 50% of the cases), norovirus (46.4%) and adenovirus (35.7%). The high incidence of colonic viral infections in the children with GVHD is likely the result of virus reactivation during intensive immunosuppressive therapy following allo-HSCT. In 78.8% of the study patients, the colonic mucosa had orange-peel appearance, which led us to consider such mucosal changes to be the main criterion for the endoscopic diagnosis of GVHD in children after allo-HSCT, regardless of the presence or absence of viral infections. Our study demonstrated a fairly high effectiveness of the chromoendoscopy advanced imaging technology. Further research on ways to improve methods for GVHD differential diagnosis is required.

Key words: *endoscopy, allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, graft-versus-host disease, diagnosis*

Shubina T.S., et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology 2024; 23 (2): 90–97.
DOI: 10.24287/1726-1708-2024-23-2-90-97

Аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК) – это метод клеточной терапии большой группы заболеваний у детей, в том числе злокачественных новообразований, солидных опухолей, гемоглобинопатий, первичных иммунодефицитов и др. [1–7]. Несмотря на значительные успехи в проведении алло-ТГСК, основными ограничениями метода считаются значительная частота осложнений – 25–75% и высокая смертность, достигающая 10–19% [8, 9]. Среди широкого спектра осложнений алло-ТГСК особое место занимают реакция «трансплантат против хозяина» (РТПХ) и вирусные инфекции. Основными «мишенями» для острой РТПХ являются кожа, печень и желудочно-кишечный тракт (ЖКТ) [10, 11].

При наличии у пациента изолированного поражения нижних отделов ЖКТ установление правильного диагноза остается сложной проблемой, учитывая неспецифичность клинических проявлений, так как энтероколит и гемоколит после алло-ТГСК могут быть ассоциированы не только с развитием РТПХ, но и с инфекционным процессом, в первую очередь вирусным [12, 13]. После алло-ТГСК может возникнуть реактивация вируса Эпштейна–Барр (ВЭБ), цитомегаловируса (ЦМВ), вируса герпеса человека 6-го типа (HHV-6), аденовируса [14]. Неправильная трактовка поражения ЖКТ чревата тяжелыми последствиями.

Адекватная интерпретация эндоскопических данных позволяет правильно верифицировать поражение для своевременного начала терапии. Для улучшения качества эндоскопического изображения в настоящее время используется ряд оптических технологий, включающих хромоэндоскопию, режимы i-scan, автофлуоресценцию (autofluorescence imaging) и др., которые пришли на смену ранее существовавшей сложной в исполнении окраске слизистой оболочки [15]. Учитывая новейшие достижения в эндоскопических технологиях, в ряде зарубежных исследований появились данные о разработке эндо-

скопических критериев диагностики РТПХ после алло-ТГСК у взрослых пациентов [11, 16].

В данной публикации приведены результаты ретроспективного исследования, целью которого явилось определение характерных эндоскопических критериев поражения слизистой оболочки толстой кишки у детей с РТПХ и сочетанным поражением нижних отделов кишечника с использованием методов улучшения визуализации эндоскопической картины.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследование были включены 33 пациента (возраст – 1–17 лет, медиана – 8 лет) после алло-ТГСК, трансплантированных в период с 2020 по 2023 г. в ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, с клиникой энтероколита и подозрением на изолированное течение интестинальной формы РТПХ, которым проводилось эндоскопическое обследование нижних отделов ЖКТ в целях верификации диагноза. Исследование одобрено независимым этическим комитетом и утверждено решением ученого совета НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева. Показания к проведению ТГСК у пациентов, включенных в исследование, представлены в *таблице 1*.

Перед колоноскопией пациентам проводили диагностику аденовирусной и вирусных инфекций герпетической группы методом полимеразной цепной реакции в крови и посев кала на возбудителей кишечных инфекций.

Всем обследованным выполнялась колоноскопия в белом свете эндоскопами высокого разрешения Pentax (Япония). Во время эндоскопии выявлялись повреждения слизистой оболочки толстой кишки с оценкой степени поражения. На первом этапе исследования осуществлялся осмотр в белом спектре света, далее в режиме i-scan. Пациентам с невыраженными изменениями архитектоники слизистой оболочки толстой кишки ($n = 4$) дополнительно

Correspondence:

Tatyana S. Shubina,
an endoscopist at the Department
of Endoscopy and Department of Oncology
and Pediatric Surgery of the Dmitry Rogachev
National Medical Research Center
of Pediatric Hematology, Oncology
and Immunology of Ministry of Healthcare
of the Russian Federation
Address: 1 Samory Mashela St.,
Moscow 117997, Russia
E-mail: tatya25@bk.ru

была проведена хромоэндоскопия 0,4% раствором индигокармина. У больных, имеющих выраженные воспалительные изменения слизистой оболочки, хромоэндоскопия не использовалась.

Характеристика пациентов, включенных в исследование, представлена в *таблице 2*.

Эндоскопическая диагностика РТПХ основывалась на визуализации следующих критериев, описанных в исследовании К. Endo и соавт. [16]:

а) изменения архитектоники слизистой оболочки, напоминающие апельсиновую корку или панцирь черепахи;

б) очаговая гиперемия;

в) поверхностные дефекты слизистой оболочки;

г) глубокие дефекты слизистой оболочки (*рисунок 1*).

Зернистая поверхность слизистой оболочки на фоне ее отека при РТПХ сопровождалась изменениями по типу «апельсиновой корки». Для выявления данной эндоскопической картины осмотр дополнялся распылением на слизистую оболочку через спрей-катетер 0,4% раствора индигокармина (*рисунок 1А*). Участки гиперемии с нечеткими контурами диаметром от 0,5 до 2 см регистрировались как очаговая гиперемия (*рисунок 1Б*). Поверхностные дефекты слизистой оболочки определялись как небольшие эрозии различной формы с четкой границей (*рисунок 1В*). Глубокие дефекты слизистой оболочки трактовались как крупные язвы неправильной или географической формы (*рисунок 1Г*).

Во время колоноскопии у 33 пациентов выполнялась биопсия слизистой оболочки всех осмотренных отделов кишки для гистопатологической оценки и выявления ДНК семейства герпесвирусов и возбудителей кишечных инфекций методом полимеразной цепной реакции в биоптате. Количество биоптатов у каждого пациента варьировало от 3 до 8. Всего у 33 обследованных произведено 239 биопсий.

Для статистической обработки данных применяли пакет программ IBM SPSS Statistics 23. Для определения нормальности распределения использовали обобщенный тест Д'Агостино–Пирсона. Данные с нормальным распределением представляли в виде среднего значения и стандартного отклонения ($M \pm SD$), для их сравнения использовали t-test. Качественные данные представляли как абсолютное значение (n) и частоту (%), для их сравнения использовали точный тест Фишера. Результаты считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изменения слизистой оболочки по типу «апельсиновой корки» были выявлены у большинства пациентов – у 26 (78,8%) из 33, очаговая гиперемия – у 18

Таблица 1

Показания к проведению ТГСК у пациентов, включенных в исследование ($n = 33$)

Tables 1

Indications for hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) in the enrolled patients ($n = 33$)

Показания к проведению ТГСК Indications for HSCT	Число пациентов, n (%) Number of patients, n (%)
Злокачественные новообразования Malignancy	
Острый лимфобластный лейкоз Acute lymphoblastic leukemia	14 (42,4)
Острый миелобластный лейкоз Acute myeloblastic leukemia	7 (21,2)
ВЭБ-позитивная диффузная В-клеточная лимфома EBV-positive diffuse B cell lymphoma	1 (3)
Незлокачественные заболевания Non-malignant disease	
Первичные иммунодефициты Primary immunodeficiencies	7 (21,2)
Синдром костномозговой недостаточности Bone marrow failure syndrome	1 (3)
Конституциональная апластическая анемия Constitutional aplastic anemia	1 (3)
Миелодиспластический синдром Myelodysplastic syndrome	1 (3)
Бета-талассемия Beta thalassemia	1 (3)

Notes. EBV – Epstein–Barr virus.

Таблица 2

Характеристика пациентов, включенных в исследование

Tables 2

Patient characteristics

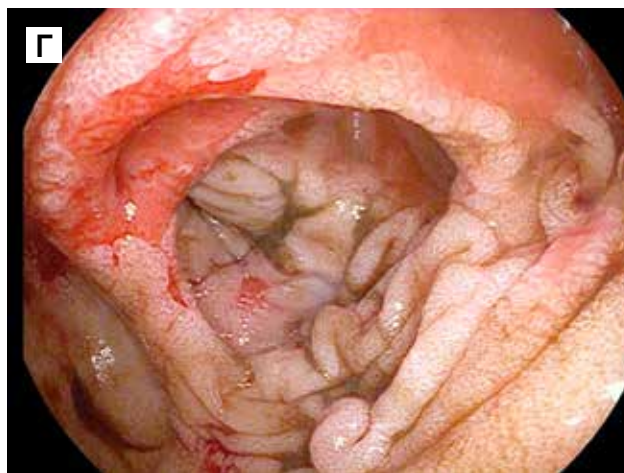
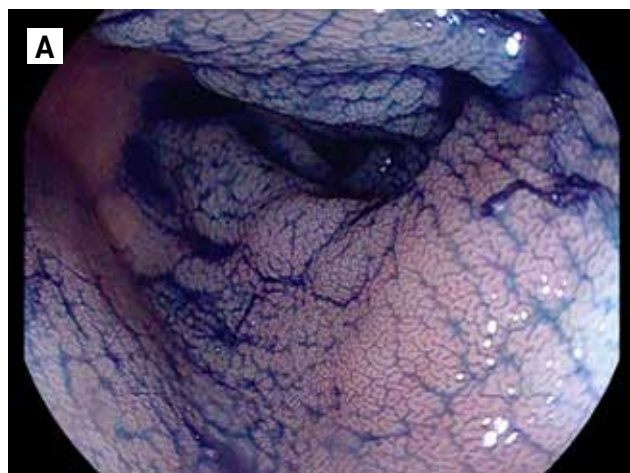
Параметр Parameter	Значение Value
Число пациентов, n Number of patients, n	33
Возраст, годы Age, years	1–17
Пол, n (%): Gender, n (%):	
мужской male	22 (66,7)
женский female	11 (33,3)
Тип донора, n (%): Donor type, n (%):	
гаплоидентичный haploidentical	27 (81,8)
совместимый родственный matched related	2 (6,1)
совместимый неродственный matched unrelated	4 (12,1)
Трансплантат, n (%): Transplant, n (%):	
костный мозг bone marrow	2 (6,1)
периферическая кровь peripheral blood	31 (93,9)
Период от ТГСК, n (%): Time from HSCT, n (%):	
до 30 дней < 30 days	12 (36,4)
от 30 до 100 дней 30 to 100 days	7 (21,2)
более 100 дней > 100 days	11 (33,3)
более 1 года > 1 year	1 (3)
от 1 года до 2 лет 1 to 2 years	2 (6,1)

Рисунок 1

Колоноскопия. Визуализация РТПХ-ассоциированных эндоскопических критериев: А – изменения архитектуры слизистой оболочки по типу «апельсиновой корки» или «панциря черепахи»; Б – очаговая гиперемия; В – поверхностные дефекты слизистой оболочки; Г – глубокие дефекты слизистой оболочки

Figure 1

Colonoscopy. Characteristic endoscopic findings in graft-versus-host disease (GVHD): A – orange-peel or tortoise shell-like changes of the mucosa; Б – spotty redness; В – superficial mucosal lesions; Г – large mucosal defects



(54,5%), глубокие дефекты слизистой оболочки – у 8 (24,2%), поверхностные дефекты слизистой оболочки – у 6 (18,2%).

У 1 (3%) пациента с РТПХ описанных изменений обнаружено не было. Только 1 эндоскопический критерий определялся у 12 (36,4%) детей, одновременно 2 критерия – у 15 (45,5 %), 3 критерия – у 4 (12,1 %). У 1 (3%) ребенка были идентифицированы все 4 критерия.

У 4 детей, у которых проводилась хромоэндоскопия, были выявлены изменения слизистой оболочки по типу «апельсиновой корки», у 2 из них – дополнительный признак в виде очаговой гиперемии.

Совпадение эндоскопического и клинического диагнозов РТПХ при хромоэндоскопии составило 100% (4/4), в режиме i-scan – 90,9% (30/33).

Возможности оптического улучшения изображения проиллюстрированы на *рисунке 2*: осмотр слизистой оболочки толстой кишки в режиме i-scan

(*рисунк 2А*) и после орошения 0,4% раствором индигокармина (*рисунк 2Б*).

В зависимости от наличия или отсутствия признаков вирусного колита в биоптате слизистой оболочки толстой кишки все 33 пациента были разделены на 2 группы. В 1-ю группу включены 5 (15,2 %) больных с РТПХ без вирусного поражения кишки, во 2-ю – 28 (84,8%) детей с колитом смешанного генеза (вирусный и иммунный).

При идентификации вирусов в биоптате у пациентов 2-й группы установлено, что преобладающими патогенами были HHV-6, норовирус и аденовирус, так как выявлены у 14 (50%), 13 (46,4%) и 10 (35,7%) обследованных соответственно (*рисунк 3*), статистически значимых различий между инфицированностью перечисленными возбудителями не было ($p > 0,05$).

Сочетанное поражение слизистой оболочки толстой кишки норовирусом и HHV-6 во 2-й группе пациентов обнаружено в 4 (14,3%) случаях, аденовирусом и HHV-6 – в 10 (35,7%). Вирусная нагрузка при

Рисунок 2

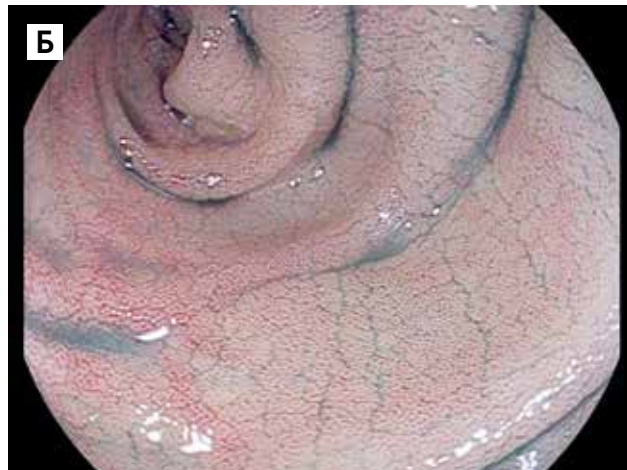
Колоноскопия пациентки К., 12 лет. Диагноз: острая РТПХ II стадии (ЖКТ I-II степени)

Эндоскопические изображения слизистой оболочки толстой кишки: А – в режиме i-scan, слизистая оболочка зернистая за счет отека; Б – после орошения через спрей-катетер 0,4% раствором индигокармина, слизистая оболочка толстой кишки изменена по типу «апельсиновой корки»

Figure 2

Colonoscopy findings of the patient K., 12 y. o. Diagnosis: grade II acute GVHD (stage I-II gastrointestinal GVHD)

Endoscopic images of the colonic mucosa: A – enhancement with the i-scan technology: the mucosa is granular due to edema; Б – after irrigation with a 0.4% solution of indigo carmine (through a spray catheter), the colonic mucosa assumes an orange peel appearance



HHV-6 варьировала от 44 до 52 500 копий/мл в биоптате. Количество выявленных копий вируса не влияло на выраженность повреждения слизистой оболочки.

ДНК ЦМВ была идентифицирована у 5 (17,9%) из 28 детей, у 2 из них ЦМВ сочетался с HHV-6 в крови и биоптате. Также была выявлена ДНК таких кишечных инфекций, как астровирус (2 (7,1%) из 28) и ротавирус (4 (14,3% из 28). ВЭБ не обнаружен ни у одного из пациентов ни в биоптате, ни в крови.

При анализе эндоскопических характеристик нами отмечено, что существенных различий между 1-й и 2-й группами больных не было ($p > 0,05$). Так, изменения по типу «апельсиновой корки» выявлены у 4 (80%) из 5 и 22 (78,57%) из 28 пациентов соответственно ($p = 1,0$), очаговая гиперемия – у 2 (40%) из 5 и 16 (57,14%) из 28 соответственно ($p = 0,6$). Поверхностные и глубокие дефекты слизистой оболочки толстой кишки обнаружены только у детей с комбинированным поражением кишки (2-я группа) – в 21,4% и 28,6% случаев соответственно, однако различия между группами пациентов по частоте дефектов оказались статистически незначимыми ($p > 0,5$).

В данном исследовании нами впервые предпринята попытка выявить патогенетическую роль разных вирусов в возникновении того или иного изменения слизистой оболочки толстой кишки («апельсиновая корка», очаговая гиперемия, дефекты слизистой оболочки). Были отмечены определенные тенденции. Однако зафиксированные различия носили недостоверный характер ($p > 0,05$) по причине небольшой выборки исследования.

При проведении патоморфологического исследования полученных при эндоскопии биоптатов

слизистой оболочки толстой кишки выявлены следующие изменения, частота которых также не различалась между 1-й и 2-й группами: отек собственной пластинки слизистой оболочки с лимфоплазматической инфильтрацией (3 (60%) из 5 и 24 (85,7%) из 28 соответственно; $p = 0,2$) с примесью эозинофилов, гранулоцитов от слабо- до умеренно- и сильно выраженной (рисунок 3А, Б); деформация и деструкция крипт (3 (60%) из 5 и 18 (64,3%) из 28 соответственно; $p = 1,0$); апоптотические тельца (100% и 85,7% соответственно; $p = 1,0$) (рисунок 3В, Г).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Особый интерес среди клиницистов вызывает ранняя диагностика острой РТПХ. Используемые в данной работе технологии представлены в ряде зарубежных публикаций, посвященных проблеме изучения РТПХ у взрослых пациентов [11, 16]. Опубликованных данных о возможности использования характерных эндоскопических изменений слизистой оболочки толстой кишки для диагностики РТПХ после алло-ТГСК у детей до настоящего времени не существует.

Нами впервые проведен анализ результатов эндоскопического обследования толстой кишки у 33 детей с подозрением на изолированную форму интестинальной РТПХ после алло-ТГСК. При изучении характерных РТПХ-ассоциированных эндоскопических критериев поражения слизистой оболочки толстой кишки были получены данные о том, что у преимущественного числа пациентов (78,8%) наблюдались изменения по типу «апельсиновой корки», что позволяет рассматривать этот критерий как основной

Рисунок 3

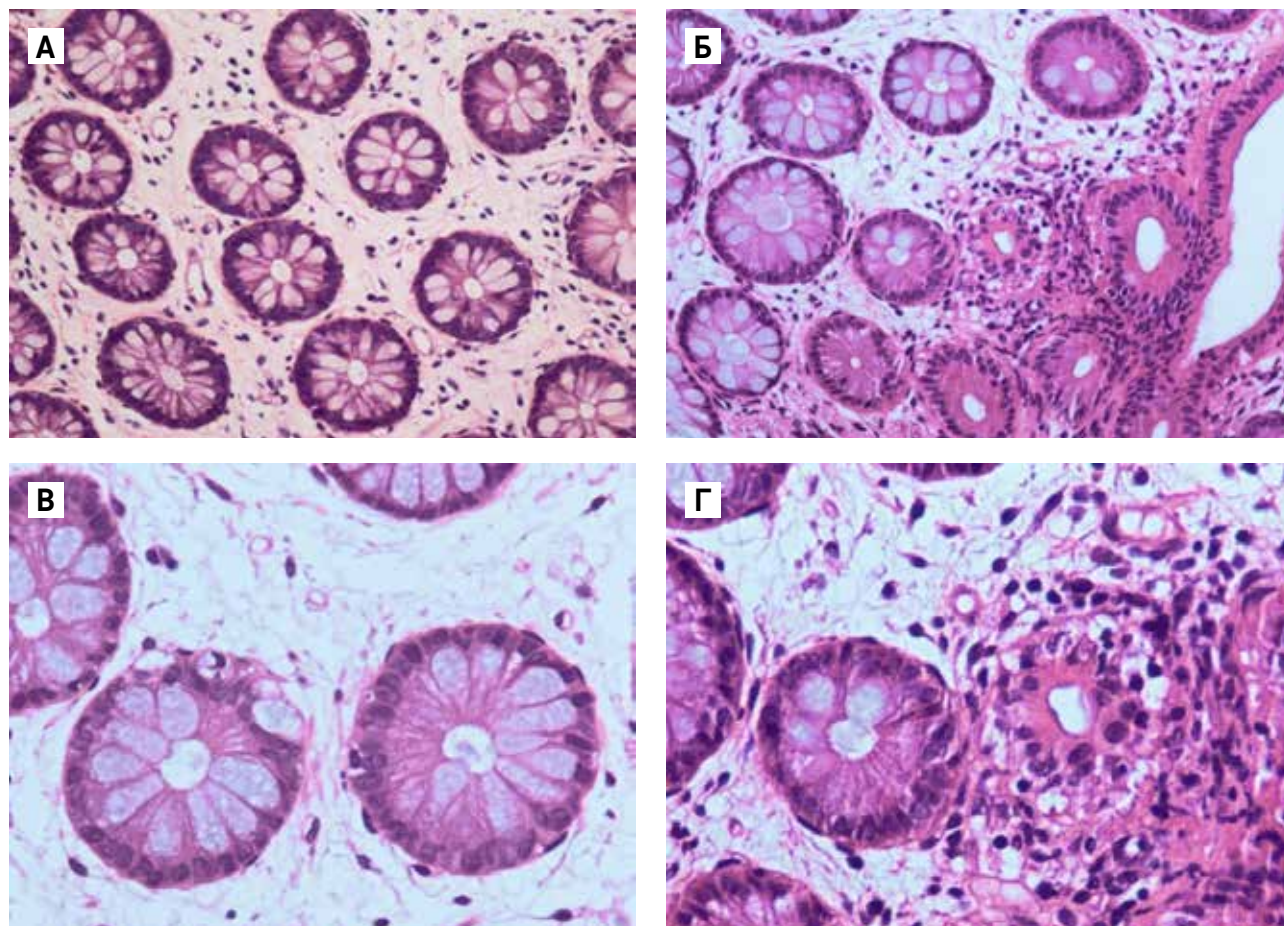
Патоморфологическое исследование полученных при эндоскопии биоптатов слизистой оболочки толстой кишки пациента В., 8 лет. Диагноз: РТПХ

А – отек и инфильтрация лимфоцитами собственной пластинки слизистой оболочки. Глубокие железы с интраэпителиальными лимфоцитами и апоптотическими тельцами, часть желез разрушена. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 200$; Б – отек и инфильтрация собственной пластинки. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 100$; В – интраэпителиальные лимфоциты и апоптотические тельца. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 200$; Г – деструкция железы. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 400$

Figure 3

Pathomorphological evaluation of the colonic mucosal biopsy samples obtained during endoscopy in the patient V., 8 years old. Diagnosis: GVHD

А – swelling and lymphocytic infiltration of the colonic mucosal lamina propria. Deep glands with intraepithelial lymphocytes and apoptotic bodies, with some of the glands destroyed. Hematoxylin and eosin staining, $\times 200$; Б – swelling and infiltration of the lamina propria. Hematoxylin and eosin staining, $\times 100$; В – intraepithelial lymphocytes and apoptotic bodies. Hematoxylin and eosin staining, $\times 200$; Г – destruction of the gland. Hematoxylin and eosin staining, $\times 400$



при эндоскопической диагностике РТПХ у детей после алло-ТГСК.

Нами также доказано, что применение метода хромоэндоскопии 0,4% раствором индигокармина по сравнению с технологией улучшения визуализации i-scan является предпочтительным для более качественного выявления эндоскопического критерия РТПХ («апельсиновая корка») и выполнения прицельной биопсии наиболее измененных участков слизистой оболочки толстой кишки, что совпадало с данными исследования К. Endo и соавт., выполненного у взрослых пациентов [16]. Причиной улучшения визуализационных характеристик слизистой оболочки толстой кишки при использовании индигокармина является эффективное проникновение препарата в расширенные на фоне отека крипты, что в сочетании с невозможностью абсорбции раствора

индигокармина слизистой позволяет подчеркнуть ее рельеф и способствует образованию так называемой апельсиновой корки.

При анализе эндоскопических характеристик статистически значимых различий между группами пациентов с изолированной РТПХ (1-я группа) и комбинированным поражением толстой кишки (2-я группа) не обнаружено ($p > 0,05$), что свидетельствует о преимущественно иммунном характере эндоскопических изменений при РТПХ у детей после алло-ТГСК.

Обращало внимание, что у большинства обследованных (28 (84,8%) из 33) в биоптате слизистой оболочки толстой кишки обнаружены вирусы. При этом преобладающими патогенами, выявляемыми в биопсийном материале, были HHV-6 (50%), норовирус (46,4%) и аденовирус (35,7%). Высокая частота

вирусного поражения толстой кишки у детей с РТПХ, вероятно, объясняется описанной рядом авторов реактивацией вирусной инфекции после алло-ТГСК на фоне активной иммуносупрессивной терапии [14, 17–20]. Поэтому эндоскопические критерии РТПХ у детей с колитом после алло-ТГСК мы считаем целесообразным использовать вне зависимости от наличия или отсутствия вирусного поражения слизистой оболочки толстой кишки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на накопленный опыт и активное использование технологии алло-ТГСК для лечения широкого спектра заболеваний, диагностика интестинальной формы РТПХ часто сопряжена с трудностями, обусловленными отсутствием специфических клинических проявлений. От правильности и сроков

принятых решений о проведении дальнейшей терапии зависят в конечном итоге исход ТГСК и качество жизни пациента, что, безусловно, является аргументом для исследований, направленных на совершенствование методов дифференциальной диагностики РТПХ.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Не указан.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

ORCID

Shubina T.S. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3203-9730>

Balashov D.N. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2689-0569>

Lokhmatov M.M. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8305-7592>

Zakharov I.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7779-1969>

Abramov D.S. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3664-2876>

Akhaladze D.G. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1387-209X>

Литература / References

1. Kanate A.S., Majhail N.S., Savani B.N., Bredeson C., Champlin R.E., Crawford S., et al. Indications for Hematopoietic Cell Transplantation and Immune Effector Cell Therapy: Guidelines from the American Society for Transplantation and Cellular Therapy. *Biol Blood Marrow Transplant* 2020; 26 (7): 1247–56. DOI: 10.1016/j.bbmt.2020.03.002
2. Масчан М.А., Скоробогатова Е.В., Шелихова Л.Н., Балашов Д.Н., Благоднарова О.Л., Долгополов И.С. и др. Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток у детей в России: краткий обзор активности в 2015–2018 гг. *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии* 2020; 19 (2): 22–9. DOI: 10.24287/1726-1708-2020-19-2-22-29 [Maschan M.A., Skorobogatova E.V., Shelikhova L.N., Balashov D.N., Blagodarova O.L., Dolgoplov I.S., et al. Hematopoietic stem cell transplantation in children in Russia: a brief overview of activity in 2015–2018. *Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology* 2020; 19 (2): 22–9. (In Russ.)].
3. Faulkner L., Verna M., Rovelli A., Agarwal R.K., Dhanya R., Parmar L., et al. Pediatric Diseases Working Party of the European Blood and Marrow Transplantation Group. Setting up and sustaining blood and marrow transplant services for children in middle-income economies: an experience-driven position paper on behalf of the EBMT PDWP. *Bone Marrow Transplant* 2021; 56 (3): 536–43. DOI: 10.1038/s41409-020-0983-5
4. Passweg J.R., Baldomero H., Chabannon C., Basak G.W., de la Cámara R., Corbacioglu S., et al. European Society for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). Hematopoietic cell transplantation and cellular therapy survey of the EBMT: monitoring of activities and trends over 30 years. *Bone Marrow Transplant* 2021; 56: 1651–64. DOI: 10.1038/s41409-021-01227-8
5. Благов С.Л., Шелихова Л.Н., Балашов Д.Н., Осипова Е.Ю., Ефименко М.В., Хрипкова Н.А. и др. Применение профилактических инфузий CD45RA-деплементированных донорских лимфоцитов у пациентов, перенесших аллогенную трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток с TCRαβ- и CD19-деплецией по поводу заболеваний незлокачественной природы. *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии* 2019; 18 (3): 9–21. DOI: 10.24287/1726-1708-2019-18-3-9-21 [Blagov S.L., Shelikhova L.N., Balashov D.N., Osipova E.Yu., Efimenko M.V., Khripkova N.A., et al. Low-dose infusions of CD45RA depleted donor lymphocytes after TCRα/β-depleted transplantation in patients with non-malignant disorders. *Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology* 2019; 18 (3): 9–21. (In Russ.)].
6. Кудинова Т.В., Скворцова Ю.В., Бостанов Д.Е. Возможности импульсной осциллометрии в диагностике функции легких у детей после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток. *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии* 2022; 21 (2): 42–7. DOI: 10.24287/1726-1708-2022-21-2-42-47 [Kudinova T.V., Skvor-

- tsova Yu.V., Bostanov D.E. The potential of impulse oscillometry in lung function assessment in children after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology* 2022; 21 (2): 42–7. (In Russ.).
7. Copelan E.A., Chojecki A., Lazarus H.M., Avalos B.R. Allogeneic hematopoietic cell transplantation; the current renaissance. *Blood Rev* 2019; 34: 34–44. DOI: 10.1016/j.blre.2018.11.001
 8. Trajkovska I., Georgievski B., Cevreska L., Gacovski A., Hasan T., Nedeska-Minova N. Early and Late Complications in Patients with Allogeneic Transplantation of Hematopoietic Stem Cell – Case Report. *Open Access Maced J Med Sci* 2017; 5 (3): 340–3. DOI: 10.3889/oam-jms.2017.038
 9. Геворгян А.Г., Морозова Е.В., Казанцев И.В., Пунанов Ю.А., Сафонова С.А., Юхта Т.В. и др. Высокодозная полихимиотерапия с трансплантацией аутологичных гемопоэтических стволовых клеток у детей со злокачественными опухолями центральной нервной системы. *Онкопедиатрия* 2016; 3 (1): 24–35. DOI: 10.15690/onco.v3i1.1526 [Gevorgyan A.G., Morozova E.V., Kazantsev I.V., Punanov Yu.A., Safonova S.A., Yukhta T.V., et al. High-Dose Multi-agent Chemotherapy with Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Children with Central Nervous System Tumors. *Oncopediatrics* 2016; 3 (1): 24–35. (In Russ.).]
 10. Nassereddine S., Rafei H., Elbاهش E., Tabbara I. Acute Graft Versus Host Disease: A Comprehensive Review. *Anticancer Res* 2017; 37 (4): 1547–55. DOI: 10.21873/anticancerres.11483
 11. Buchele V., Büttner-Herold M., Vogler T., Neurath M.F., Hildner K. Induction of Intestinal Graft-versus-host Disease and Its Mini-endoscopic Assessment in Live Mice. *J Vis Exp* 2019: 144. DOI: 10.3791/58871
 12. Sauvestre F., Belleannée G., Bréal C., Mohr C., Fong H.I., Cossin S., et al. Histologic analysis has a prognostical value in colorectal biopsies assessed for suspicion of graft-versus-host disease. *Virchows Arch* 2018; 472 (2): 213–20. DOI: 10.1007/s00428-017-2272-2
 13. Tarantino G., Saraceni F., Mancini G., Poiani M., Maroni L., Goteri G., et al. Gastrointestinal Complications after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplant: A Multidisciplinary Approach with Early Endoscopic Evaluation. *Clin Hematol Int* 2021; 3 (4): 161–8. DOI: 10.2991/chi.k.210826.001
 14. Düver F., Weißbrich B., Eyrich M., Wölfl M., Schlegel P.G., Wiegering V. Viral reactivations following hematopoietic stem cell transplantation in pediatric patients – A single center 11-year analysis. *PLoS One* 2020; 15 (2): e0228451. DOI: 10.1371/journal.pone.0228451
 15. He Z., Wang P., Ye X. Novel endoscopic optical diagnostic technologies in medical trial research: recent advancements and future prospects. *Biomed Eng Online* 2021; 20 (1): 5. DOI: 10.1186/s12938-020-00845-5
 16. Endo K., Fujishima F., Kuroha M., Moroi R., Onodera M., Naito T., et al. Effective and less invasive diagnostic strategy for gastrointestinal GVHD. *Endosc Int Open* 2018; 06 (03): E281–91. DOI: 10.1055/s-0043-122226
 17. Goloshchapov O.V., Shvetsov A.N., Chukhlov A.B., Spiridonova A.A., Vladovskaya M.D., Zubarovskaya L.S., et al. Incidence of Common Herpesviruses in Colonic Mucosal Biopsies Following Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Microorganisms* 2022; 10 (11): 2128. DOI: 10.3390/microorganisms10112128
 18. Волюнец Г.В., Хавкин А.И., Никитин А.В. Герпесвирусы и воспалительные заболевания кишечника. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология* 2020; 183 (11): 126–39. DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-183-11-126-139 [Volynets G.V., Khavkin A.I., Nikitin A.V. Herpesvirus and inflammatory bowel disease. *Experimental and Clinical Gastroenterology* 2020; 183 (11): 126–39. (In Russ.).]
 19. Bueno F., Albert E., Giménez E. An investigation of the potential association between gastrointestinal viral and bacterial infection and development of intestinal acute graft versus host disease following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *J Med Virol* 2021; 93: 4773–9. DOI: 10.1002/jmv.26892
 20. Pikkel-Geva H.Z., Grisariu S., Rivkin M., Stepensky P., Strahilevitz J., Averbuch D., et al. High rate of adenovirus detection in gastrointestinal biopsies of symptomatic stem cell transplant recipients. *Clin Transplant* 2023; 37 (11): e15098. DOI: 10.1111/ctr.15098

© 2024 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ
им. Дмитрия Рогачева»
Минздрава России
Поступила 02.04.2024
Принята к печати 08.05.2024



EDN: BWUHEN

DOI: 10.24287/1726-1708-2024-23-2-98-106

Опыт использования технологии трансплантации фекальной микробиоты для лечения кишечного синдрома различной этиологии после аллогенной трансплантации гемопозитических стволовых клеток у детей

Г.З. Серегин¹, Ю.А. Беспятых², А.В. Господарик², М.Ю. Кириллов³, Л.В. Огнева³, С.В. Жилина¹,
Е.А. Бурцев¹, А.Е. Буря¹, И.О. Власова¹, М.Р. Журавель¹, Е.А. Журавель¹, В.В. Константинова¹,
Б.М. Курманов¹, А.В. Лифшиц¹, М.В. Натрусова¹, А.Е. Донников⁴, М.А. Масчан^{1,5}, Г.О. Бронин¹

¹ГБУЗ г. Москвы «Морозовская детская городская клиническая больница Департамента
здравоохранения г. Москвы», Москва

²ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины
им. акад. Ю.М. Лопухина Федерального медико-биологического агентства», Москва

³ООО «ДНК-Технология ТС», Москва

⁴ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии
и перинатологии им. акад. В.И. Кулакова» Минздрава России, Москва

⁵ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии,
онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, Москва

Контактная информация:

Серегин Георгий Зурабович,
врач-детский онколог отделения
трансплантации костного мозга
и гемопозитических стволовых клеток
ГБУЗ «Морозовская ДГКБ ДЗМ»
Адрес: 119049, Москва,
4-й Добрынинский переулок, 1/9
E-mail: jorggg@mail.ru

Трансплантация фекальной микробиоты (ТФМ) – многообещающий метод терапии различных заболеваний с вовлечением желудочно-кишечного тракта. Целью нашего исследования явилось изучение результатов применения метода ТФМ в лечении различных желудочно-кишечных осложнений (стероид-резистентной и стероид-зависимой реакции «трансплантат против хозяина» (СР/СЗ РТПХ) и инфекционного энтероколита) у детей от 1,5 до 18 лет после аллогенной трансплантации гемопозитических стволовых клеток. Исследование одобрено локальным этическим комитетом Морозовской детской городской клинической больницы ДЗМ (№176 от 24.05.2022). Родители всех пациентов подписали информированное согласие на участие в исследовании и публикацию его результатов. В группу пациентов со СР/СЗ РТПХ были включены 14 детей, а в группу больных с резистентными кишечными инфекциями – 11. В общей сложности было проведено 38 процедур ТФМ, при этом 11 пациентам выполнялись повторные процедуры в связи с отсутствием достижения эффекта после первой ТФМ. Клинический эффект в виде купирования кишечного синдрома с последующей отменой глюкокортикостероидов был зафиксирован у 11 из 14 пациентов со СР/СЗ РТПХ, купирование кишечного синдрома достигнуто у 10 из 11 пациентов с кишечными инфекциями. Клинический эффект коррелировал с изменением структуры микробиома: для двух групп пациентов медиана доли нормальной микробиоты до ТФМ составила 6%, после ТФМ – 92% ($p = 0,043$). Медиана таксономического разнообразия для двух групп пациентов до ТФМ составила 3 таксона, после ТФМ – 10 таксонов ($p = 0,0016$).

Ключевые слова: трансплантация фекальной микробиоты, желудочно-кишечные осложнения, реакция «трансплантат против хозяина», аллогенная трансплантация гемопозитических стволовых клеток

Серегин Г.З. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2024; 23 (2): 98–106.
DOI: 10.24287/1726-1708-2024-23-2-98-106

Fecal microbiota transplantation for the treatment of intestinal diseases after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in children

G.Z. Seregin¹, Yu.A. Bespyatykh², A.V. Gospodarik², M.Yu. Kirillov³, L.V. Ogneva³, S.V. Zhilina¹, E.A. Burtsev¹,
A.E. Burya¹, I.O. Vlasova¹, M.R. Zhuravel¹, E.A. Zhuravel¹, V.V. Konstantinova¹, B.M. Kurmanov¹, A.V. Lifshits¹,
M.V. Natrusova¹, A.E. Donnikov⁴, M.A. Maschan^{1,5}, G.O. Bronin¹

¹Morozov Children's Clinical Hospital of the Department of Health of Moscow, Moscow

²Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency, Moscow

³LLC DNA-Technology TS, Moscow

⁴National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after Academician V.I. Kulakov of Ministry of Health of Russian Federation

⁵Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology of Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow

© 2024 by «D. Rogachev NMRCPHOI»

Received 02.04.2024

Accepted 08.05.2024

Fecal microbiota transplantation (FMT) is a promising therapy for a variety of diseases involving the gastrointestinal (GI) tract. The purpose of our study is to evaluate the effectiveness of FMT for the treatment of different GI complications after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (steroid-refractory and steroid-dependent graft versus host disease (SR/SD GVHD) and infectious enterocolitis) in children from 1.5 to 18 years old. The study was approved by the Local Ethics Committee of the Morozov Children's Clinical Hospital of the Department of Health of Moscow (No. 176 dated 24.05.2022). The patients' parents gave their informed consent to the participation of their children in the study and the publication of the study results. SR/SD GVHD group included 14 patients and GI infections group – 11 patients. In total, 38 FMTs were performed. Eleven children underwent repeated FMTs due to the lack of effect after the first FMT. The resolution of diarrhea followed by the withdrawal of corticosteroids was recorded in 11 out of 14 patients with SR/SD GVHD. Ten out of 11 patients with GI infections also achieved relief of diarrhea. The clinical effect correlated with changes in the microbiome structure: for both groups of patients, the median proportion of normal microbiota before FMT was 6%, after FMT – 92% ($p = 0.043$). The median number of different taxa for both groups of patients before and after FMT were 3 and 10 taxa, respectively ($p = 0.0016$).

Key words: fecal microbiota transplantation, gastrointestinal complications, graft-versus-host disease, allogeneic hematopoietic stem cell transplantation

Seregin G.Z., et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology 2024; 23 (2): 98–106.
DOI: 10.24287/1726-1708-2024-23-2-98-106

Correspondence:

Georgy Z. Seregin,
a pediatric oncologist at the Department
of Bone Marrow and Hematopoietic Stem Cell
Transplantation of the Morozov
Children's City Hospital
Address: 1/9 4th Dobryninsky lane,
Moscow 119049, Russia
E-mail: jorggg@mail.ru

Трансплантация фекальной микробиоты (ТФМ) представляет собой процесс переноса микробиологического сообщества от здорового донора в кишечный тракт реципиента в целях профилактики и терапии ряда заболеваний. На основании большого количества рандомизированных исследований доказана высокая эффективность применения метода при рефрактерных и рецидивирующих формах кишечных инфекций, вызванных *Clostridium difficile* [1–3]. С 2013 г. процедура ТФМ официально одобрена Управлением по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных препаратов США (Food & Drug Administration, FDA) для терапии *Clostridium difficile*-ассоциированного энтероколита [4].

При проведении аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК) в настоящее время сохраняется актуальной проблема лечения тяжелых инфекционных осложнений, вызванных полирезистентными госпитальными микроорганизмами, у полиморбидных больных, получающих многокомпонентную иммуносупрессивную терапию. Большинство случаев трансплантационно-ассоциированной летальности особенно в раннем посттрансплантационном периоде обусловлено инфекционными заболеваниями, в том числе бактериальной этиологии [5–8]. Недавно несколько исследований доказали, что применение ТФМ у реципиентов алло-ТГСК безопасно и эффективно для лечения инфекционных процессов, вызванных мультирезистентными бактериями [9, 10]. В большинстве случаев у реципиентов микробиоты удается достичь эффективного изменения состава кишечного микробного «пейзажа» с преобладанием чувствительных к антибиотикам штаммов, что потенциально позволяет избежать тяжелых септических осложнений, ассоциированных с преобладанием полирезистентных бактерий у иммунологически компрометированных пациентов [9–11].

В последнее время публикуется все большее количество результатов исследований, подтверждающих эффективное применение ТФМ у реципиентов алло-ТГСК с тяжелой желудочно-кишечной формой

реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ), являющейся наряду с инфекционными осложнениями также одной из основных причин посттрансплантационной летальности [12, 13]. Острая РТПХ характеризуется агрессивным воздействием донорских аллореактивных Т-лимфоцитов на органы и ткани реципиента, главным образом кожу, печень и желудочно-кишечный тракт (ЖКТ) [14]. Общепринятой первой линией терапии данного осложнения остается применение глюкокортикостероидов (ГКС), однако их назначение позволяет достичь излечения менее чем половины пациентов [15]. За последние годы в мировой клинической практике разработано и введено множество лекарственных агентов, направленных на терапию данного осложнения, однако до сих пор отсутствует консенсус о наиболее оптимальной терапии второй линии [15, 16].

Среди многочисленных определяющих факторов, участвующих в развитии РТПХ, одним из ключевых является микробиом человека [17]. Появление крупномасштабных исследований, в том числе геномного секвенирования, работ в области транскриптомики, протеомики, метаболомики многократно углубило понимание взаимосвязи между кишечной микробиотой и иммунитетом [18]. Микробиота считается полноценной частью иммунной системы человека благодаря выработке множества регуляторных молекул, обеспечивая «тонкую» регуляцию иммунного ответа [17, 18].

Алло-ТГСК и сопутствующие ей процедуры (в том числе химиотерапия кондиционирования, применение противомикробных препаратов, вынужденные ограничения в диете и др.) представляют собой совокупность крайне неблагоприятных факторов, воздействующих на кишечный микробиом и снижающих его разнообразие [19]. Сниженное разнообразие микробиома к моменту приживления трансплантата и восстановления уровня нейтрофилов достоверно ассоциировано с уменьшением общей выживаемости и увеличением летальности [20]. Более того, определенные характеристики микробного «пейзажа» ассоциированы с клиническими результатами алло-ТГСК. Сниженное количество бактерий, отно-

сящихся к порядку *Clostridiales* (например, рода *Blautia*), и сдвиг в сторону грамотрицательных энтеробактерий (*Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter* spp.) и грамположительных бактерий (*Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* spp.) коррелирует с повышенной вероятностью развития РТПХ [21]. Современные представления о патогенезе острой РТПХ приближают понимание благоприятных терапевтических эффектов, привносимых процедурой ТФМ [22] (рисунок 1).

В связи с этим объясним растущий интерес к ТФМ при алло-ТГСК как к потенциальной превентивной и терапевтической процедуре главным образом в отношении РТПХ и инфекций [23]. На сегодняшний день разработано и доступно к применению множество протоколов ТФМ, различающихся в выборе и скрининге доноров, подготовке реципиентов и пути доставки (инфузии) донорской микробиоты [24]. Высказывались опасения по поводу безопасности использования ТФМ у иммунологически скомпрометированных пациентов с нарушенной проницаемостью кишечника [25]. Z. DeFilipp и соавт. описали 1 случай бактериемии, вызванной полирезистентной *Escherichia coli*, переданной через фекальный трансплантат и приведшей к смерти пациента [26].

На сегодняшний день завершено несколько исследований, направленных на применение ТФМ в качестве терапевтической стратегии для стероид-рефрактерной и стероид-зависимой форм желудочно-кишечной РТПХ (СР/СЗ РТПХ). СР/СЗ РТПХ

определяется как прогрессия симптомов желудочно-кишечной РТПХ в течение 5 дней терапии ГКС или отсутствие положительной динамики симптомов РТПХ в течение 7–14 дней от начала терапии ГКС, или отрицательная динамика после деэскалации дозы ГКС [27]. По результатам этих исследований и описанных клинических случаев полного и частичного ответа в виде купирования признаков СР/СЗ РТПХ достигли до 74% пациентов после проведения процедуры ТФМ [28].

ТФМ является одним из возможных путей преодоления рефрактерности к системным ГКС в лечении острой кишечной РТПХ, потенциально дополняя другие методы терапии: низкомолекулярные таргетные препараты и моноклональные антитела (руксолитиниб, ибрутиниб, ведолизумаб, этанерцепт и др.), экстракорпоральный фотоферез, применение мезенхимальных стволовых клеток [29].

Целью нашего исследования явилось изучение результатов лечения различных желудочно-кишечных осложнений (СР/СЗ РТПХ и инфекционного энтероколита) методом ТФМ у детей от 1,5 до 18 лет после алло-ТГСК.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Нами был разработан клинический протокол по применению ТФМ у реципиентов алло-ТГСК в целях терапии СР/СЗ РТПХ, а также для лечения инфекционных процессов, вовлекающих ЖКТ и рефрак-

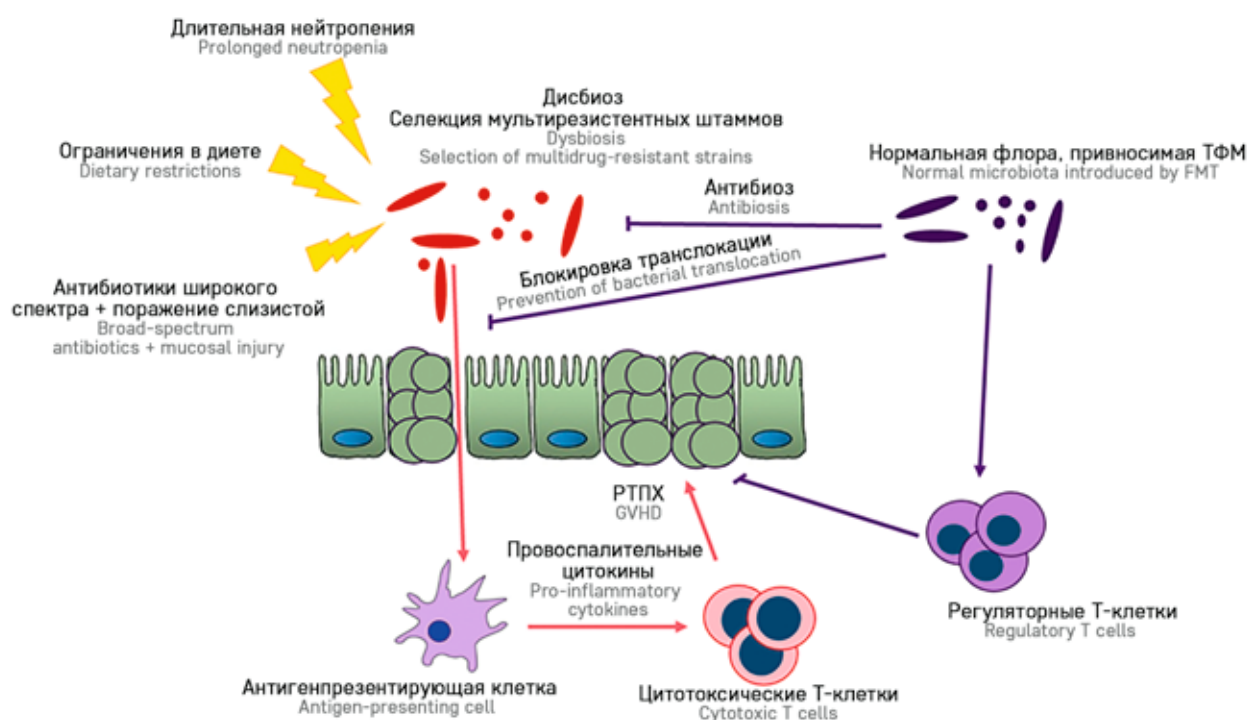
Рисунок 1

Влияние трансплантации микробиома здорового донора на патогенез РТПХ

Figure 1

The influence of microbiome transplantation from a healthy donor on the pathogenesis of graft-versus-host disease (GVHD)

FMT – fecal microbiota transplantation



терных к конвенциональным методам лечения. Исследование одобрено локальным этическим комитетом Морозовской детской городской клинической больницы ДЗМ (№176 от 24.05.2022). Родители всех пациентов подписали информированное согласие на участие в исследовании и публикацию его результатов.

Отбор доноров биоматериала для трансплантации проводился тщательным образом в соответствии с разработанными критериями и перечнем исследований [30]. Селектированный биоматериал изготавливался в виде жидкой фракции, вводимой реципиенту через назогастральный зонд или *per rectum* в установленной дозе (2,2 мл/кг) или в форме капсул (средняя доза на реципиента составляет приблизительно 0,41 г/кг), согласно запатентованной методике [31].

Предварительная подготовка реципиентов включала полную отмену антибактериальной терапии за 48 ч до ТФМ, адекватную антиэметическую и гастропротекторную терапию и назначение низких доз системных ГКС для профилактики иммунологических реакций. В целях трофики донорской микробиоты применялись метабиотики – инулин, а в случае получения пациентом зондового питания – смеси с высоким содержанием глутамина. Необходимым условием проведения ТФМ являлся уровень гранулоцитов в общем анализе крови не менее 500 клеток в 1 мкл.

Оценка структуры микробиома в образцах стула реципиента до и после ТФМ проводилась 2 методами: методом посевов на селективные питательные среды (в ходе проведения исследования оказался крайне низкокчувствительным и малоинформативным) и методом полимеразной цепной реакции (ПЦР): применялась панель «Энтерофлор-дети» (производство ООО «ДНК-технология ТС», Россия), основанная на данных полногеномного секвенирования микробиома широкой выборки детей и позволяющая относительно быстро оценить состав микробиома реципиентов ТФМ [32]. Оценивались доля нормальной микробиоты (соотношение комменсальных, условно-патогенных и патогенных бактерий), выраженная в процентах, и таксономическое разнообразие микробиома, выраженное в количестве таксонов.

Все пациенты были разделены на 2 группы в зависимости от показаний к ТФМ:

1. Группа 1 («СР/СЗ РТПХ») включала реципиентов трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) с течением острой РТПХ с вовлечением ЖКТ, соответствующих следующим критериям:

- отсутствие клинического эффекта в течение 7 дней от начала терапии ГКС в стандартной дозе (метилпреднизолон в дозе 2 мг/кг/сут);

- отсутствие стабилизации заболевания (отрицательная динамика) в течение 5 дней от начала терапии ГКС в стандартной дозе;

- отрицательная динамика РТПХ при попытках деэскалации дозы ГКС.

2. Группа 2 («Кишечные инфекции») включала пациентов после алло-ТГСК с кишечными инфекциями, вызванными полирезистентными штаммами бактерий, вирусами и грибами.

Всем пациентам со времени начала кондиционирования проводился еженедельный скрининг образцов стула, оценивались результаты посевов образцов на селективные питательные среды, качественным ПЦР-методом определялось наличие вирусов (*Astrovirus*, *Norovirus*, *Rotavirus*, *Adenovirus*), а поиск клостридиальных токсинов А и В проводили методом иммуноферментного анализа. Принятие решения о проведении ТФМ базировалось на признании рефрактерности к терапии ГКС в стандартной дозе в соответствии с вышеуказанными критериями для пациентов группы «СР/СЗ РТПХ», а также в случае резистентности инфекционного процесса к конвенциональным методам противомикробной терапии у пациентов группы «Кишечные инфекции». На данном этапе собирался образец стула на исследование микробиома ПЦР-методом. После проведения процедуры ТФМ осуществлялся контрольный мониторинг состава микробиома.

Дизайн исследования для группы «Кишечные инфекции» существенно не отличался от такового в группе «СР/СЗ РТПХ», однако решение о проведении ТФМ регламентировалось отсутствием эффективности конвенциональных методов противомикробной терапии.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

За все время исследования с июля 2022 г. по январь 2024 г. было проведено 38 процедур ТФМ 23 пациентам (таблица 1). Два пациента из 23 были включены в 2 разные клинические группы в разное время (получали процедуры ТФМ как в связи со СР/СЗ РТПХ, так и с клостридиальной инфекцией).

В 5 случаях методом доставки биоматериала являлось введение жидкой фракции через назогастральный, а в 1 – через назоюнальный зонды, в 11 – путем приема пероральных капсул, в 21 – путем введения жидкой фракции *per rectum*. Последние 2 метода избирались чаще в связи с потенциально лучшей переносимостью, меньшим риском ассоциированных осложнений.

Группа «СР/СЗ РТПХ» была представлена 14 пациентами в возрасте от 1,5 до 18 лет с острым миелоидным лейкозом ($n = 5$), острым лимфобластным лейкозом ($n = 6$), дефицитом пируваткиназы ($n = 1$), первичным иммунодефицитом ($n = 1$),

анемией Фанкони ($n = 1$). В 13 случаях была проведена алло-ТГСК с периферическими стволовыми клетками (ПСК) в качестве источника трансплантата: 12 больным от гаплоидентичного родственного донора, 1 – от полностью совместимого сиблинга. Одному пациенту была проведена гаплоидентичная ТГСК (гапло-ТГСК) с костным мозгом в качестве источника трансплантата. Режимы базовой профилактики РТПХ, а также распределение пациентов по типам трансплантации представлены в таблице 2.

Лечение РТПХ помимо применения системных ГКС включало такролимус ($n = 8$), ведолизумаб ($n = 9$), будесонид ($n = 13$), адалимумаб ($n = 3$), мезенхимальные стволовые клетки ($n = 4$), экстракорпоральный фотоферез ($n = 2$). Для купирования синдрома цитокиновых реакций для 1 пациента был использован тоцилизумаб. В процессе проведения ТФМ пациенты продолжали получать комбинированную иммуносупрессивную терапию: в среднем предпринималась попытка терапии РТПХ 4 препаратами, включая ингибитор кальциневрина, руксолитиниб, ведолизумаб, будесонид. Стоит отметить, что ТФМ применялась исключительно при неэффективности других методов лечения, направленных на преодоление рефрактерности РТПХ к ГКС или зависимости течения РТПХ от ГКС. Четверем пациентам проводились повторные процедуры ТФМ в связи с отсутствием клинического эффекта после первой процедуры.

Клинический эффект в виде нивелирования диареи, абдоминального болевого синдрома, гипоальбуминемии, потери электролитов был достигнут у 11 из 14 пациентов. Сроки достижения эффекта варьировали от 5 до 21 дня (медиана – 8 дней). Клинического ответа не удалось достичь у 3 детей. У пациентки с кишечной и печеночной формами РТПХ IV степени был достигнут транзитный эффект, однако через неделю отмечались реактивация геморрагического колита и прогрессия печеночной недостаточности, которая привела к летальному исходу, при этом осложнений, непосредственно ассоциированных с ТФМ, зафиксировано не было. У пациента с СР/СЗ РТПХ с поражением кишечника IV степени эффекта от ТФМ также достигнуто не было, в течение недели развился септический процесс, который потребовал возобновления антибактериальной терапии. После возвращения в терапию системных антибиотиков и купирования инфекционного процесса от повторных процедур ТФМ было решено воздержаться. В третьем случае неэффективной ТФМ проявления СР/СЗ РТПХ были купированы на фоне системной иммуносупрессии и экстракорпорального фотофереза.

Достижение лабораторного эффекта в виде качественного изменения структуры микробиома

Таблица 1
Распределение пациентов по группам и количество ТФМ

Tables 1
The distribution of patients by groups and the number of FMTs

Группа пациентов Patient group	Показание к ТФМ Indication for FMT	Число пациентов The number of patients	Количество ТФМ The number of FMTs
1	СР/СЗ РТПХ SR/SD GVHD	14	20
2	Кишечные инфекции: Intestinal infections:	6	8
	<i>Clostridium difficile</i>	1	2
	<i>Clostridium difficile</i> + <i>Norovirus</i>	1	2
	<i>Clostridium difficile</i> + <i>Norovirus</i> + <i>Salmonella</i>	1	2
	<i>Clostridium difficile</i> + <i>Astrovirus</i> <i>Norovirus</i>	2	4

Note. SR/SD GVHD – steroid-refractory/steroid-dependent graft-versus-host disease.

Таблица 2
Характеристика проведенных трансплантаций в группе «СР/СЗ РТПХ»

Tables 2
Characteristics of transplantations performed in the “SR/SD GVHD” group

Тип трансплантации Type of transplantation	Профилактика РТПХ GVHD prophylaxis	Число пациентов The number of patients
Гапло-ТГСК, источник трансплантата – ПСК Haplo-HSCT, graft source – PBSCs	ПТЦФ, такролимус, ММФ PTCy, tacrolimus, MMF	10
	ПТЦФ, циклоспорин, ММФ PTCy, cyclosporine, MMF	1
	ПТЦФ, руксолитиниб, ММФ PTCy, ruxolitinib, MMF	1
Гапло-ТГСК, источник трансплантата – костный мозг Haplo-HSCT, graft source – bone marrow	ПТЦФ, циклоспорин, ММФ, абатацепт PTCy, cyclosporine, MMF, abatacept	1
Трансплантация от совместимого сиблинга, источник трансплантата – ПСК Transplantation from a matched sibling, graft source – PBSCs	ПТЦФ, циклоспорин, ММФ PTCy, cyclosporine, MMF	1

Примечание. ПТЦФ – посттрансплантационный циклофосфамид; ММФ – микофенолат мофетил.

Note. Haplo-HSCT – haploidentical hematopoietic stem cell transplantation; PTCy – post-transplant cyclophosphamide; MMF – mycophenolate mofetil, PBSCs – peripheral blood stem cells.

было подтверждено у 10 пациентов ПЦР-методом, в 4 случаях изменения состава микробиома подтвердить не удалось (в 2 – ПЦР-методом, в 2 – путем посева кала). По данным ПЦР-метода доля нормальной микробиоты до ТФМ составила от 0 до 100% (медиана 6,1%), а после ТФМ – от 0 до 99,4% (медиана 86,5%). Таксономическое разнообразие состава микробиома до ТФМ составило от 0 до 14 таксонов (медиана 3 таксона), а после ТФМ – от 2 до 15 таксонов (медиана 10 таксонов).

В группу «Кишечные инфекции» вошли 11 пациентов в возрасте от 3 до 14 лет, из них с острым миелоидным лейкозом было 3, с острым лимфобластным лейкозом – 3, с бета-талассемией – 2,

с остеопетрозом – 1, с синдромом Ниймеген – 1, с апластической анемией – 1. Гапло-ТГСК проводилась 9 пациентам, алло-ТГСК от 10/10 совместимого неродственного донора – 2 пациентам. Источником трансплантата у всех пациентов явились ПСК. У всех пациентов этой группы были верифицированы различные кишечные инфекции в посттрансплантационном периоде (таблица 1).

Общее количество ТФМ в группе 2 составило 18 процедур, при этом 7 пациентам проводилась повторная ТФМ. Клинический эффект в виде купирования кишечного синдрома был достигнут у 10 из 11 пациентов, сроки достижения клинического эффекта варьировали от 3 до 20 дней (медиана 7 дней). Достижение лабораторного эффекта зарегистрировано у 5 пациентов (у 4 – ПЦР-методом, у 1 – методом посева кала), отсутствие лабораторного эффекта – у 6 (у 5 – методом посева кала, у 1 – ПЦР-методом). Доля нормальной микробиоты до ТФМ варьировала от 0 до 98,9% (медиана 5,5%), после ТФМ – от 0,8 до 99,8% (медиана 97,1%). Таксономическое разнообразие до ТФМ составило от 1 до 9 таксонов (медиана 3 таксона), а после ТФМ – от 4 до 15 таксонов (медиана 14 таксонов). У 1 пациента спустя 1 мес после достижения лабораторного эффекта в виде исчезновения токсинов *Clostridium difficile* в образцах стула возобновилась диарея, предположительно в связи с РТПХ, пациент впоследствии умер от прогрессии острого лимфобластного лейкоза.

У 5 из 6 пациентов с колитом, вызванным *Clostridium difficile*, эрадикация возбудителя была достигнута после первой ТФМ. Это было подтверждено повторными отрицательными результатами при исследовании токсинов А и В методом иммуноферментного анализа. У 1 из 6 пациентов полная эрадикация достигнута после повторной ТФМ, что удалось подтвердить ПЦР-методом – отмечалось исчезновение генов токсинов А и В из контрольных образцов стула. У 1 пациента с комбинированной инфекцией (*Clostridium difficile* + *Norovirus*) полная эрадикация

Clostridium difficile достигнута после повторной ТФМ. У пациентки с микст-инфекцией (*Clostridium difficile* + *Norovirus* + *Salmonella*) – после первой ТФМ. У второй пациентки с микст-инфекцией (*Clostridium difficile* + *Astrovirus*) исчезновение токсинов клостридий зарегистрировано после первой ТФМ, однако эрадикацию астровируса мы зарегистрировали после повторной ТФМ [33].

У пациентов с инфекцией, вызванной норовирусом, достичь эрадикации возбудителя не удалось, однако был достигнут клинический эффект вплоть до полного купирования кишечного синдрома на фоне доказанного улучшения таксономического разнообразия микробиома (таблица 3).

Проведение процедур ТФМ сопровождалось возникновением главным образом нетяжелых и нежизнеугрожающих нежелательных явлений, купируемых своевременным назначением симптоматического лечения (таблица 4).

Исключением являются 2 пациента, один из них реализовал аспирационную пневмонию и клиническую картину синдрома выброса цитокинов в день ТФМ, что потребовало назначения антицитокиновой и противомикробной терапии, однако это не повлияло на достижение клинического эффекта ТФМ – купирование кишечного синдрома и эрадикация токсинов *Clostridium difficile* были достигнуты на 8-е сутки. Методом доставки биоматериала в данном случае являлось введение через назогастральный зонд, а причина аспирации связывалась с техническими сложностями его фиксации. У второго пациента развилась клиническая картина тяжелого инфекционного энтероколита, проявлявшаяся усугублением болевого синдрома, рвотой, присоединением динамического пареза кишечника, что потребовало возобновления комплексной антибактериальной терапии. Некоторым реципиентам в ходе ТФМ применялся биоматериал от тех же доноров, что и в вышеупомянутых случаях, однако тяжелых нежелательных явлений больше не прослеживалось.

Таблица 3
Эрадикация патогенов после ТФМ и сроки ее достижения

Tables 3
Eradication of pathogens after FMT, time to eradication

Возбудитель инфекционного колита Infectious colitis pathogen	Количество процедур ТФМ The number of FMT procedures	Достижение эрадикации Achievement of eradication	Сроки достижения эрадикации после ТФМ, дни Time to eradication of pathogens after FMT, days
<i>Clostridium difficile</i>	12	В 10 случаях после первой ТФМ, в 2 – после повторной In 10 cases, eradication was achieved after the first FMT, in 2 cases – after the second FMT	7–14
<i>Norovirus</i>	8	Не достигнута ни в одном случае. Клинический эффект достигнут во всех случаях Eradication was not achieved. Clinical effect was achieved in all cases	–
<i>Astrovirus</i>	2 (у 1 пациента) 2 (in 1 patient)	После повторной ТФМ Eradication was achieved after the second FMT	14
<i>Salmonella</i>	2 (у 1 пациента) 2 (in 1 patient)	Не достигнута. Клинический эффект достигнут Eradication was not achieved. Clinical effect was achieved	–

Таблица 4
Осложнения после ТФМ

Tables 4
Complications after FMT

Осложнение Complications	Степень* Grade*	Количество ТФМ The number of FMTs
Метеоризм Bloating and intestinal gas	I	20
Тошнота Nausea	I	2
Абдоминальные боли Abdominal pain	I	7
Аспирационная пневмония (метод введения – назогастральный зонд) Aspiration pneumonia (due to FMT delivered by nasogastric tube)	III	1
Синдром выброса цитокинов Cytokine release syndrome	I	
Энтероколит Enterocolitis	III	1
Сепсис Sepsis	III	
Отсутствие нежелательных явлений No adverse events	–	14

Примечание. * – в соответствии с CTCAE 5.0 (Common Terminology Criteria for Adverse events, общепринятая шкала токсичности 5-го пересмотра).
Note. * – according to the CTCAE 5.0 (Common Terminology Criteria for Adverse Events, a common toxicity scale, 5th revision).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

В ходе проведения нашего исследования метод ТФМ продемонстрировал эффективность в лечении как СР/СЗ РТПХ, так и кишечных инфекций у большинства реципиентов алло-ТГСК. В большинстве случаев у пациентов с СР/СЗ РТПХ удалось добиться купирования кишечного синдрома с последующей дезэскалацией иммуносупрессии и отменой ГКС, что характеризует ТФМ как эффективный способ лечения СР/СЗ РТПХ. В 3 особенно тяжелых случаях РТПХ стойкого терапевтического эффекта достичь не удалось, что, вероятно, связано со степенью тяжести поражения кишечника и интенсивностью гемоколита. Метод ТФМ оказался малоэффективен у пациентов с тяжелым гемоколитом, так как массивное воспалительно-некротическое поражение кишечной стенки, вероятно, может способствовать дислокации микроорганизмов из кишечника и явиться причиной системного инфицирования и септического процесса.

Рассматривая группу пациентов с кишечными инфекциями, в нашем исследовании полностью подтверждаются мировые данные по успешной эрадикации токсинов *Clostridium difficile* и купированию ассоциированного колита [9, 34–37]. Примечательным наблюдением в нашем исследовании является факт купирования энтероколита у пациентов при сохраняющейся персистенции норовируса. Напрашивается вывод об отсутствии ключевой роли данного вируса в патогенезе энтероколита, возможно, патоген выступает в роли «немного свидетеля» патологического процесса или его вклад в развитие диарейного синдрома реализуется опосредованно через дополнительные механизмы, корригируемые донорской микробиотой.

Восстановление нормальной микробиоты кишечника достигается через дополнительные механизмы, корригируемые донорской микробиотой.

Во всех случаях достижение клинического эффекта подтверждалось изменением структуры микробиома кишечника. На рисунках 2, 3 представлены данные об изменении структуры микробиома (доли нормальной микробиоты относительно общего количества микроорганизмов, в том числе условно-патогенных и патогенных, и количества таксонов) в образцах стула обеих групп пациентов до и после процедур ТФМ. Доля нормальной микробиоты до ТФМ для двух групп пациентов составляла от 0 до 100% (медиана 6%), в то время как после ТФМ – от 22 до 99% (медиана 92%). Таксономическое разнообразие для двух групп пациентов до проведения ТФМ варьировало от 0 до 14 таксонов (медиана 3 таксона), после процедур – от 2 до 15 таксонов (медиана 10 таксонов).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на ограниченный объем выборки, данные нашего исследования демонстрируют, что ТФМ обладает высокой эффективностью и безопас-

Рисунок 2
Доля нормальной микробиоты в образцах стула реципиентов до и после ТФМ

Figure 2
The proportion of normal microbiota in stool samples of the recipients before and after FMT

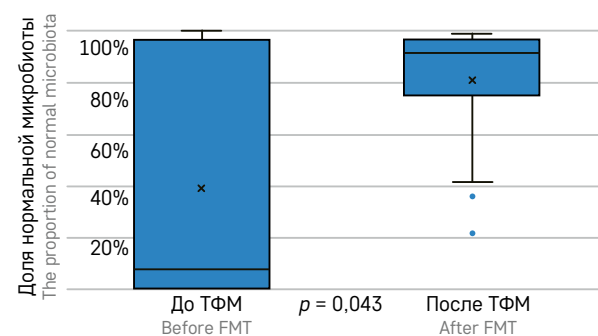
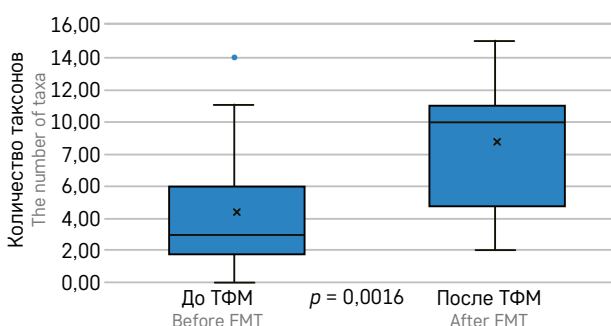


Рисунок 3
Таксономическое разнообразие микробиома кишечника реципиентов до и после ТФМ

Figure 3
Taxonomic diversity of the intestinal microbiome of the recipients before and after FMT



ностью в лечении реципиентов алло-ТГСК с кишечной формой СР/СЗ РТПХ и резистентными кишечными инфекциями. С учетом мирового опыта полагаем, что необходимо обеспечить доступ к данной лечебной технологии как к ключевому методу терапии колитов, ассоциированных с *Clostridium difficile*. Представляется значимым продолжить систематическое изучение метода ТФМ у реципиентов алло-ТГСК с кишечной формой РТПХ и инфекциями, вовлекающими ЖКТ.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Московского центра инновационных технологий в здравоохранении.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

ORCID

Seregin G.Z. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3880-4402>
 Bespyatykh Yu.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4408-503X>
 Gospodarik A.V. ORCID: <https://orcid.org/0009-0003-7870-1106>
 Kirillov M.Yu. ORCID: <https://orcid.org/0009-0005-5578-4492>
 Ogneva L.V. ORCID: <https://orcid.org/0009-0000-0547-4393>
 Zhilina S.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0084-1013>
 Burtsev E.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3623-6547>
 Burya A.E. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4170-7152>
 Vlasova I.O. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9209-7238>
 Zhuravel M.R. ORCID: <https://orcid.org/0009-0000-2875-8372>
 Zhuravel E.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2049-897X>
 Konstantinova V.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2652-8642>
 Kurmanov B.M. ORCID: <https://orcid.org/0009-0003-5256-1715>
 Lifshits A.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9095-1771>
 Natrusova M.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4244-7110>
 Donnikov A.E. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3504-2406>
 Maschan M.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1735-0093>
 Bronin G.O. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0694-3996>

Литература / References

1. Cammarota G., Ianiro G., Tilg H., Rajilic-Stojanovic M., Kump P., Sato-kari R., et al. European consensus conference on faecal microbiota transplantation in clinical practice. *Gut* 2017; 66 (4): 569–80.
2. Surawicz C.M., Brandt L.J., Binion D.G., Ananthakrishnan A.N., Curry S.R., Gilligan P.H., et al. Guidelines for diagnosis, treatment, and prevention of *Clostridium difficile* infections. *Am J Gastroenterol* 2013; 108 (4): 478–98.
3. Debast S.B., Bauer M.P., Kuijper E.J.; European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: update of the treatment guidance document for *Clostridium difficile* infection. *Clin Microbiol Infect* 2014; 20 Suppl 2: 1–26.
4. Enforcement Policy Regarding Investigational New Drug Requirements for Use of Fecal Microbiota for Transplantation to Treat *Clostridium difficile* Infection Not Responsive to Standard Therapies. [Electronic resource] URL: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/enforcement-policy-regarding-investigational-new-drug-requirements-use-fecal-microbiota> (accessed 25.04.2024).
5. Samet A., Sledzinska A., Krawczyk B., Hellmann A., Nowicki S., Kur J., et al. Leukemia and risk of recurrent *Escherichia coli* bacteremia: genotyping implicates *E. coli* translocation from the colon to the bloodstream. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2013; 32 (11): 1393–400.
6. Maschan M., Shelikhova L., Ilushina M., Kurnikova E., Boyakova E., Balashov D., et al. TCR-alpha/beta and CD19 depletion and treosulfan-based conditioning regimen in unrelated and haploidentical transplantation in children with acute myeloid leukemia. *Bone Marrow Transplant* 2016; 51 (5): 668–74.
7. Kim S.B., Min Y.H., Cheong J.W., Kim J.S., Kim S.J., Ku N.S., et al. Incidence and risk factors for carbapenem- and multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* bacteremia in hematopoietic stem cell transplantation recipients. *Scand J Infect Dis* 2014; 46 (2): 81–8.
8. Caselli D., Cesaro S., Ziino O., Zanazzo G., Manicone R., Livi-diotti S., et al. Multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection in children undergoing chemotherapy and hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica* 2010; 95 (9): 1612–5.
9. Battipaglia G., Malard F., Rubio M.T., Ruggeri A., Mamez A.C., Brissot E., et al. Fecal microbiota transplantation before or after allogeneic hematopoietic transplantation in patients with hematologic malignancies carrying multidrug-resistance bacteria. *Haematologica* 2019; 104 (8): 1682–8.
10. Bilinski J., Grzesiowski P., Sorensen N., Madry K., Muszynski J., Robak K., et al. Fecal Microbiota Transplantation in Patients With Blood Disorders Inhibits Gut Colonization With Antibiotic-Resistant Bacteria: Results of a Prospective, Single-Center Study. *Clin Infect Dis* 2017; 65 (3): 364–70.
11. DeFilipp Z., Peled J.U., Li S., Mahabamunuge J., Dagher Z., Slingerland A.E., et al. Third-party fecal microbiota transplantation following allo-HCT reconstitutes microbiome diversity. *Blood Adv* 2018; 2 (7): 745–53.
12. Zhao Y., Li X., Zhou Y., Gao J., Jiao Y., Zhu B., et al. Safety and Efficacy of Fecal Microbiota Transplantation for Grade IV Steroid Refractory GI-GvHD Patients: Interim Results From FMT2017002 Trial. *Front Immunol* 2021; 12: 678476.
13. Голощапов О.В., Чухловин А.Б., Бакин Е.А., Станевич О.В., Клементьева Р.В., Щербakov А.А. и др. Трансплантация фекальной микробиоты при реакции «трансплантат против хозяина» у детей и взрослых: методы, клинические эффекты, безопасность. *Терапевтический архив* 2020; 92 (7): 43–54. DOI: 10.26442/00403660.2020.07.000773 [Goloshchapov O.V., Chukhlovina A.B., Bakin E.A., Stanevich O.V., Klementeva R.V., Shcherbakov A.A., et al. Fecal microbiota transplantation for graft-versus-host disease in children and adults: methods, clinical effects, safety. *Therapeutic Archive*. 2020; 92 (7): 43–54. (In Russ.)].
14. Zeiser R., Blazar B.R. Acute Graft-versus-Host Disease-Biology Process, Prevention, and Therapy. *N Engl J Med* 2017; 377: 2167–79.
15. Ferrara J.L.M., Levine J.E., Reddy P., Holler E. Graft-versus-host disease. *Lancet* 2009; 373: 1550–61.
16. Dignan F.L., Clark A., Amrolia P., Cornish J., Jackson G.S., Mahendra P., et al. Diagnosis and management of acute graft-versus-host

- disease. *Br J Haematol* 2012; 158: 30–45.
17. Andermann T.M., Peled J.U., Ho C., Reddy P., Riches M., Storb R., et al. The Microbiome and Hematopoietic Cell Transplantation: Past, Present, and Future. *Biol. Blood Marrow Transpl* 2018; 24: 1322–40.
 18. Schluter J., Peled J., Taylor B.P., Markey K.A., Smith J.A., Taur Y., et al. The gut microbiota is associated with immune cell dynamics in humans. *Nature* 2020; 588: 303–7.
 19. Zama D., Bossù G., Leardini D., Muratore E., Biagi E., Prete A., et al. Insights into the role of intestinal microbiota in hematopoietic stem-cell transplantation. *Ther Adv Hematol* 2020; 11: 2040620719896961.
 20. Peled J.U., Gomes A.L., Devlin S.M., Littmann E.R., Taur Y., Sung A.D., et al. Microbiota as predictor of mortality in allogeneic hematopoietic-cell transplantation. *N Engl J Med* 2020; 382: 822–34.
 21. Jenq R.R., Taur Y., Devlin S.M., Ponce D.M., Goldberg J.D., Ahr K.F., et al. Intestinal *Blautia* Is Associated with Reduced Death from Graft-versus-Host Disease. *Biol Blood Marrow Transpl* 2015; 21: 1373–83.
 22. Yoshioka K., Kakihana K., Doki N., Ohashi K. Gut microbiota and acute graft-versus-host disease. *Pharmacol Res* 2017; 122: 90–5.
 23. Shouval R., Geva M., Nagler A., Youngster I. Fecal Microbiota Transplantation for Treatment of Acute Graft-versus-Host Disease. *Clin Hematol Int* 2019; 1: 28.
 24. Cammarota G., Ianiro G., Tilg H., Rajilić-Stojanović M., Kump P., Sotokari R., et al. European consensus conference on faecal microbiota transplantation in clinical practice. *Gut* 2017; 66: 569–80.
 25. Wardill H.R., Secombe K.R., Bryant R.V., Hazenberg M.D., Costello S.P. Adjunctive fecal microbiota transplantation in supportive oncology: Emerging indications and considerations in immunocompromised patients. *EBioMedicine* 2019; 44: 730–40.
 26. DeFilipp Z., Bloom P.P., Soto M.T., Mansour M.K., Sater M.R., Huntley M.H., et al. Drug-Resistant *E. coli* Bacteremia Transmitted by Fecal Microbiota Transplant. *N Engl J Med* 2019; 381: 2043–50.
 27. Carreras E., Dufour C., Mohty M., Kröger N. The EBMT Handbook: Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Cellular Therapies. Springer International Publishing AG: Cham, Switzerland; 2019.
 28. Pession A., Zama D., Muratore E., Leardini D., Gori D., Guaraldi F., et al. Fecal Microbiota Transplantation in Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation Recipients: A Systematic Review. *J Pers Med* 2021; 11 (2): 100.
 29. Malard F., Huang X.J., Sim J.P.Y. Treatment and unmet needs in steroid-refractory acute graft-versus-host disease. *Leukemia* 2020; 34 (5): 1229–40.
 30. Господарик А.В., Прохорова Н.Д., Беспятых Ю.А. Подбор доноров для трансплантации фекальной микробиоты: невольный скрининг здоровья населения. *ОРГЗДРАВ: новости, мнения, обучение. Вестник ВШОУЗ* 2024; 10 (1): 92–103. [Gospodaryk A.V., Prokhorova N.D., Besspyatykh J.A. Selection of donors for fecal microbiota transplantation: compulsory public health screening. *Healthcare Management: News, Views, Education. Bulletin of VSHOUZ* 2024; 10 (1): 92–103. (In Russ.)].
 31. Жгун Е.С., Сорокина Е.А., Кислун Ю.В., Ильина Е.Н., Денисова Е.А., Беспятых Ю.А. Способ получения липофильно высушенного препарата фекалий для трансплантации фекальной микробиоты. Патент на изобретение RU 2809736 C2, 15.12.2023. Заявка от 09.12.2021. [Zhgun E.S., Sorokina E.A., Kislun Yu.V., Ilyina E.N., Denisova E.A., Besspyatykh Yu.A. Method of obtaining freeze-dried feces preparation for fecal microbiota transplantation. A patent for invention RU 2809736 C2, 15.12.2023. The application dated 09.12.2021. (In Russ.)].
 32. Ворошилина Е.С., Москвина М.В., Кириллов М.Ю., Огнева Л.В., Донников А.Е., Итани Т.М. и др. Фундаментальные основы современных подходов к оценке микробиоты кишечника детей. *Неонатология: новости, мнения, обучение* 2023; 11 (3): 47–59. [Voroshilina E.S., Moskvina M.V., Kirillov M.Yu., Ogneva L.V., Donnikov A.E., Itani T.M., et al. Fundamentals of modern approaches to assessing gut microbiota in children. *Neonatology: news, opinions, training* 2023; 11 (3): 47–59. (In Russ.)].
 33. Беспятых Ю.А., Господарик А.В., Журавель Е.А., Серегин Г.З., Комарова А.В., Есиев С.С. и др. Трансплантация фекальной микробиоты при астровирусной инфекции у реципиента аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток: клинический случай. *Клиническая практика* 2023; 14 (1): 115–22. [Besspyatykh J.A., Gospodarik A.V., Zhuravel E.A., Seregin G.Z., Komarova A.V., Esiev S.S., et al. Fecal Microbiota Transplantation in the Treatment of Astrovirus Infection in a Recipient of an Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplant: a Clinical Case. *Journal of Clinical Practice* 2023; 14 (1): 115–22. (In Russ.)].
 34. Ianiro G., Masucci L., Quaranta G., Simonelli C., Lopetuso L.R., Sanguinetti M., et al. Randomised clinical trial: faecal microbiota transplantation by colonoscopy plus vancomycin for the treatment of severe refractory *Clostridium difficile* infection-single versus multiple infusions. *Aliment Pharmacol Ther* 2018; 48 (2): 152–9.
 35. Акиншина А.И., Смирнова Д.В., Загайнова А.В., Макаров В.В., Юдин С.М. Перспективы использования методов коррекции микробиоты при терапии воспалительных заболеваний кишечника. *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии* 2019; 29 (2): 12–22. [Akinshina A.I., Smirnova D.V., Zagaynova A.V., Makarov V.V., Yudin S.M. Prospects of Using Microbiota Correction Methods in the Treatment of Inflammatory Bowel Disease. *Russian Journal of Gastroenterology, Hepatology, Coloproctology* 2019; 29 (2): 12–22. (In Russ.)].
 36. Щербakov П.Л., Белова Н.Д., Генерозов Э.В., Жгун Е.С., Иванова О.И., Ильина Е.Н. и др. Применение фекальной трансплантации в лечении заболеваний пищеварительного тракта (первый клинический опыт). *Доктор.Ру* 2019; 3 (158): 40–6. [Scherbakov P.L., Belova N. D., Generezov E. V., Zhgun E.S., Ivanova O.I., Ilyina E.N., et al. Faecal Transplant in GIT Treatment (Pilot Clinical Experience). *Doctor.Ru* 2019; 3 (158): 40–6. (In Russ.)].
 37. Woodworth M.H., Carpentieri C., Sitchenko K.L., Kraft C.S. Challenges in fecal donor selection and screening for fecal microbiota transplantation: A review. *Gut Microbes* 2017; 8 (3): 225–37.

DOI: 10.24287/1726-1708-2024-23-2-107-115

Особенности течения новой коронавирусной инфекции у детей после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток

А.О. Верещагина¹, Г.Г. Солопова¹, Т.А. Быкова², М.О. Попова², Д.Н. Балашов¹, Н.В. Суворова¹, Е.В. Розанцева¹, П.А. Левин¹, Л.С. Зубаровская², Г.А. Новичкова¹

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, Москва

²Научно-исследовательский институт детской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р.М. Горбачевой ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России, Санкт-Петербург

Особенности течения новой коронавирусной инфекции (COVID-19) у пациентов с гематологическими/онкогематологическими заболеваниями, перенесших трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК), представляют большой интерес. В связи с этим с января 2020 г. по январь 2023 г. было проведено двухцентровое исследование на базе НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева и НИИ ДОГиТ им. Р.М. Горбачевой. Исследование являлось ретроспективно-проспективным, нерандомизированным, неинтервенционным и включало детей от 0 до 19 лет с гематологическими/онкогематологическими заболеваниями и первичными иммунодефицитными синдромами на разных этапах после проведения аллогенной ТГСК с подтвержденным диагнозом COVID-19. Данное исследование одобрено независимым этическим комитетом и утверждено решением ученого совета НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева. Инфекция COVID-19 была установлена методом полимеразной цепной реакции и подразделялась на легкую, среднетяжелую, тяжелую и крайне тяжелую формы. В исследование были включены 105 детей с медианой возраста 9 лет и преобладанием пациентов мужского пола с соотношением мальчиков и девочек 1,8:1. Основными заболеваниями являлись гемобласты (73%), доброкачественные гематологические заболевания (14%) и первичные иммунодефицитные синдромы (13%). Наиболее частыми клиническими проявлениями были лихорадка, кишечный синдром и респираторная симптоматика, в 40% случаев инфекция протекала бессимптомно. Фактором, коррелирующим с развитием тяжелых форм заболевания, являлась лимфопения. У пациентов без иммунореконституции отмечалась более длительная персистенция вируса COVID-19: 17 дней против 13, однако достоверных различий получено не было ($p = 0,7$), различий между формами тяжести и исходами COVID-19 также выявлено не было. Влияния терапии на длительность течения COVID-19, ассоциации между видами лечения и продолжительностью заболевания не наблюдалось. Общая выживаемость реципиентов ТГСК при развитии COVID-19 была ниже по сравнению с нетрансплантированными пациентами: 88% против 94%; $p = 0,077$.

Ключевые слова: новая коронавирусная инфекция, SARS-CoV-2, COVID-19, трансплантация гемопоэтических стволовых клеток, дети, онкогематология, химиотерапия

Верещагина А.О. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2024; 23 (2): 107–115. DOI: 10.24287/1726-1708-2024-23-2-107-115

The clinical course of the novel coronavirus disease in children after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation

A.O. Vereshchagina¹, G.G. Solopova¹, T.A. Bykova², M.O. Popova², D.N. Balashov¹, N.V. Suvorova¹, E.V. Rozanceva¹, P.A. Levin¹, L.S. Zubarovskaya², G.A. Novichkova¹

¹Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology of Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow

²R.M. Gorbacheva Research Institute for Pediatric Oncology, Hematology and Transplantation of the I.P. Pavlov First Saint Petersburg State Medical University of Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Saint-Petersburg

The clinical course of the novel coronavirus disease (COVID-19) in patients with oncological and hematological diseases after hematopoietic stem cell transplantation (HSCT), are of special interest. To further investigate the problem, a two-center study was undertaken at the Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology and the R.M. Gorbacheva National Research Institute for Pediatric Oncology, Hematology and Transplantation between January 2020 and January 2023. This was a retrospective-prospective, non-randomized, non-interventional study that included children aged 0–19 years with oncological and hematological diseases and primary immunodeficiencies who had undergone allogeneic HSCT and subsequently contracted COVID-19. The study was approved by the Independent Ethics Committee and the Scientific Council of the Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology. COVID-19 cases were confirmed by polymerase chain reaction testing and classified as asymptomatic, mild, moderate, severe, and critical. The study included 105 patients with a median age of 9 years; male patients were predominant (the male-to-female ratio was 1.8:1). The primary diseases were hematological malignancies (73%), benign hematological diseases (14%) and primary immunodeficiencies (13%). The most common clinical symptoms of COVID-19 were fever, gastrointestinal symptoms, and respiratory symptoms; 40% of COVID-19 cases were asymptomatic. Lymphopenia was found to be a risk factor for severe COVID-19. The patients without immune reconstitution had a longer persistence of the COVID-19 virus than those with immune reconstitution (17 days versus 13 days), however, no significant differences were obtained ($p = 0,7$). There were also no significant differences in the severity and outcomes of COVID-19 between the patients with immune reconstitution and those without reconstitution. There was no effect of therapy on the duration of COVID-19, and there was no association between the type of treatment and the duration of the disease. The overall survival rate in the allo-HSCT recipients who had been diagnosed with COVID-19 was 88%, which was lower than in the non-recipients (88% vs 94%; $p = 0,077$).

Key words: the novel coronavirus infection, SARS-CoV-2, COVID-19, hematopoietic stem cell transplantation, children, oncohematology, chemotherapy

Vereshchagina A.O., et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology 2024; 23 (2): 107–115. DOI: 10.24287/1726-1708-2024-23-2-107-115

© 2024 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России

Поступила 16.04.2024

Принята к печати 13.05.2024



EDN: EVURCF

Контактная информация:

Верещагина Анастасия Олеговна, врач-гематолог отделения инфекционного контроля ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России
Адрес: 117997, Москва, ул. Саморы Машела, 1
E-mail: a.vereshchagina@dgoi.ru

© 2024 by «D. Rogachev NMRCPOI»

Received 16.04.2024

Accepted 13.05.2024

Correspondence:

Anastasia O. Vereshchagina, a hematologist at the Department of Infection Control of the Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Ministry of Healthcare of the Russian Federation
Address: 1 Samory Mashela St., Moscow 117997, Russia
E-mail: a.vereshchagina@dgoi.ru

С момента первого упоминания о новой коронавирусной инфекции (COVID-19) в декабре 2019 г., повлекшей высокий уровень смертности во всем мире, проанализировано большое количество данных о вариантах течения заболевания, рисках развития тяжелых форм и смертельных исходах.

11 марта 2020 г. Всемирная организация здравоохранения объявила пандемию COVID-19 и к апрелю 2023 г. во всем мире было зарегистрировано более 7,6 млн подтвержденных случаев заболевания [1]. Факторы риска заражения COVID-19 включали пожилой возраст, ожирение, сопутствующие заболевания, такие как диабет, отказ от вакцинации и/или ослабленный иммунитет [2]. Было продемонстрировано, что пациенты с онкогематологическими заболеваниями и реципиенты гемопоэтических стволовых клеток подвергаются большему риску неблагоприятных исходов от COVID-19 [3]. В качестве терапии, по данным временных методических рекомендаций по профилактике, диагностике и лечению COVID-19, было рекомендовано назначение моноклональных антител, свежезамороженной плазмы доноров-реконвалесцентов [4], а также внутривенных иммуноглобулинов.

Большой интерес для изучения представляют вопрос частоты развития COVID-19, наиболее значимые клинические проявления, факторы риска развития тяжелых форм COVID-19, влияние статуса основного заболевания и сроков от проведения трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК), а также эффективность целенаправленной терапии у пациентов детского возраста.

Целью исследования являлась оценка особенностей клинических проявлений COVID-19, факторов риска, влияющих на тяжесть и длительность течения инфекции, а также исходов заболевания у реципиентов ТГСК.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В данное исследование были включены 105 пациентов в возрасте от 0 до 19 лет после аллогенной ТГСК с подтвержденным диагнозом COVID-19, госпитализированных в НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева и НИИ ДОГиТ им. Р.М. Горбачевой в период с января 2020 г. по январь 2023 г. Исследование являлось ретроспективно-проспективным, нерандомизированным, неинтервенционным, было одобрено независимым этическим комитетом и утверждено решением ученого совета НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева.

Для подтверждения диагноза COVID-19 пациентам проводилась полимеразная цепная реакция (ПЦР) с обнаружением РНК вируса SARS-CoV-2. Материалом для исследования являлись респираторные мазки

из ротоглотки, трахеобронхиальный аспират, бронхоальвеолярный лаваж. Показаниями для проведения ПЦР-исследований у реципиентов ТГСК была клиника острой респираторной вирусной инфекции и/или лихорадки, а также доказанный или возможный контакт с COVID-19.

Была разработана база данных на основе системы REDCap, в которую заносились следующие параметры: пол, возраст, основной диагноз, дата ТГСК, дата положительных и отрицательных ПЦР-тестов на COVID-19, клинические симптомы, лабораторные данные, терапия COVID-19, исход заболевания.

Критерии клинических форм COVID-19 подразделяли на 4 группы в соответствии с методическими рекомендациями по профилактике, диагностике и лечению COVID-19, версия 8 от 03.09.2020 [5]: легкое течение – температура тела $< 38^{\circ}\text{C}$, респираторная симптоматика, слабость в отсутствие критериев среднетяжелого и тяжелого течения; среднетяжелое течение – температура тела $> 38^{\circ}\text{C}$, одышка при физической нагрузке, $\text{SpO}_2 < 95\%$, изменения на компьютерной томограмме (КТ) органов грудной клетки (объем поражения минимальный или средний, КТ 1–2), С-реактивный белок сыворотки крови > 10 мг/л; тяжелое течение – $\text{SpO}_2 \leq 93\%$, $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 300$ мм рт. ст., снижение уровня сознания, агитация, нестабильная гемодинамика (систолическое артериальное давление < 90 мм рт. ст. или диастолическое артериальное давление < 60 мм рт. ст., диурез менее 20 мл/ч), КТ 3–4; крайне тяжелое течение – септический шок, полиорганная недостаточность, КТ 4, острый респираторный дистресс-синдром.

Дополнительно был проведен сравнительный анализ с группой иммунокомпрометированных пациентов с подтвержденной инфекцией COVID-19 без ТГСК, включавшей 115 пациентов в возрасте от 0 до 18 лет, госпитализированных в НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева в аналогичный период (с января 2020 г. по январь 2023 г.). В сравнительном анализе оценивали клинические проявления, формы тяжести и исходы заболевания COVID-19 у пациентов после ТГСК и без нее.

Статистический анализ данных выполнялся с использованием пакета программ Microsoft Office Excel 2016 и RStudio Server версии 1.3.959. Описательная статистика количественных признаков представлена медианами, квартилями и разбросом (min–max), качественных признаков – абсолютными и относительными частотами. Для сравнения 2 независимых групп по количественным признакам использовался тест Манна–Уитни. Сравнение групп по качественным признакам проводили с использованием критерия хи-квадрат, точного критерия Фишера

и расчета отношения шансов с помощью логистической регрессии. Время до события определялось с помощью анализа выживаемости (кривые Каплана–Майера и логранговый критерий). При проверке гипотез уровень значимости принимался равным 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследование были включены 105 пациентов с гематологическими/онкогематологическими заболеваниями и первичными иммунодефицитными синдромами (ПИДС) на разных этапах после аллогенной ТГСК с подтвержденным диагнозом COVID-19. В соответствии с анализом количества аллогенных трансплантаций, выполненных за указанный период в обоих центрах ($n = 884$), частота развития COVID-19 у реципиентов ТГСК составила 12,5%. Медиана возраста пациентов составила 9 (0,9–19,5) лет. Отмечалось преобладание пациентов мужского пола с соотношением мальчиков и девочек 1,8:1 (64% и 36% соответственно), ассоциации с тяжестью и исходами COVID-19 не было ($p = 0,5$). К основным диагнозам пациентов были отнесены гемобластозы ($n = 77$; 73%), доброкачественные гематологические заболевания ($n = 14$; 13%) и ПИДС ($n = 14$; 13%). Большинство пациентов с гемобластозами находились в ремиссии по основному заболеванию ($n = 63$; 82%), в то время как у 14 (18%) был зарегистрирован рецидив или прогрессия основного заболевания.

Таблица
Распределение пациентов группы исследования и группы сравнения по диагнозам

Tables
The distribution of the patients in the group of interest and in the comparison group by diagnosis

Параметр Parameter		После ТГСК After HSCT	Без ТГСК Without HSCT
		105 (100)	115 (100)
Пол, n (%) Sex, n (%)	Мужской Male	67 (64)	63 (55)
	Женский Female	38 (36)	52 (45)
Возраст, годы Age, years		9 (0,9–19,5)	7,8 (0,3–17,9)
Диагноз, n (%) Diagnosis, n (%)			
Гемобластозы: Hematological malignancies:		77 (74)	75 (65)
ОЛЛ ALL		49 (47)	46 (43)
ОМЛ AML		21 (20)	7 (6,5)
Лимфома Lymphoma		3 (3)	22 (20)
ЮММЛ JMML		3 (3)	0
НХЛ NHL		1 (1)	0
ПИДС PID syndromes		14 (13)	19 (17)
Доброкачественные гематологические заболевания Benign hematological diseases		14 (14)	21 (18)

Примечание. ОЛЛ – острый лимфобластный лейкоз; ОМЛ – острый миелоидный лейкоз; ЮММЛ – ювенильный миеломоноцитарный лейкоз; НХЛ – неходжкинские лимфомы.
Note. HSCT – hematopoietic stem cell transplantation; ALL – acute lymphoblastic leukemia; AML – acute myeloid leukemia; JMML – juvenile myelomonocytic leukemia; PID – primary immunodeficiency.

В группу сравнения были включены 115 пациентов с медианой возраста 7,8 (0,3–17,9) года с соотношением мальчиков и девочек 1,2:1 (55% и 45% соответственно). У большинства пациентов были диагностированы онкологические и онкогематологические заболевания (таблица). Статистически значимых различий между двумя группами пациентов получено не было.

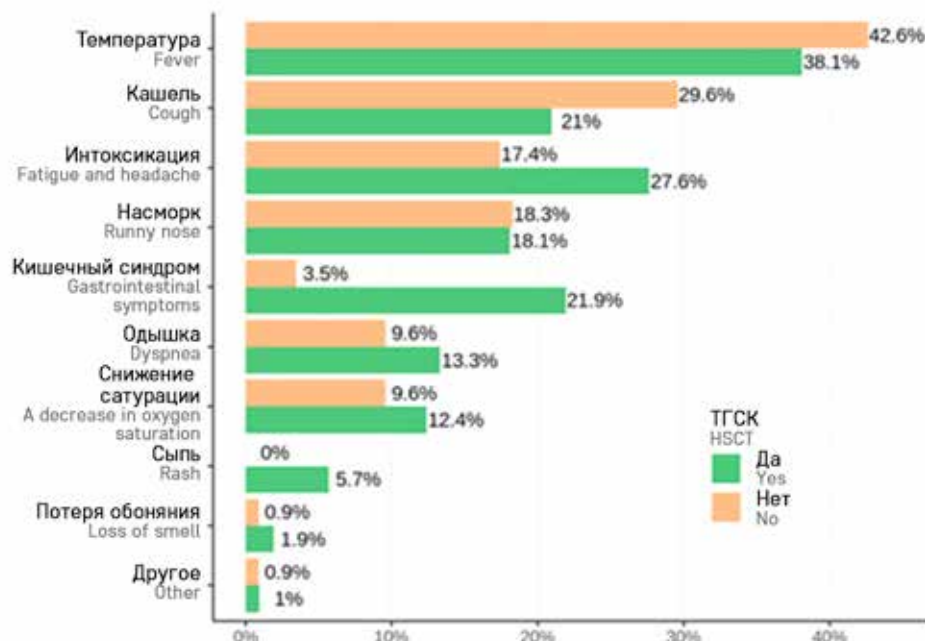
В исследуемой группе у 5 пациентов диагноз COVID-19 был установлен на этапе проведения кондиционирования, тогда как у 95% пациентов – после ТГСК с медианой срока развития заболевания 157 (1–1699) дней. При этом у 74 (70%) пациентов развитие инфекции COVID-19 отмечено на сроках менее 1 года от проведения ТГСК.

У 87% пациентов ($n = 90$) отмечалось бессимптомное и легкое течение COVID-19. У пациентов с клиническими проявлениями ($n = 63$) наиболее частыми симптомами были лихорадка, кишечный синдром и респираторная симптоматика (рисунок 1). При проведении сравнительного анализа клинических проявлений с группой без трансплантации у пациентов после ТГСК отмечалось более частое развитие дыхательной недостаточности (13% против 9,6%; $p = 0,4$) и кишечного синдрома (22% против 3,5%; $p < 0,001$). У пациентов с кишечным синдромом ($n = 23$) был проведен дополнительный анализ других возможных причин. Так, в 4 случаях была диагностирована кишечная форма реакции «трансплантат против хозяина» и в 8 – течение энтероколита другой вирусной этиологии (норовирус – 7,

Рисунок 1

Клинические проявления в группах пациентов с COVID-19 после ТГСК и без нее

Figure 1
The clinical manifestations of COVID-19 in the HSCT recipients and non-recipients



ротавирус – 1). При сравнении с нетрансплантированными пациентами частота кишечного синдрома (после исключения других возможных причин) составила 10,5% против 3,5% ($p = 0,07$).

Преимущественно у пациентов отмечалось развитие бессимптомной или легкой формы заболевания (86,1%), реже – тяжелой/крайне тяжелой (13,9%). У пациентов после проведения ТГСК в отличие от группы сравнения отмечалась тенденция к более частому (в 2,8 раза) развитию тяжелой и крайне тяжелой форм заболевания ($p = 0,03$) (рисунок 2).

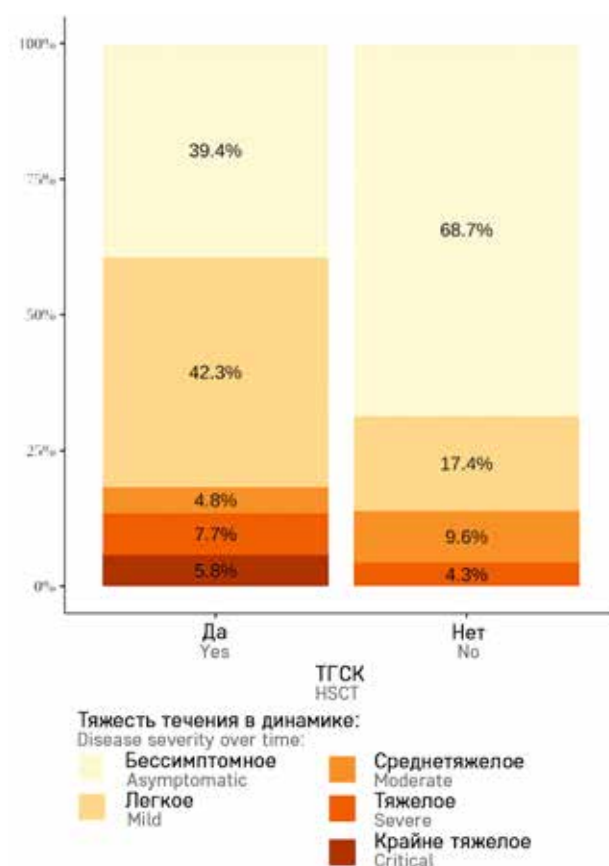
При анализе лабораторных данных медиана количества лейкоцитов составила $2,0 \times 10^9/\text{л}$ ($0-19,75 \times 10^9/\text{л}$), нейтрофилов – $1,6 \times 10^9/\text{л}$ ($0-8,0 \times 10^9/\text{л}$), лимфоцитов – $0,7 \times 10^9/\text{л}$ ($0-6,5 \times 10^9/\text{л}$), уровень С-реактивного белка – 2,0 (0–340) г/л. Фактором, ассоциированным с развитием более тяжелых форм COVID-19, явилась глубокая лимфопения: уровень лимфоцитов был статистически значимо ниже у пациентов с тяжелыми и крайне тяжелыми формами COVID-19 ($p = 0,002$) (рисунок 3). Статистически значимой ассоциации между уровнем нейтрофилов и развитием тяжелых форм COVID-19 выявлено не было ($p = 0,12$).

У 58 пациентов после ТГСК был проведен дополнительный анализ иммунореаконституции, критериями которой было количество лимфоцитов $\text{CD3} > 0,2 \times 10^9/\text{л}$ и $\text{CD19} > 0,05 \times 10^9/\text{л}$. Согласно результатам анализа 9 (15%) пациентов на момент развития COVID-19 являлись иммунокомпетентными, тогда как в 85% случаев иммунореаконституции не отмечалось. У пациентов без иммунореаконституции наблюдалась более длительная персистенция вируса COVID-19: 17 (2–134) дней против 13 (7–72) дней, однако статистически значимых различий получено

Рисунок 2

Распределение течения COVID-19 по формам тяжести у пациентов после ТГСК и без нее

Figure 2
The distribution of the severity of COVID-19 infection in the HSCT-recipients and non-recipients

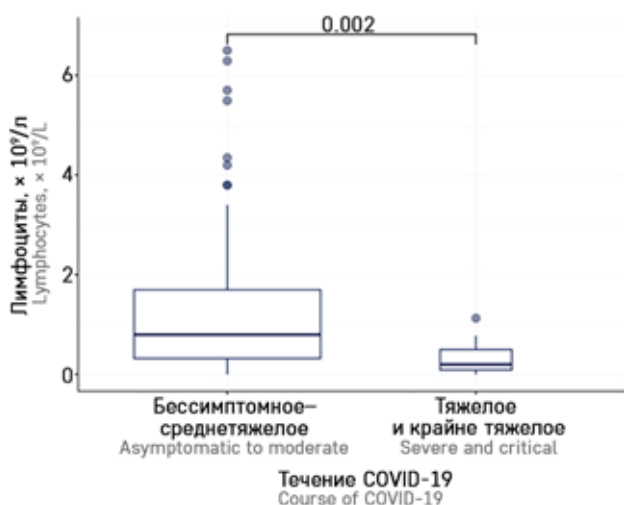


не было ($p = 0,7$), значимых различий между тяжестью течения и исходами COVID-19 также выявлено не было.

У пациентов после ТГСК медиана длительности выделения вируса COVID-19 составила

Рисунок 3
Тяжесть течения COVID-19 у пациентов после ТГСК и лимфопения

Figure 3
The severity of COVID-19 in the patients after HSCT and lymphopenia



22 (10–43) дня. При анализе групп пациентов в зависимости от тяжести течения COVID-19 был выявлен более длительный период персистенции вируса при тяжелых формах: 49 (2–152) дней против 19 (2–138) дней ($p < 0,001$). Однако у некоторых пациентов с бессимптомным и легким течением также отмечалась длительная детекция вируса COVID-19 (рисунок 4).

При анализе таких факторов как основной диагноз, ремиссия на момент COVID-19, сроки от даты ТГСК статистически значимой ассоциации с тяжестью течения COVID-19 выявлено не было (рисунки 5–7).

Пациентам после ТГСК, преимущественно при развитии тяжелых и крайне тяжелых форм COVID-19, назначали следующие виды терапии: антибактериальную, свежезамороженную плазму от реконвалесцентов COVID-19, противовирусную (ремдесивир), внутривенные иммуноглобулины, тоцилизумаб и моноклональные антитела (рисунок 8). Закономерно пациенты с крайне тяжелым течением нуждались в проведении искусственной вентиляции легких.

При проведении анализа влияния терапии на длительность течения COVID-19 значимой ассоциации между видами лечения и длительностью заболевания получено не было.

Одним из инновационных подходов лечения COVID-19 после ТГСК стала технология адоптивной клеточной терапии, которая была использована у пациентки 7 месяцев с диагнозом «тяжелая комбинированная иммунная недостаточность с иммунофенотипом T^+ , B^- , NK^+ , синдром дефицита Artemis» [6].

Пациентке на фоне персистирующей на протяжении 5 мес инфекции COVID-19 с КТ-картиной двусторонней полисегментарной пневмонии была выполнена ТГСК от гаплоидентичного донора

Рисунок 4
Длительность персистенции COVID-19 у пациентов после ТГСК в зависимости от тяжести течения инфекции COVID-19

Figure 4
The persistence of COVID-19 in the HSCT recipients according to the severity of the disease COVID-19
PCR – polymerase chain reaction

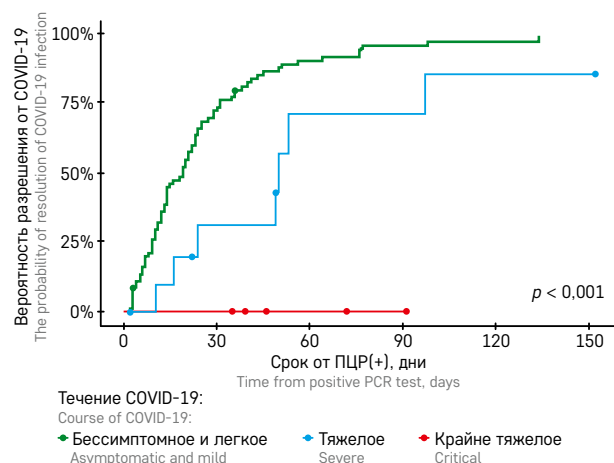
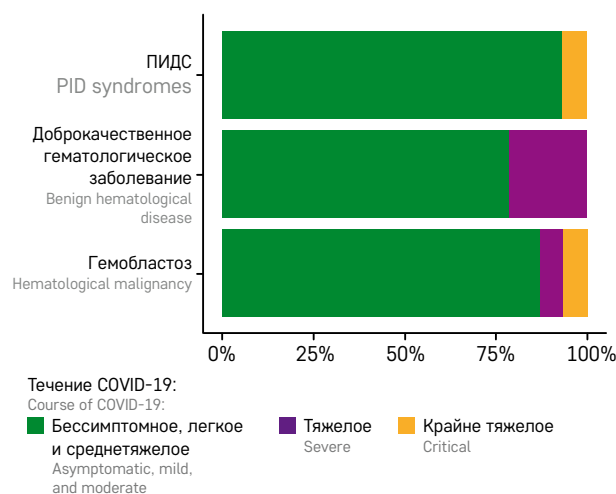


Рисунок 5
Отсутствие ассоциации между тяжестью течения COVID-19 и основным заболеванием ($p = 0,4$)

Figure 5
A lack of association between the severity of COVID-19 and primary disease ($p = 0,4$)



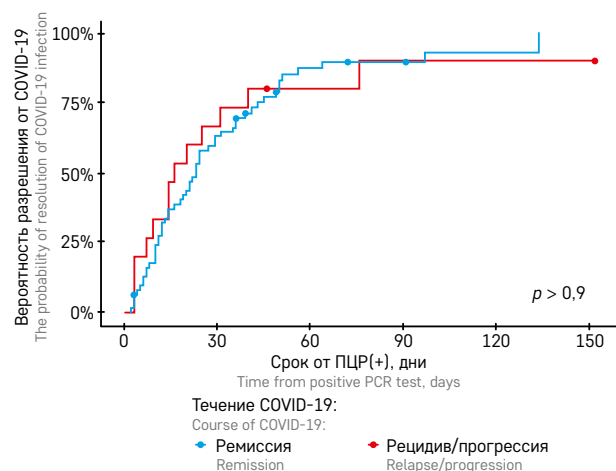
(отца). Отсроченная иммунореконституция после ТГСК в связи с $CD34^+$ -селекцией трансплантата и риск тяжелого течения COVID-19 стали основанием для проведения персонифицированного протокола клеточной терапии патогенспецифическими цитотоксическими Т-лимфоцитами, заготовленными от отца с помощью технологии “IFN- γ CAPTURE” (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Германия). Для получения клеточного продукта с высоким содержанием SARS-CoV-2-специфических лимфоцитов донору заранее была выполнена двукратная вакцинация препаратом Гам-КОВИД-Вак (ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва). Трансфузию специфичных к SARS-CoV-2 лимфоцитов в количестве $100 \times 10^3/\text{кг}$ провели на +35-й день

Рисунок 6

Отсутствие ассоциации между тяжестью течения COVID-19 и статусом ремиссии основного заболевания

Figure 6

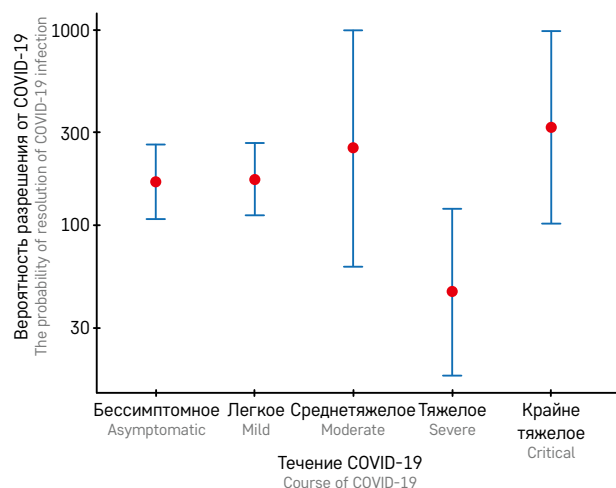
A lack of association between the severity of COVID-19 and the status of remission of primary disease

**Рисунок 7**

Оценка тяжести течения COVID-19 в зависимости от сроков после ТГСК

Figure 7

The severity of COVID-19 according to time from HSCT

**Рисунок 8**

Виды терапии COVID-19 у пациентов после ТГСК

Figure 8

Types of COVID-19 treatment given to the patients after HSCT



после ТГСК. Через 2 дня после трансфузии у пациентки отмечалось развитие синдрома выброса цитокинов и интерстициального отека легких, что наиболее вероятно было связано с проведенной терапией патогенспецифическими Т-лимфоцитами.

Разрешение легочного повреждения было достигнуто на фоне терапии глюкокортикостероидами и антицитокиновыми препаратами (тоцилизумаб и канакинумаб). Начиная с 14-го дня от момента введения Т-лимфоцитов ПЦР к SARS-CoV-2 не выявлялась, а по данным КТ органов грудной клетки регистрировалась стойкая положительная динамика. Клиренс SARS-CoV-2 и редукция клинической симптоматики соотносились с появлением через 4 нед лимфоцитов, специфичных к различным вирусным пептидам (CoV-M, CoV-N, CoV-S), подтвержденных методом ELISPOT.

Место клеточной терапии в лечении COVID-19 пока не определено в силу малого опыта ее использования, однако представленный клинический случай может быть веским аргументом для изучения и определения возможного вклада клеточных технологий в улучшение выживаемости пациентов после ТГСК.

При проведении анализа летальности было установлено, что медиана возраста умерших пациентов составила 14 лет в группе наблюдения против 8 лет в группе сравнения ($p = 0,044$).

Однолетняя общая выживаемость (ОВ) реципиентов ТГСК при развитии COVID-19 составила 88% и была ниже по сравнению с нетрансплантированными пациентами (рисунок 9). У пациентов с тяжелыми и крайне тяжелыми формами заболевания выживаемость была значимо ниже по сравнению с бессимптомным и легким течением и составила 46% против 98% ($p < 0,001$) (рисунок 10).

Влияния другой инфекции, сочетанной с COVID-19, и статуса ремиссии или прогрессии основного заболевания на ОВ пациентов выявлено не было ($p = 0,78$ и $p = 0,71$ соответственно).

В группе исследования у 25% пациентов после ТГСК было зарегистрировано повторное заражение либо реактивация COVID-19, при этом в отличие от первичного инфицирования более часто отмечалось развитие бессимптомных форм заболевания (60% против 39%).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

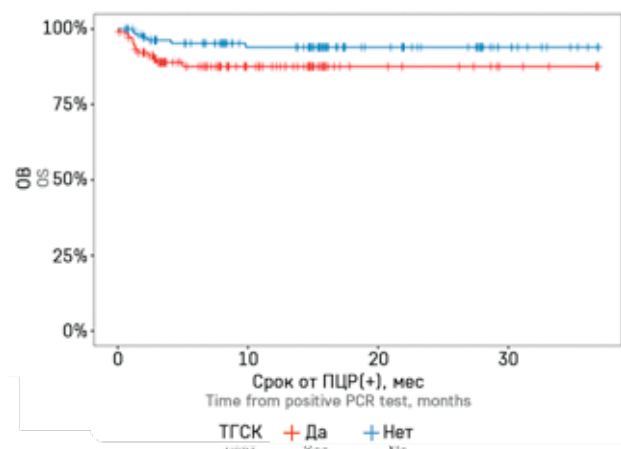
В наше исследование были включены иммунокомпрометированные пациенты, перенесшие COVID-19 после ТГСК. По сравнению с нетрансплантированными пациентами после ТГСК отмечалась более длительная персистенция вируса COVID-19, а наиболее длительный период детекции отмечался у пациентов с тяжелыми формами. Полученные данные

Рисунок 9

ОВ у пациентов после ТГСК и без нее (88% против 94%; $p = 0.077$)

Figure 9

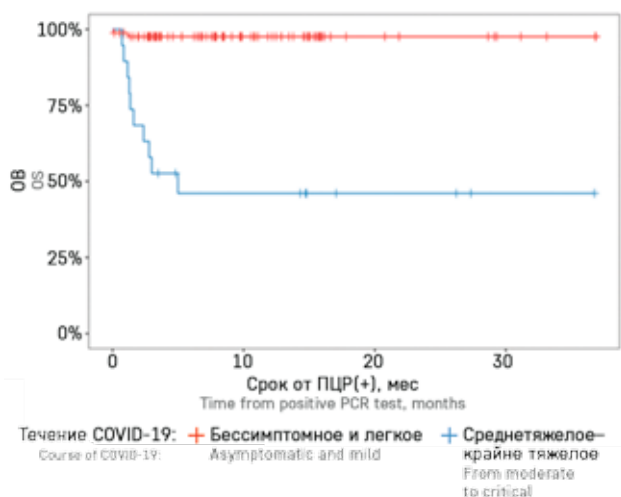
Overall survival (OS) rates of the HSCT recipients and non-recipients (88% vs 94%; $p = 0.077$)

**Рисунок 10**

ОВ пациентов после ТГСК в зависимости от тяжести течения COVID-19 (46% против 98%; $p < 0,001$)

Figure 10

OS of the HSCT recipients according to the severity of COVID-19 (46% vs 98%; $p < 0,001$)



сопоставимы с результатами международных исследований, подтверждающих более короткий период выделения SARS-CoV-2 у пациентов с бессимптомным и легким течением [7, 8]. Однако стоит отметить, что и в данной группе пациентов были случаи длительной персистенции вируса. При сопоставлении полученных данных со взрослыми пациентами отмечалась корреляция исходов COVID-19 с возрастом, корреляции с полом выявлено не было [9–12]. Установлено достоверное влияние тяжести течения инфекции COVID-19 на ОВ: у пациентов с тяжелыми и крайне тяжелыми формами заболевания она составила 46%, тогда как при более легких формах – 98%.

Результаты анализа клинических проявлений, полученные в ходе данного исследования, сопоставимы с результатами международных исследова-

ний: несмотря на проведение ТГСК, в большинстве случаев у пациентов отмечалось бессимптомное течение и легкие формы COVID-19 [13–17]. Статистически значимыми отличиями пациентов после ТГСК в сравнении с нетрансплантированными пациентами были тенденция к развитию дыхательной недостаточности и кишечного синдрома, а также более тяжелому течению COVID-19, что соответствовало данным международного исследования Европейского общества трансплантации костного мозга и Испанской группы по трансплантации [18].

Основной диагноз, наличие ремиссии или прогрессии основного заболевания, сроки от проведения ТГСК, а также наличие сочетанной инфекции у пациентов нашего исследования не оказали влияния на тяжесть течения и исход COVID-19, что коррелировало с результатами ретроспективного моноцентрового исследования НИИ ДОГиТ им. Р.М. Горбачевой [19]. Развитие COVID-19 как на ранних, так и на поздних сроках от ТГСК не было ассоциировано с тяжестью заболевания или исходами. Фактором, ассоциированным с более тяжелым течением, являлась лимфопения (уровень лимфоцитов менее $0,5 \times 10^9/\text{л}$), что было продемонстрировано в ранее проведенном исследовании [20]. Статистически значимых различий в тяжести заболевания и исходах COVID-19 у пациентов после ТГСК в зависимости от иммунореактивности выявлено не было.

В международных исследованиях факторами риска, влияющими на развитие тяжелых форм COVID-19 и неблагоприятного исхода заболевания, являлись нейтропения, лимфопения, наличие сопутствующих хронических заболеваний и системных инфекций, а также течение реакции «трансплантат против хозяина» и прием иммуносупрессивной терапии на момент развития COVID-19 [18, 21].

Пациенты в данном исследовании получали различные виды терапии, доступные в тот или иной момент времени с учетом сложности назначения препаратов в педиатрической практике. При проведении анализа влияния терапии на длительность течения COVID-19 значимой ассоциации между видами лечения и длительностью заболевания получено не было. ОВ реципиентов ТГСК составила 88%, при этом данные международных исследований варьируют. Так, по результатам многонационального исследования Европейского общества трансплантации костного мозга и Испанской группы по трансплантации, в которое вошли 62 пациента с медианой возраста 9 лет, ОВ составила 97% [18]. В то время как в многонациональном исследовании детей до 19 лет с онкогематологическими заболеваниями после ТГСК и COVID-19, в которое включили

131 пациента с медианой возраста 8 лет, ОВ составила 95%.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Частота развития COVID-19 после ТГСК в нашем исследовании составила 12,5%.

У реципиентов ТГСК в сравнении с нетрансплантированными пациентами достоверно чаще отмечалось развитие более тяжелых форм COVID-19. Наиболее частыми клиническими симптомами являлись лихорадка, дыхательная недостаточность и кишечный синдром.

Наиболее значимым фактором, ассоциированным с риском развития тяжелых форм COVID-19, являлась лимфопения. Корреляции таких факторов как диагноз основного заболевания, наличие ремиссии/рецидива, сроки и наличие иммунореконституции после ТГСК, а также сочетанная инфекция не оказали влияния на тяжесть течения COVID-19 или исход заболевания пациентов в нашем исследо-

вании. Значимой ассоциации между видами лечения и длительностью течения COVID-19 получено не было. ОВ реципиентов ТГСК составила 88%. У пациентов с тяжелыми и крайне тяжелыми формами COVID-19 отмечались более длительная персистенция вируса и достоверно более низкая выживаемость.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Не указан.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

ORCID

Vereshchagina A.O. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5606-4335>

Solopova G.G. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1680-7269>

Popova M.O. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8536-5495>

Bykova T.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4456-2369>

Balashov D.N. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2689-0569>

Suvorova N.V. ORCID: <https://orcid.org/0009-0009-6291-8849>

Rozanceva E.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5269-5508>

Levin P.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2410-1223>

Zubarovskaya L.S. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2594-7703>

Novichkova G.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2322-5734>

Литература / References

- World Health Organization. Coronavirus disease (COVID-19) pandemic. [Electronic resource] URL: <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019>; 2023 (accessed 13 April 2023).
- Vardavas C.I., Mathioudakis A.G., Nikitara K., Stamatiopoulos K., Georgiopoulos G., Phalkey R., et al. Prognostic factors for mortality, intensive care unit and hospital admission due to SARS-CoV-2: a systematic review and meta-analysis of cohort studies in Europe. *Eur Respir Rev* 2022; 31 (166): 220098. DOI: 10.1183/16000617.0098-2022
- Ryan L. Vaccinated but not protected-living immunocompromised during the pandemic. *JAMA* 2021; 325 (24): 2443–4. DOI: 10.1001/jama.2021.9321
- Balashov D., Trakhtman P., Livshits A., Kovalenko I., Tereshenko G., Solopova G., et al. SARS-CoV-2 convalescent plasma therapy in pediatric patient after hematopoietic stem cell transplantation. *Transfus Apher Sci* 2021; 60 (1): 102983.
- Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19). Временные методические рекомендации Министерства здравоохранения Российской Федерации. Версия 8 от 3.09.2020. [Электронный ресурс] URL: https://static-0.minzdrav.gov.ru/system/attachments/attaches/000/051/777/original/030902020_COVID-19_v8.pdf. (дата обращения 14.04.2024). [Prevention, diagnosis and treatment of the novel coronavirus infection (COVID-19). Temporary guidelines of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation. Version 8 dated 03.09.2020 [Electronic resource] URL: https://static-0.minzdrav.gov.ru/system/attachments/attaches/000/051/777/original/030902020_COVID-19_v8.pdf. (Access date 14.04.2024). (In Russ.)].
- Леонтьева М.Е., Султанова Э.П., Радыгина С.А., Скворцова Ю.Б., Музалевский Я.О., Курникова Е.Е. и др. Использование адоптивной клеточной терапии для лечения SARS-CoV-2 у пациента после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2022; 21 (2): 112–7. DOI: 10.24287/1726-1708-2022-21-2-112-117 [Leontyeva M.E., Sultanova E.R., Radygina S.A., Skvortsova Yu.V., Muzalevskiy Ya.O., Kurnikova E.E., et al. The use of adoptive cell therapy for the treatment of SARS-CoV-2 in a patient after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology* 2022; 21 (2): 112–7. (In Russ.)].
- Haesler G.M., Amman R.A., Carlesse F., Groll A.H., Averbuch D., Costagnola E., et al. SARS-CoV-2 in children with cancer or following haematopoietic stem cell transplant: an analysis of 131 patients. *Eur J Cancer* 2021; 159: 78–86.
- Lu Y., Li Y., Deng W., Liu M., He Y., Huang L., et al. Symptomatic infection is associated with prolonged duration of viral shedding in mild coronavirus disease 2019: a retrospective study of 110 children in Wuhan. *Pediatr Infect Dis J* 2020; 39 (7): e95–9.
- Sharma A., Bhatt N.S., St Martin A., Abid M.B., Bloomquist J., Chemaly R.F., et al. Clinical characteris-

- tics and outcomes of COVID-19 in haematopoietic stem-cell transplantation recipients: an observational cohort study. *Lancet Haematol* 2021; 8: e185–93. DOI: 10.1016/S2352-3026(20)30429-4
10. Pagano L., Salmanton-García J., Marchesi F., Busca A., Corradini P., Hoenigl M., et al. EPICVIDEHA working group. COVID-19 infection in adult patients with hematological malignancies: a European Hematology Association Survey (EPICVIDEHA). *J Hematol Oncol* 2021; 14 (1): 168. DOI: 10.1186/s13045-021-01177-0
 11. Ljungman P., de la Camara R., Mikulska M., Tridello G., Aguado B., Al Zahrani M., et al. COVID-19 and stem cell transplantation; results from an EBMT and GETH multicenter prospective survey. *Leukemia* 2021; 35: 2885–94. DOI: 10.1038/s41375-021-01302-5
 12. Aleshina O., Zakurdaeva K., Vasilieva A., Dubov S., Dubov V., Vorobyev V., et al. Clinical outcomes in patients with COVID-19 and hematologic disease. [Electronic resource] URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=Samoylova%20OS%5BAuthor%5D> (accessed 14.04.2024).
 13. Lu X., Zhang L., Du H., Jiang Zh., Li Y., Qu J., et al. SARS-CoV-2 infection in children. *N Engl J Med* 2020; 382: 1663–5. (accessed 13 April 2023).
 14. Kuczborska K., Książyk J. Prevalence and Course of SARS-CoV-2 Infection among Immunocompromised Children Hospitalised in the Tertiary Referral Hospital in Poland. *J Clin Med* 2021; 10 (19): 4556. DOI: 10.3390/jcm10194556
 15. Ji L.-N., Chao S., Wang Y.-J., Li X.-J., Mu X.-D., Lin M.-G., et al. Clinical features of pediatric patients with COVID-19: a report of two family cluster cases. *World J Pediatr* 2020; 16 (3): 267–70.
 16. Wei M., Yuan J., Liu Y., Fu T., Yu X., Zhang Z.-J. Novel coronavirus infection in hospitalized infants under 1 year of age in China. *JAMA* 2020; 323: 1313–4.
 17. Connelly J.A., Chong H., Esben-shade A.J., Frame D., Failing C., Secord E., Walkovich K. Impact of COVID-19 on Pediatric Immunocompromised Patients. *Pediatr Clin North Am* 2021; 68 (5): 1029–54.
 18. Averbuch D., De La Camara R., Corbacioglu S., Mikulska M., Piñana Sanchez J.L. et al. COVID-19 in Children Following Hematopoietic Cell Transplantation: A Multinational Study of the European Bone Marrow Transplantation Society (EBMT) and the Spanish Group of Hematopoietic Stem Cell Transplantation (GETH). *Blood* 2021; 138 (S1): 2866. DOI: 10.1182/blood-2021-146748
 19. Синяев А.А., Гриненко А.О., Попова М.О., Рогачева Ю.А., Спиридонова А.А., Власова Ю.Ю. и др. Новая коронавирусная инфекция у реципиентов трансплантации гемопоэтических стволовых клеток. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия 2022; (3): 196–201. DOI: 10.36488/смас.2022.3.196-201 [Siniaev A.A., Grinenko A.O., Popova M.O., Rogacheva Yu.A., Spiridonova A.A., Vlasova Yu.Yu., et al. COVID-19 infection in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy* 2022; (3): 196–201. (In Russ.)].
 20. Солопова Г.Г., Цыганова Е.В., Кондрашова А.В., Гордеева Г.Н., Розанцева Е.В., Бегунова С.В. и др. Особенности течения новой коронавирусной инфекции COVID-19 у детей с онкологическими, онкогематологическими и тяжелыми иммунологическими заболеваниями. Опыт НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2021; 20 (4): 89–99. doi: 10.24287/1726-1708-2021-20-4-89-99 [Solopova G.G., Tsyganova E.V., Kondrashova A.V., Gordeeva G.N., Rozantseva E.V., Begunova S.V., et al. The novel coronavirus disease (COVID-19) in children with cancer, hematologic malignancies, and severe immunodeficiencies. Results of monocenter study. *Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology* 2021; 20 (4): 89–99. (In Russ.)].
 21. Haeusler G.M., Ammann R.A., Carlesse F., Groll A.H., Averbuch D., Castagnola E., et al. SARS-CoV-2 in children with cancer or after haematopoietic stem cell transplant: An analysis of 131 patients. *Eur J Cancer* 2021; 159: 78–86.

© 2024 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ
им. Дмитрия Рогачева»
Минздрава России
Поступила 12.04.2024
Принята к печати 14.05.2024



EDN: DXATVO

DOI: 10.24287/1726-1708-2024-23-2-116-127

Осложнения высокодозной полихимиотерапии с последующей аутологичной трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток у детей с солидными злокачественными новообразованиями: опыт одного Центра

Т.З. Алиев¹, К.И. Киргизов¹, Е.Б. Мачнева¹, И.О. Костарева¹, К.А. Сергеенко¹, Д.С. Смирнова¹, Н.А. Бурлака¹, Ю.В. Лозован¹, И.Ю. Трушкова¹, А.Ю. Елфимова¹, К.В. Митраков¹, Т.И. Потемкина¹, М.Д. Малова¹, Р.Р. Фатхуллин¹, Н.Г. Степанян¹, О.А. Капкова¹, Г.Б. Сагоян¹, А.М. Сулейманова¹, Н.В. Матинян¹, Г.М. Муфтахова¹, А.П. Казанцев¹, О.М. Романцова¹, М.В. Рубанская¹, Т.Л. Ушакова¹, А.Д. Родина¹, В.В. Жогов¹, В.Ш. Ванесян¹, Ю.В. Скворцова², И.В. Казанцев³, А.С. Слинин², Т.В. Горбунова¹, Т.Т. Валиев¹, В.Г. Поляков¹, С.Р. Варфоломеева¹

¹Научно-исследовательский институт детской онкологии и гематологии им. акад. РАМН Л.А. Дурнова ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва

²ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, Москва

³Научно-исследовательский институт детской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р.М. Горбачевой ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России, Санкт-Петербург

Контактная информация:

Алиев Теймур Зейнал оглы,
врач-детский онколог отделения детской
трансплантации костного мозга
и гемопоэтических стволовых клеток НИИ
детской онкологии и гематологии ФГБУ
«НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России
Адрес: 115522, Москва,
Каширское шоссе, 23
E-mail: timaliev118@gmail.com

Высокодозная полихимиотерапия (ВДПХТ) с последующей аутологической трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток (ауто-ТГСК) является терапевтической опцией, которая позволяет потенцировать противоопухолевый эффект у пациентов со злокачественными новообразованиями (ЗНО), относящихся к группе высокого риска. Однако, несмотря на эффективность данного метода, более высокие по сравнению со стандартными протоколами лечения риски развития инфекционных и токсических осложнений в раннем и позднем посттрансплантационных периодах способны значительно ухудшить результаты трансплантации. Нами проведен ретроспективный анализ результатов ауто-ТГСК в когорте из 156 пациентов с солидными ЗНО группы высокого риска, получавших лечение в НИИ детской онкологии и гематологии им. акад. РАМН Л.А. Дурнова ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России в 2020–2023 гг. Исследование одобрено независимым этическим комитетом и утверждено решением ученого совета НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина. В исследование были включены 78 (50%) мальчиков и 78 (50%) девочек, медиана возраста пациентов составила 8 лет 7 месяцев (9 месяцев – 17 лет 8 месяцев). Ауто-ТГСК была проведена 90 (57,7%) пациентам с нейробластомой, 25 (16,0%) – с саркомой Юинга, 16 (10,3%) – с герминогенноклеточными опухолями, 13 (8,4%) – с нефробластомой, 7 (4,5%) – с ретинобластомой, 3 (1,9%) – с медуллобластомой, 1 (0,6%) – с плеврорупульмональной бластомой и 1 (0,6%) – с сиалобластомой. Использовались режимы кондиционирования в составе: треосульфат + мелфалан ($n = 116$), карбоплатин + тиотепа + этопозид ($n = 17$), мелфалан ($n = 13$), карбоплатин + тиотепа + этопозид + циклофосфамид ($n = 10$). В зависимости от клинических показаний и используемого протокола лечения у 136 (87,2%) пациентов был проведен 1 курс ВДПХТ, а в 20 (12,8%) случаях выполнена тандемная ВДПХТ. У большинства пациентов медиана времени восстановления количества гранулоцитов и тромбоцитов составила 11 (8–19) дней и 14 (12–21) дней соответственно. Наиболее частыми инфекционными осложнениями у пациентов после ауто-ТГСК были мукозит (89,1%), нейтропенический энтероколит (76,9%), фебрильная нейтропения (71,2%), реке катетер-ассоциированная инфекция кровотока (9%), пневмония (14,1%), острый респираторный дистресс-синдром (0,6%). Среди токсических осложнений у всех пациентов отмечался эметический синдром, у 98 (62,8%) – дерматологическая токсичность, у 9 (5,8%) – геморрагический цистит, у 116 (74,3%) – печеночная токсичность, у 14 (9%) – нейротоксичность, у 102 (65,4%) – нутритивная недостаточность средней тяжести. Эпизоды геморрагического синдрома на фоне тромбоцитопении развивались у 44,2% пациентов. В большинстве случаев после ауто-ТГСК развиваются химиоиндуцированные (в том числе инфекционные) осложнения, которые могут не только значительно нарушать самочувствие и качество жизни пациента, но и в зависимости от степени выраженности представлять опасность для жизни. Правильный выбор режима кондиционирования, эффективный сбор гемопоэтических стволовых клеток, комплексная сопроводительная терапия, своевременная диагностика и лечение осложнений позволяют значительно улучшить результаты ауто-ТГСК у детей с солидными ЗНО высокого риска.

Ключевые слова: аутологичная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток, высокодозная химиотерапия, группа высокого риска, детская онкология, солидные опухоли, токсичность, осложнения, дети

Алиев Т.З. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2024; 23 (2): 116–127.
DOI: 10.24287/1726-1708-2024-23-2-116-127

Complications of high-dose chemotherapy followed by autologous hematopoietic stem cell transplantation in children with solid malignant neoplasms: a single-center experience

© 2024 by «D. Rogachev NMRCPhO»

Received 12.04.2024

Accepted 14.05.2024

T.Z. Aliev¹, K.I. Kirgizov¹, E.B. Machneva¹, I.O. Kostareva¹, K.A. Sergeenko¹, D.S. Smirnova¹, N.A. Burlaka¹, Yu.V. Lozovan¹, I.Yu. Trushkova¹, A.Yu. Elfimova¹, K.V. Mitrakov¹, T.I. Potemkina¹, M.D. Malova¹, R.R. Fatkhullin¹, N.G. Stepanyan¹, O.A. Kapkova¹, G.B. Sagoyan¹, A.M. Suleymanova¹, N.V. Matinyan¹, G.M. Muftakhova¹, A.P. Kazantsev¹, O.M. Romantsova¹, M.V. Rubanskaya¹, T.L. Ushakova¹, A.D. Rodina¹, V.V. Zhogov¹, V.Sh. Vanesyan¹, Yu.V. Skvortsova², I.V. Kazantsev³, A.S. Slinin², T.V. Gorbunova¹, T.T. Valiev¹, V.G. Polyakov¹, S.R. Varfolomeeva¹

¹The L.A. Durnov Research Institute of Pediatric Oncology and Hematology, the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow

²The Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology of Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow

³The R.M. Gorbacheva Research Institute for Pediatric Oncology, Hematology and Transplantation of the I.P. Pavlov First Saint Petersburg State Medical University of Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Saint Petersburg

High-dose chemotherapy (HDCT) followed by autologous hematopoietic stem cell transplantation (auto-HSCT) is a therapeutic option that allows potentiating the antitumor effect in patients with malignant neoplasms (MNs) belonging to the high-risk group. However, despite the effectiveness of this method, the risks of developing infectious and toxic complications in the early and late post-transplantation period are higher than the risks associated with treatment according to standard protocols and can significantly worsen the results of transplantation. We carried out a retrospective analysis of the results of auto-HSCT in a cohort of 156 patients with high-risk solid MNs treated at the L.A. Durnov Research Institute of Pediatric Oncology and Hematology, the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of Ministry of Healthcare of the Russian Federation in 2020–2023. The study was approved by the Independent Ethics Committee and the Scientific Council of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology. The study included 78 (50%) boys and 78 (50%) girls, the median age of the patients was 8 years 7 months (9 months – 17 years 8 months). Auto-HSCT was performed in 90 (57.7%) patients with neuroblastoma, 25 (16.0%) – with Ewing's sarcoma, 16 (10.3%) – with germ cell tumors, 13 (8.4%) – with nephroblastoma, 7 (4.5%) – with retinoblastoma, 3 (1.9%) – with medulloblastoma, 1 (0.6%) patient with pleuropulmonary blastoma and 1 (0.6%) patient with sialoblastoma. We used the following conditioning regimens: treosulfan + melphalan ($n = 116$), carboplatin + thiotepa + etoposide ($n = 17$), melphalan ($n = 13$), carboplatin + thiotepa + etoposide + cyclophosphamide ($n = 10$). Depending on the clinical indications and the treatment protocol used, 136 (87.2%) patients underwent one course of HDCT, and 20 (12.8%) patients underwent tandem HDCT. In most patients, the median recovery time for granulocytes and platelets was 11 (8–19) days and 14 (12–21) days, respectively. The most common infectious complications in patients after auto-HSCT were mucositis (89.1%), neutropenic enterocolitis (76.9%), febrile neutropenia (71.2%), less often: catheter-associated bloodstream infection (9%), pneumonia (14.1%), acute respiratory distress syndrome (0.6%). As regards toxic complications, all patients had emetic syndrome, 98 (62.8%) had dermatological toxicity, 9 (5.8%) had hemorrhagic cystitis, 116 (74.3%) had hepatic toxicity, 14 (9%) had neurotoxicity, 102 (65.4%) had moderate nutritional insufficiency. Episodes of hemorrhagic syndrome due to thrombocytopenia were observed in 44.2% of patients. After auto-HSCT, most patients develop chemotherapy-induced (including infectious) complications, which can not only significantly disrupt the patients' well-being and quality of life, but also, depending on the severity, pose a threat to their life. The correct choice of conditioning regimen, effective collection of hematopoietic stem cells, complex accompanying therapy, timely diagnosis and treatment of complications can significantly improve the results of auto-HSCT in children with high-risk solid MNs.

Key words: autologous hematopoietic stem cell transplantation, high-dose chemotherapy, high-risk group, pediatric oncology, solid tumors, toxicity, complications, children

Aliev T.Z., et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology 2024; 23 (2): 116–27.

DOI: 10.24287/1726-1708-2024-23-2-116-127

Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) является эффективным и нередко единственным радикальным методом терапии ряда злокачественных и тяжелых неопухолевых заболеваний. Аутологичная (ауто-ТГСК) и аллогенная (алло-ТГСК) ТГСК улучшают исходы лечения у пациентов с рядом солидных злокачественных новообразований (ЗНО) и гемобластозов [1].

Улучшение показателей выживаемости у пациентов с солидными ЗНО высокой группы риска возможно благодаря более выраженному противоопухолевому эффекту высокодозной полихимиотерапии (ВДПХТ) с последующей ауто-ТГСК по сравнению со стандартными режимами химиотерапии. Однако помимо противоопухолевого и миелоаблативного эффекта у подобной терапии более выражены и токсические проявления, которые нередко носят тяжелый характер и могут приводить к жизнеугрожающим осложнениям [1–3].

Согласно рекомендациям Европейского общества по трансплантации крови и костного мозга (European Society of Blood and Marrow Transplantation, EBMT) 2019 г., использование ВДПХТ с последующей ауто-

ТГСК является стандартной терапевтической опцией при таких ЗНО, как нейробластома, саркома Юинга, рецидив лимфомы Ходжкина (при условии достижения повторной ремиссии заболевания), герминогенноклеточные опухоли, неходжкинские лимфомы, саркомы мягких тканей, нефробластома, а также опухоли центральной нервной системы (ЦНС) [4]. Данный метод терапии приводит к достижению лучших показателей как общей, так и бессобытийной выживаемости, однако сопровождается достаточно высокими рисками тяжелых инфекционных осложнений, токсичности в раннем и позднем посттрансплантационных периодах [4].

В настоящее время чрезвычайно актуальным остается вопрос выбора тактики противоопухолевой терапии у пациентов детского возраста с ЗНО высокой группы риска (с факторами неблагоприятного прогноза), при этом сохраняется тенденция к расширению показаний к ее интенсификации с использованием методов агрессивной полихимиотерапии, ВДПХТ с ауто-ТГСК, а также новых таргетных препаратов и иммунотерапии. Ограничивающими факторами являются достаточно высокая токсич-

Correspondence:

Teymur Z. Aliev, a pediatric oncologist at the Department of Pediatric Bone Marrow and Hematopoietic Stem Cell Transplantation of the L.A. Durnov Research Institute of Pediatric Oncology and Hematology of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Healthcare of the Russian Federation. Address: 23 Kashirskoe Highway, Moscow 115522, Russia E-mail: timaliev118@gmail.com

ность метода ВДПХТ с ауто-ТГСК, сопряженная как с развитием инфекционных осложнений в раннем посттрансплантационном периоде, так и отсроченной токсичности со стороны различных органов и систем, в ряде случаев препятствующей продолжению специфической противоопухолевой терапии [5].

Согласно международному опыту, предпочтительным источником гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) при выполнении ауто-ТГСК являются периферические стволовые клетки (ПСК). К преимуществам их использования по сравнению со стволовыми клетками костного мозга можно отнести меньшую инвазивность метода получения ПСК с использованием процедуры афереза, получение материала более высокой клеточности, а также более ранние сроки приживления гранулоцитарного и мегакариоцитарного ростков кроветворения [6]. Ограничивающими факторами к использованию ПСК могут являться ранний возраст и низкая масса тела пациентов, сопряженные с техническими сложностями проведения процедуры афереза, а также неудовлетворительные результаты мобилизации ПСК с применением гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (Г-КСФ) [7, 8]. В указанных клинических ситуациях выполнение миелоэкспузии является методом выбора. Для успешного проведения ауто-ТГСК необходимо предварительно заготовить достаточное количество CD34⁺ ГСК, получаемых при успешно выполненной мобилизации и процедуре афереза. Нередко даже при интенсивном режиме стимуляции собрать должное число ГСК не представляется возможным, что требует отказа от данного этапа терапии. Достаточным числом CD34⁺-клеток в трансплантате для ауто-ТГСК считается не менее $2 \times 10^6/\text{кг}$, что требует эффективной мобилизации и достаточного уровня CD34⁺ в периферической крови в день афереза [9].

Скорость восстановления функции трансплантата после ВДПХТ с последующей ауто-ТГСК зависит от возникших осложнений, гистогенеза ЗНО, объема и токсичности предшествующей терапии. В среднем время восстановления составляет 1,5–2 нед при стимуляции лейкопоза Г-КСФ. Однако иммунная реконституция занимает не менее нескольких месяцев из-за длительного процесса восстановления лимфоцитов, и у некоторых пациентов иммунный дефицит сохраняется в течение нескольких лет после ТГСК [10].

Среди всех осложнений у пациентов, получивших ВДПХТ с ауто-ТГСК, наиболее частыми и значимыми являются инфекционные, преимущественно бактериальной этиологии. Вероятность возникновения и степень тяжести инфекционного процесса во многом зависят от возраста пациента, его соматического статуса на момент проведения ВДПХТ, сопут-

ствующей патологии, объема терапии в индукции, а также используемого режима кондиционирования [11]. Частота развития инфекционных осложнений обуславливает необходимость тщательного клинического и лабораторного мониторинга в период проведения ВДПХТ и в раннем посттрансплантационном периоде в целях своевременной диагностики инфекционного процесса и раннего старта противомикробной терапии [11]. Согласно представленным публикациям, целесообразно превентивное назначение антибиотиков широкого спектра действия с момента развития постцитостатического агранулоцитоза [11–15].

Инфекции кровотока являются одной из частых бактериальных инфекций у пациентов после ВДПХТ, развиваются в 5–10% случаев при ауто-ТГСК и в 20–50% при алло-ТГСК [16]. В раннем посттрансплантационном периоде, в период аплазии кроветворения и нарушения анатомических барьеров (повреждение слизистой оболочки и сосудистого эндотелия) вероятность развития инфекционных осложнений является наиболее высокой. Основными инфекционными возбудителями являются грамположительные кокки (*Coagulase-negative Staphylococcus*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococci*, *Streptococcus viridans*), грамотрицательные палочки (*Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*). Клинические проявления варьируют от бактериемии/сепсиса до пневмонии, синусита, диареи, проктита и целлюлита [17, 18]. При использовании режимов ВДПХТ со сниженной миелотоксичностью и мукозальной токсичностью, например при применении немиелоаблативных протоколов, риск инфицирования в посттрансплантационном периоде снижается. Напротив, риск инфекционных осложнений выше при более медленном восстановлении функции трансплантата и иммунной реконституции [16, 19].

Мукозит относится к одному из наиболее частых проявлений острой эпителиальной токсичности, связанной с химиотерапией, которая возникает в раннем посттрансплантационном периоде. Проявлениями химиоиндуцированного поражения слизистой оболочки полости рта могут быть ее воспаление, кровотечение из десен, боль на фоне воспаления, изменение вкусовых ощущений, и, как следствие, затруднение приема пищи и жидкости [20]. Частота встречаемости орального мукозита составляет в среднем от 20 до 40% среди пациентов, получающих цитотоксическую химиотерапию в стандартных дозах, и достигает 80% у пациентов после ТГСК, особенно при использовании миелоаблативного препаративного режима, лучевой терапии [21].

По данным международной литературы, частота реактивации цитомегаловируса (ЦМВ) у реципиентов ауто-ТГСК составляет от 30 до 50%, что коррели-

рует с частотой реактивации при алло-ТГСК, но при этом частота возникновения ЦМВ-болезни после ауто-ТГСК не превышает 1% [22]. В работе Hussein и соавт. у детей с солидными опухолями группы высокого риска и лимфомами частота реактивации ЦМВ составила 31% [23]. Факторами, влияющими на развитие данного осложнения, являются объем предшествующей терапии, источник ГСК, количество CD34⁺-клеток на 1 кг веса реципиента, режим кондиционирования, режим вирусной профилактики, сроки приживления трансплантата и серологический статус пациента на момент ВДПХТ [24]. ЦМВ-болезнь также представляется как неблагоприятный фактор развития костномозговой недостаточности [25].

Кровотечения и тромботические осложнения являются важной причиной смерти у пациентов после ВДПХТ с ауто-ТГСК. Основные тромботические осложнения включают в себя венозную тромбоэмболию, в том числе тромбоз, связанный с наличием центрального венозного катетера, синдром синусоидальной обструкции и ассоциированную с трансплантацией тромботическую микроангиопатию, в то время как кровотечение может затрагивать желудочно-кишечный тракт или дыхательные пути и чаще всего встречается у пациентов с тромбоцитопенией [26]. К числу факторов, предрасполагающих к развитию как тромбозов, так и кровотечений в посттрансплантационном периоде относятся особенности течения основного заболевания и объем терапии в индукции, состояние тромбоцитарного и коагуляционного гемостаза, высокие дозы химиопрепаратов, инфекции, сосудистые катетеры и длительная иммобилизация [27, 28].

Химиотерапевтические препараты, входящие в режимы кондиционирования перед ТГСК, могут вызывать токсические осложнения, затрагивающие различные органы и системы [29–31]. Часто встречаются поражения кожи, начиная от аллергических реакций и заканчивая инфекционными осложнениями, сопутствующими химиоиндуцированной иммуносупрессии и нейтропении. Существует несколько теорий относительно патофизиологии токсических поражений кожи (например, влияние трения кожи, травматизации, градиента температур), однако основным механизмом развития признано токсическое повреждение клеток протока эккринных (потовых) желез и эпидермиса. У более 50% больных наблюдается диффузная эритема с последующей десквамацией эпителия и гиперпигментацией. Характерные места локализации токсических поражений, ассоциированных с химиотерапией, могут быть частично объяснены высокой плотностью эккринных желез на ладонях, подошвах, в естественных складках кожи. Согласно данным EBMT, практически у каждого пациента после ТГСК

развиваются осложнения, затрагивающие кожу и ее придатки [4, 31–35].

Геморрагический цистит (ГЦ) является одним из значимых осложнений после ВДПХТ. Отмечается как ранняя (на момент ВДПХТ или через 48 ч от окончания кондиционирования), так и поздняя (в период восстановления гранулоцитарного роста на 2–4-й неделе от начала ВДПХТ) манифестация. В основе ранних проявлений лежит токсическое воздействие метаболитов химиопрепаратов и лучевой терапии на слизистую оболочку мочевого пузыря. Одновременное наличие коагулопатии, тяжелой тромбоцитопении и воспаления слизистой оболочки является предрасполагающим фактором для любого типа ГЦ [36]. Основным фактором риска для позднего начала ГЦ является инфицирование полиомавирусом ВК, значительно реже аденовирусом, ЦМВ и другими герпесвирусами [37].

Повреждение печени, вызванное чужеродными веществами (ксенобиотиками), также нередко встречается при ВДПХТ у пациентов с солидными ЗНО. Частой причиной гепатотоксичности является лекарственное поражение печени. Поскольку гепатотоксичность на фоне противоопухолевой терапии чаще всего обусловлена идиосинкразией, возможности лекарственной коррекции и/или лечения ее весьма ограничены [38]. В большинстве клинических ситуаций коррекция/лечение лекарственно-индуцированной гепатотоксичности невозможны без редукции доз противоопухолевых химиопрепаратов. Разработка более эффективных стратегий предотвращения синдрома синусоидальной обструкции оказала заметное влияние на клиническую переносимость режимов кондиционирования. Использование профилактики противовирусными и противогрибковыми препаратами значительно снизило заболеваемость наиболее распространенными инфекциями печени [39, 40].

Неинфекционные осложнения со стороны дыхательной системы как в раннем, так и в позднем посттрансплантационных периодах (частота встречаемости 25–55%) могут привести к летальному исходу. Ранее было отмечено, что около 50% всех легочных осложнений, наблюдаемых после ВДПХТ, имели инфекционный генез, но использование антимикробных средств широкого спектра действия позволило обратить внимание специалистов на неинфекционные причины поражения легких. С диагностической целью используются как инструментальные методы исследования, так и инвазивные/неинвазивные методы поиска [41]. При ауто-ТГСК и алло-ТГСК нередко развиваются неинфекционные осложнения со стороны легких, 20% из которых представлены отеком легких в 1-ю неделю после трансплантации [42, 43], чаще связанным с течением инфекционного процесса в первые 2 нед от ауто-ТГСК [44].

Ряд химиотерапевтических агентов, включаемых в режимы предтрансплантационного кондиционирования, способны вызывать различные проявления нейротоксичности. Наибольшей нейротоксичностью обладают такие препараты, как бусульфан, тиотепа, флударабин, треосульфат, карбоплатин, этопозид и др. [4, 45]. В сравнении с бусульфаном нейротоксичность у пациентов, получающих треосульфат, встречается реже за счет более низкого потенциала треосульфата и его активного метаболита моноэпоксида треосульфата проникать через гематоэнцефалический барьер. Согласно данным литературы, распространенность неврологических осложнений после ТГСК колеблется от 8 до 65%. Среди неврологических осложнений трансплантации значимую роль играет нейротоксичность, в том числе препаративных режимов [45]. Основными причинами являются нейротоксические препараты в режимах кондиционирования, инфекционные патогены, цереброваскулярные заболевания, метаболическая энцефалопатия и иммуноопосредованные заболевания. К причинам также относятся рецидив основного заболевания с поражением ЦНС, тромботическая микроангиопатия [46, 47]. Поскольку клинические проявления часто неспецифичны, их причину зачастую удается выяснить не сразу. Тем не менее ранняя диагностика и лечение имеют первостепенное значение для снижения риска необратимых осложнений, ухудшения качества жизни и частоты смертельных исходов, связанных с трансплантацией.

Пациенты, проходящие этап ВДПХТ как при ауто-ТГСК, так и при алло-ТГСК, подвержены риску нутритивной недостаточности [48]. Потеря веса является результатом сложного взаимодействия токсичных, воспалительных и иммунологических механизмов, приводящих к дефициту калорий, катаболизму, длительному пребыванию в клинике. Важно отметить, что большинство пациентов имеют хороший аппетит или даже избыточный вес перед ТГСК, но испытывают быстрое снижение аппетита во время ВДПХТ. Зачастую снижение аппетита, веса отмечается у пациентов в период цитопении, что соответствует проявлениям ранних осложнений, таких как мукозит, который в зависимости от степени тяжести может приводить также к болевому синдрому при приеме пищи. Международные сообщества, такие как Европейское общество энтерального и парентерального питания (European Society for Clinical Nutrition and Metabolism), рекомендуют скрининг нутритивного статуса при поступлении пациента на этап ТГСК [49, 50]. Активно используется на этапе ТГСК поддержка нутритивного статуса лечебным питанием в виде самостоятельного приема или с использованием девайсов для энтерального питания (назогастральный зонд, гастростома). При невозможности применения назогастрального зонда и недостаточности желудоч-

но-кишечного тракта, включая тяжелую мальабсорбцию, рекомендовано парентеральное питание [50, 51].

В данной работе представлен опыт использования ВДПХТ с ауто-ТГСК у детей с солидными ЗНО группы высокого риска с оценкой инфекционных и токсических осложнений в раннем посттрансплантационном периоде.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В группу исследования вошли 156 пациентов с солидными ЗНО группы высокого риска, получивших ауто-ТГСК в НИИ детской онкологии и гематологии им. акад. РАМН Л.А. Дурнова ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России в 2020–2023 гг., из них 78 (50,0%) мальчиков и 78 (50,0%) девочек. Медиана возраста пациентов составила 8 лет 7 месяцев (9 месяцев – 17 лет 8 месяцев). Исследование одобрено независимым этическим комитетом и утверждено решением ученого совета НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина.

Терапевтическая группа риска определялась с учетом возраста ребенка, гистологического типа опухоли, стадии заболевания и его статуса, прогностически значимых молекулярно-генетических факторов. Противоопухолевая терапия пациентам проводилась на основании международных рекомендаций: при нейробластоме – Children's Oncology Group, NB2004 Trial Protocol, при саркоме Юинга – Ewing's sarcoma RESTART 2017 и EURO EWING 2012, при герминогенноклеточных опухолях – MAKEI 2005, при нефробластоме – SIOP RTSG, при медуллобластоме – HIT-MED 2017, при ретинобластоме – Children's Oncology Group, при плевропульмональной бластоме – по согласованию с Pleuropulmonary blastoma registry. Критериями соответствия для проведения ауто-ТГСК считались возраст ≤ 18 лет, гистологически верифицированное ЗНО группы высокого риска, наличие показаний к ВДПХТ согласно протоколу лечения, удовлетворительный соматический статус (по шкале Лански), наличие достаточного количества заготовленных ГСК. Прогрессирование основного заболевания являлось критерием исключения для проведения ВДПХТ.

Восстановление гемопоэза в посттрансплантационном периоде в соответствии с критериями EBMT констатировалось при достижении в течение 3 дней подряд числа лейкоцитов в периферической крови $> 1 \times 10^9/\text{л}$, гранулоцитов $> 0,5 \times 10^9/\text{л}$, тромбоцитов $> 20 \times 10^9/\text{л}$, гемоглобина > 80 г/л. Оценка токсичности производилась согласно критериям нежелательных явлений Common Terminology Criteria for Adverse Events, версия 5.0 от 2017 г. Статистическая обработка данных была выполнена в программе Statistical Package for the Social Sciences.

В исследование были включены 90 (57,7%) пациентов с нейробластомой, 25 (16,0%) – с саркомой Юинга, 16 (10,3%) – с герминогенноклеточными опухолями, 13 (8,4%) – с нефробластомой, 7 (4,5%) – с ретинобластомой, 3 (1,9%) – с медуллобластомой, 1 (0,6%) – с плевропульмональной бластомой и 1 (0,6%) – с сиалобластомой (рисунок 1).

Соматический статус у 96% пациентов соответствовал удовлетворительному, индекс по шкале Лански составлял ≥ 90 . Частота использования различных схем ВДПХТ, применяемых в качестве режима кондиционирования, представлена на рисунке 2. Наиболее часто использовались режимы кондиционирования в составе: треосульфан + мелфалан ($n = 116$), карбоплатин + тиотепа + этопозид ($n = 17$), мелфалан ($n = 13$), карбоплатин + тиотепа + этопозид + циклофосфамид ($n = 10$) (рисунок 2).

Рисунок 1
Распределение пациентов в зависимости от основного заболевания

Figure 1
Distribution of patients depending on the underlying disease

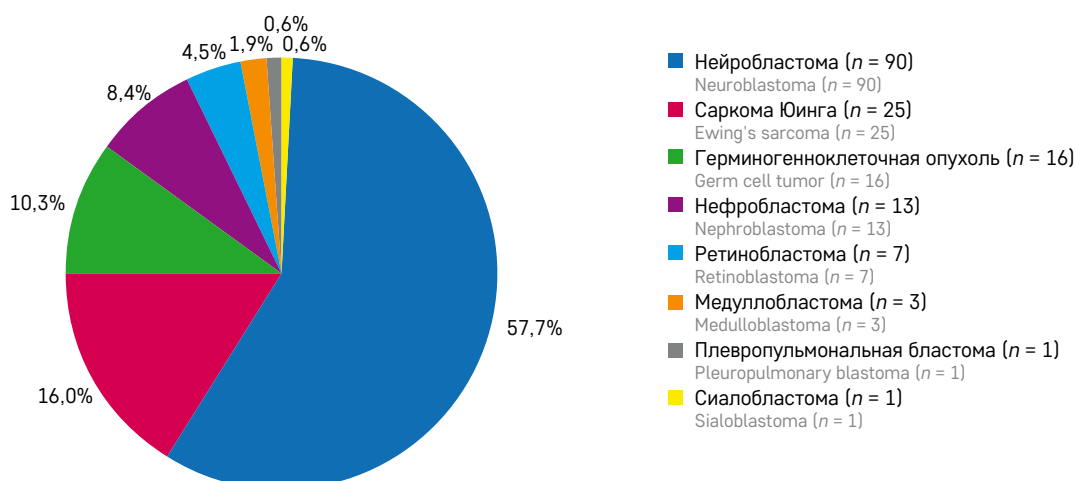
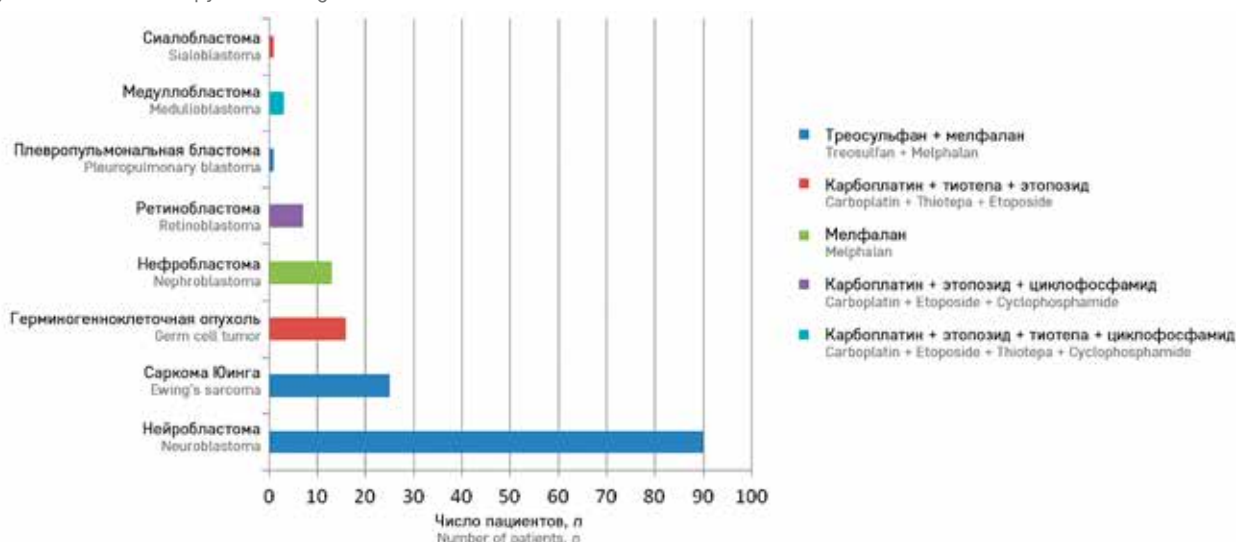


Рисунок 2
Схемы ВДПХТ

Figure 2
High-dose chemotherapy (HDCT) regimens



В зависимости от клинических показаний и используемого протокола лечения у 136 (87,2%) пациентов был проведен 1 курс ВДПХТ, а в 20 (12,8%) случаях выполнена тандемная ВДПХТ. Редукция доз проводилась пациентам согласно протоколам химиотерапии с учетом анамнеза заболевания, возраста пациента, массо-ростовых показателей. Менее интенсивный режим кондиционирования использовался у 54 (34,6%) пациентов (рисунок 3).

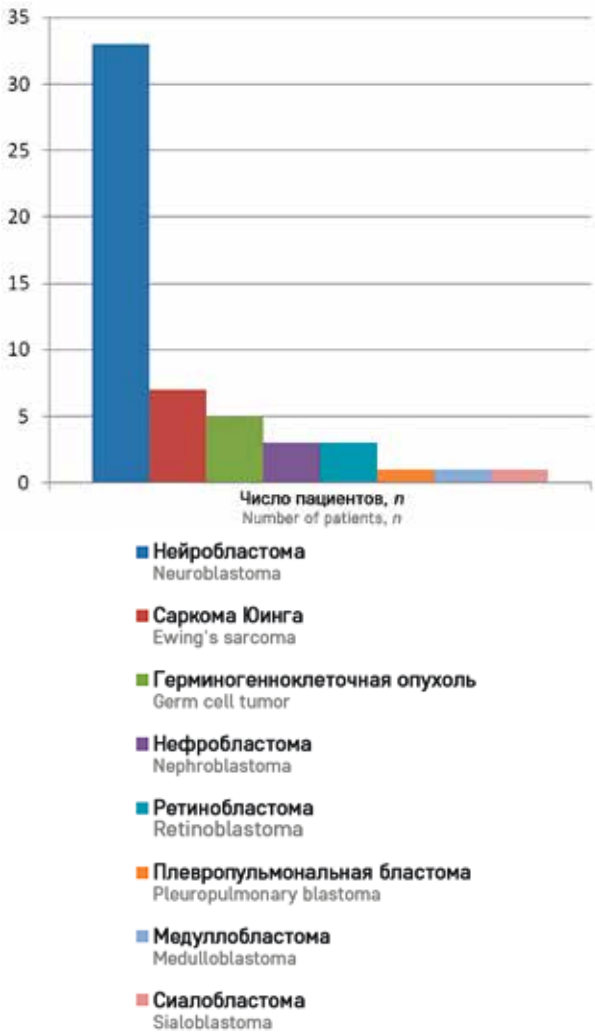
В таблице 1 представлены инициальные характеристики пациентов, включенных в исследование.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Мобилизация и сбор гемопоэтических стволовых клеток, восстановление гемопоэза

Одним из факторов снижения риска инфекционных осложнений после проведения ауто-ТГСК

Рисунок 3
Редукция доз ВДПХТ
Figure 3
Reduction of HDCT doses



является быстрое восстановление гемопоэза после трансплантации и сокращение периода аплазии. Немаловажную роль при этом играют удовлетворительные характеристики трансплантата. Среди пациентов, включенных в наше исследование, преимущественным источником ГСК являлась периферическая кровь (99%), при этом в 4% случаев аферез проводился у пациентов в возрасте до 1 года и с низкой массой тела. По результатам аферезов у большинства пациентов удалось достичь приемлемого числа трансфузируемых CD34⁺-клеток/кг, среднее значение которого составило 5,1 (0,01–95,6) × 10⁶/кг. Важно отметить, что во всех случаях было получено оптимальное количество ГСК для проведения ВДПХТ с ауто-ТГСК, в том числе для использования в качестве буста при развитии костномозговой недостаточности. Успешными с первой попытки были 140 (89,7%) процедур афереза ГСК, 16 (10,3%) пациентам проведены повторные аферезы. В качестве дополнительного агента для стимуляции

Таблица 1
Инициальные характеристики пациентов, включенных в исследование

Показатель Characteristic	Значение Value
Пол, n (%) Gender, n (%)	
Мужской Male	78 (50,0)
Женский Female	78 (50,0)
Возраст Age	
Разброс Range	9 месяцев – 17 лет 8 месяцев 9 months – 17 years 8 months
Медиана Median	8 лет 7 месяцев 8 years 7 months
Распределение пациентов по нозологиям, n (%) Distribution of patients by disease, n (%)	
Нейробластома Neuroblastoma	90 (57,7)
Саркома Юинга Ewing's sarcoma	25 (16,0)
Герминогенноклеточная опухоль Germ cell tumor	16 (10,3)
Нефробластома Nephroblastoma	13 (8,4)
Ретинобластома Retinoblastoma	7 (4,5)
Медуллобластома Medulloblastoma	3 (1,9)
Плевропульмональная бластома Pleuropulmonary blastoma	1 (0,6)
Сиалобластома Sialoblastoma	1 (0,6)
Режим кондиционирования, n (%) Conditioning regimen, n (%)	
Треосульфат + мелфалан Treosulfan + Melphalan	116 (74,4)
Карбоплатин + тиотепа + этопозид Carboplatin + Thiotepa + Etoposide	17 (10,8)
Мелфалан Melphalan	13 (8,4)
Карбоплатин + тиотепа + этопозид + циклофосфамид Carboplatin + Thiotepa + Etoposide + Cyclophosphamide	10 (6,4)
Количество курсов ВДПХТ, n (%) Number of HDCT courses, n (%)	
Один курс One course	136 (87,2)
Тандемный курс Tandem course	20 (12,8)
Редукция доз химиопрепаратов, n (%) Number of patients receiving reduced chemotherapy doses, n (%)	
Кондиционирование с полными дозами химиопрепаратов Full-dose conditioning regimens	102 (65,4)
Кондиционирование с редукцией доз химиопрепаратов Reduced-dose conditioning regimens	54 (34,6)

гемопоэза вводились антагонисты рецептора CXCR4 (плериксафор) у 15 пациентов, у которых отмечен недостаточный прирост CD34⁺-стволовых клеток в контрольные дни стимуляции.

После трансплантации в целях сокращения периода аплазии кроветворения пациентам вводился Г-КСФ (внутривенно или подкожно) в дозе 5–10 мкг/кг/сут ежедневно, начиная с +1-го или

+5-го дня до достижения целевого числа гранулоцитов в периферической крови. Среднее время достижения количества гранулоцитов $> 500 \times 10^6/\text{л}$ на фоне стимуляции Г-КСФ составило 6 (4–17) дней. Медиана времени восстановления гранулоцитов и тромбоцитов была 11 (8–19) и 14 (12–21) дней соответственно. В таблице 2 представлены данные по сбору ГСК и восстановлению гемопоэза у пациентов, включенных в исследование.

Инфекционные осложнения

В нашем исследовании в посттрансплантационном периоде у пациентов доминировали инфекционные осложнения бактериальной этиологии с преобладанием грамотрицательной микрофлоры (*Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*). У 44% пациентов имело место выделение 2 возбудителей и более. Наиболее часто у пациентов диагностировали мукозит (89,1%), нейтропенический энтероколит (76,9%), фебрильную нейтропению (71,2%), реже катетер-ассоциированную инфекцию кровотока (9,0%), пневмонию (14,1%), острый респираторный дистресс-синдром (0,6%). В 8,3% случаев были зарегистрированы тяжелые инфекционные осложнения, потребовавшие лечения в условиях отделения реанимации и интенсивной терапии с проведением гемодиализа с антибактериальным адсорбентом (2,8%). Проводимая противомикробная терапия в 98,0% случаев позволяла купировать проявления инфекционного процесса. В посттранс-

плантационном периоде у 1,3% пациентов была диагностирована реактивация ЦМВ-инфекции, из них в 1 (0,6%) случае имела место ЦМВ-болезнь с поражением легких. Все пациенты получали профилактическую противовирусную терапию ацикловиром. С тяжелыми инфекционными осложнениями, приведшими к полиорганной недостаточности, был связан и 1 летальный исход в раннем посттрансплантационном периоде (до 30-х суток после ауто-ТГСК) (рисунок 4).

Кровотечения и тромботические осложнения

Среди пациентов, включенных в исследование, в раннем посттрансплантационном периоде эпизоды незначительных кровотечений на фоне тромбоцитопении развивались у 44,2%. Наиболее часто отмечались носовые (34,0%) и маточные кровотечения, связанные с менструальным циклом (10,0%). Тромботические осложнения зарегистрированы у 10,2% пациентов, которые были обусловлены наличием центральных венозных катетеров.

Негематологическая токсичность

Тошнота и рвота наблюдались у всех пациентов, несмотря на проводимую плановую антиэметическую терапию. Учитывая высокий потенциал эметогенности препаратов, используемых в режимах кондиционирования, рвота у пациентов отмечалась как в первые 24 ч от введения высоких доз химиопрепаратов (острая рвота), так и через 2–5 сут (отсроченная рвота). Наличие орофарингеального мукозита также способствовало проявлениям эметического синдрома. Зачастую проводилась терапия блокаторами NK1- и 5-HT3-рецепторов, редко использовались глюкокортикоиды [29, 30].

Дерматологическая токсичность, включающая эритематозную сыпь, гиперпигментацию и шелушение кожи, наблюдалась у 98 (62,8%) пациентов. Зачастую данное токсическое осложнение было связано с применением таких химиопрепаратов, как тиотепа и треоосульфат. Достаточно высокая распространенность дерматологической токсичности указывает на значительную уязвимость кожного эпителия в отношении воздействия химиотерапевтических агентов, что диктует необходимость ранней профилактики и начала терапии поражений кожи [31–35].

ГЦ отмечен у 9 (5,8%) пациентов в период с 6-го по 14-й день после трансплантации и был ассоциирован с тромбоцитопенией, при этом на фоне проводимой терапии проявления быстро разрешились без тяжелых последствий.

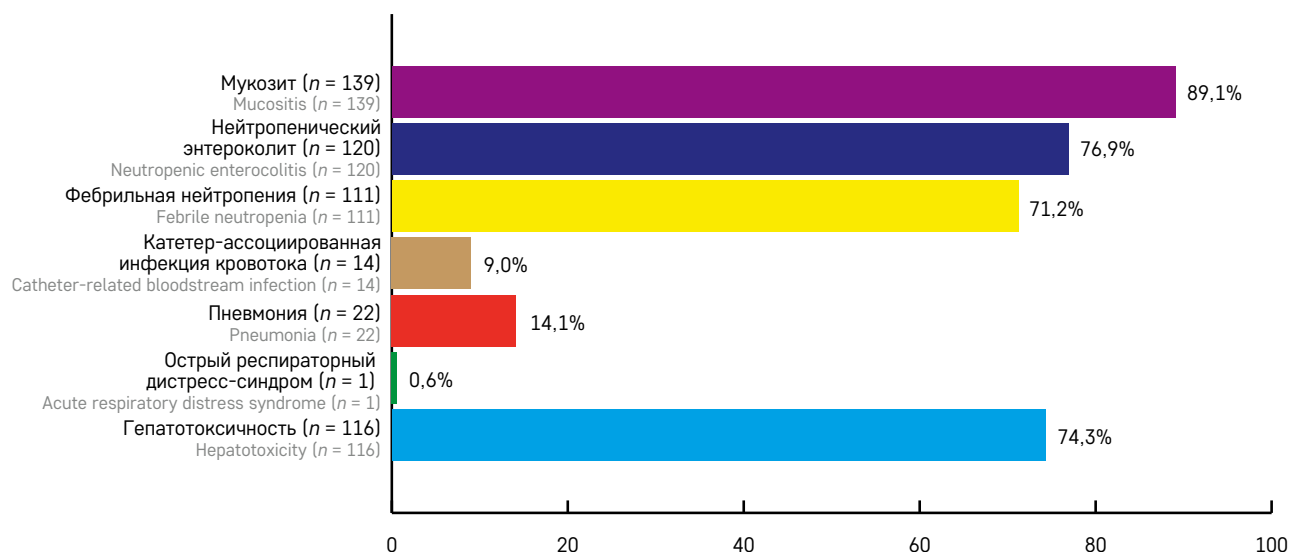
Печеночная токсичность I–III степени наблюдалась у 116 (74,3%) пациентов, тяжелого синусоидального синдрома обструкции согласно модифицированным Сизлским критериям не было отмечено ни в одном

Таблица 2
Мобилизация, сбор ГСК и восстановление гемопоэза у пациентов, включенных в исследование

Показатель Characteristic	Значение Value
Количество аферезов для сбора достаточного количества ГСК, n (%) Number of apheresis procedures yielding sufficient number of HSCs, n (%)	
Одна процедура One procedure	140 (89,7)
Две процедуры Two procedures	16 (10,3)
Количество CD34 ⁺ в трансплантате, $\times 10^6/\text{кг}$ массы тела пациента Number of CD34 ⁺ in the graft, $\times 10^6/\text{kg}$ of patient's body weight	
Разброс Range	0,01–95,6
Медиана Median	5,1
Время восстановления лейкопоэза, дни White blood cell engraftment, days	
Среднее значение Mean value	6 (4–17)
Медиана Median	11 (8–19)
Восстановление тромбоцитопоэза, дни Platelet engraftment, days	
Медиана Median	14 (12–21)

Рисунок 4
Частые осложнения на этапе ВДПХТ

Figure 4
Frequent complications of HDCT



случае. У всех пациентов функция печени нормализовалась через 1–2 нед.

В нашем исследовании нетяжелая неврологическая симптоматика была отмечена у 14 (9,0%) пациентов, при этом все проявления разрешились после прекращения воздействия токсических агентов и не требовали специального лечения.

У 102 (65,4%) пациентов в связи с сохраняющейся нутритивной недостаточностью средней степени тяжести на этапе ВДПХТ применялось лечебное питание с использованием назогастрального зонда, а также парентеральное питание. У большинства пациентов данная поддержка была продолжена до 30-х суток после трансплантации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Консолидация в объеме ВДПХТ с последующей ауто-ТГСК при ЗНО высокой группы риска у пациентов детского возраста способна повысить показатели как общей, так и безрецидивной выживаемости, однако сопряжена с повышенным риском развития посттрансплантационных инфекционных и токсических осложнений. Подобные осложнения не только значительно нарушают самочувствие и качество жизни пациентов, но и могут быть крайне опасными для их жизни. В нашем исследовании продемонстрирован сравнимый с опубликованными данными других исследований уровень осложнений у пациентов после ауто-ТГСК.

Для достижения приемлемого профиля токсичности метода необходима тщательная профилактика (в том числе сопроводительная терапия, контроль доз химиопрепаратов), эффективный сбор ГСК для

Таблица 3
Посттрансплантационные осложнения у пациентов, включенных в исследование

Tables 3
Post-transplant complications in the study patients

Показатель Characteristic	Значение, n (%) Value, n (%)
Инфекционные осложнения Infectious complications	
Мукозит Mucositis	139 (89,1)
Нейтропенический энтероколит Neutropenic enterocolitis	120 (76,9)
Фебрильная нейтропения Febrile neutropenia	111 (71,2)
Пневмония Pneumonia	22 (14,1)
Катетер-ассоциированная инфекция кровотока Catheter-associated bloodstream infection	14 (9,0)
Реактивация ЦМВ Cytomegalovirus (CMV) reactivation	2 (1,3)
ЦМВ-болезнь CMV disease	1 (0,6)
Острый респираторный дистресс-синдром Acute respiratory distress syndrome	1 (0,6)
Токсические и геморрагические осложнения Toxic and hemorrhagic complications	
Кровотечения Bleeding	69 (44,2)
Носовые кровотечения Nosebleeds	53 (34,0)
Маточные кровотечения Uterine bleeding	16 (10,2)
Дерматологическая токсичность Dermatological toxicity	98 (62,8)
ГЦ Hemorrhagic cystitis	9 (5,8)
Печеночная токсичность Liver toxicity	116 (74,3)
Неврологическая токсичность Neurological toxicity	14 (9,0)
Нутритивная недостаточность Nutritional deficiency	102 (65,4)

обеспечения удовлетворительных характеристик трансплантата, сокращение сроков периода аплазии, своевременная диагностика и лечение осложнений после ауто-ТГСК. Взаимодействие разных трансплантационных центров, обмен опытом, статистический учет, своевременная профилактика, диагностика и лечение данных осложнений могут способствовать повышению эффективности ауто-ТГСК при лечении ЗНО у детей.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Не указан.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

ORCID

Aliiev T.Z. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1091-1521>

Kirgizov K.I. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2945-284X>

Machneva E.B. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2395-4045>

Kostareva I.O. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0179-2479>

Sergeenko K.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3225-8412>

Smirnova D.S. ORCID: <https://orcid.org/0009-0007-2171-1951>

Burlaka N.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3289-223X>

Lozovan Yu.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0600-8962>

Trushkova I.Yu. ORCID: <https://orcid.org/0009-0000-5828-8041>

Elfimova A.Yu. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8143-5791>

Mitrakov K.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2010-5534>

Potemkina T.I. ORCID: <https://orcid.org/0009-0007-0074-7197>

Malova M.D. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9112-5973>

Fatkhullin R.R. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5988-8428>

Stepanyan N.G. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7939-5129>

Kazantsev A.P. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7309-1650>

Matinyan N.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7805-5616>

Rubanskaya M.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1016-539X>

Romantsova O.M. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2310-0106>

Valiev T.T. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1469-2365>

Gorbunova T.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5805-726x>

Slinin A.S. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2021-0465>

Kazantsev I.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3818-6213>

Sagoyan G.B. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1016-539X>

Suleymanova A.M. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5489-1879>

Kapkova O.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5256-2193>

Muftakhova G.M. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8487-1879>

Vanesyan V.Sh. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0138-3379>

Zhogov V.V. ORCID: <https://orcid.org/0009-0005-8755-486x>

Ushakova T.L. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3263-6655>

Rodina A.D. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8356-0625>

Skvortsova Yu.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0566-053X>

Polyakov V.G. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8096-0874>

Varfolomeeva S.R. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6131-1783>

Литература / References

1. Michel R.P., Berry G.J. (eds.). Pathology of transplantation. Cham: Springer; 2016. Pp. 401–40.
2. Maziarsz R.T. Blood and marrow transplant handbook. 2nd ed. Cham: Springer; 2015. Pp. 3–11, 29–33.
3. Galgano L., Hutt D. HSCT: How Does It Work? In: Kenyon M., Babic A. (eds.). The European Blood and Marrow Transplantation Textbook for Nurses. Springer, Cham; 2018. DOI: 10.1007/978-3-319-50026-3_2
4. Carreras E., Dufour C., Mohty M., Kröger N. (eds.). The EBMT Handbook: Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Cellular Therapies. 7th ed. Cham: Springer; 2019.
5. Диникина Ю.В., Моргачева Д.А., Смирнова А.Ю., Тошина Ю.К., Лапаева С.И., Егоров А.С. и др. Опыт применения интенсивных режимов химиотерапии с аутологичной трансплантацией стволовых клеток у детей со злокачественными опухолями группы высокого риска. Российский журнал персонализированной медицины 2022; 2 (1): 104–16. doi: 10.18705/2782-3806-2022-2-1-104-116 [Dinikina Yu.V., Morgacheva D.A., Smirnova A.Yu., Toshina Yu.K., Lapaeva S.I., Egorov A.S., et al. Intensive regimens of chemotherapy with hematopoietic stem cell rescue in paediatric patients with high-risk malignant tumors. Russian Journal for Personalized Medicine 2022; 2 (1): 104–16. (In Russ.).]
6. Diaz M.A., Kanold J., Vincent M.G., Halle P., Madero L., Deméocq F. Using peripheral blood progenitor cells (PBPC) for transplantation in pediatric patients: a state-of-art review. Bone Marrow Transplant 2000; 26 (12): 1291–8.
7. To L.B., Haylock D.N., Simmons P.J. The biology and clinical use of blood stem cells. Blood 1997; 89: 2233–58.
8. Orbach D., Hojjat-Assari S., Doz F., Pacquement H., Guillaume A., Mathiot C., et al. Peripheral blood stem cell collection in 24 low-weight infants: experience of a single centre. Bone Marrow Transplant 2003; 31 (3): 171–4.
9. Sevilla J., Plaza S.F., González-Vicent M., Lassaletta A., Ramírez M., Madero L., Angel Díaz M. PBSC collection in extremely low weight infants: a singlecenter experience. Cytotherapy 2007; 9 (4): 356–61.
10. Mackall C., Fry T., Gress R., Peggs K., Storek J., Toubert A.; Center for International Blood and Marrow Transplant Research (CIBMTR); National Marrow Donor Program (NMDP); European Blood and Marrow Transplant Group (EBMT); American Society of Blood and Marrow Transplantation (ASBMT); Canadian Blood and Marrow Transplant Group (CBMTG); Infectious Disease Society of America (IDSA); Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA); Association of Medical Microbiology and Infectious Diseases Canada (AMMI); Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Background to hematopoietic cell transplantation, including post transplant immune recovery. Bone Marrow Transplant 2009; 44: 457–62. DOI: 10.1038/bmt.2009.255. p.458
11. Nucci M., Anaissie E. Infections After High-Dose Chemotherapy and Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplantation. Infections in Hematology. 2014; 49–61. Published 2014 Nov 27.
12. Lehnbecher T., Fisher B.T., Phillips B., Alexander S., Ammann R.A., Beauchemin M., et al. Guideline for Antibacterial Prophylaxis Administration in Pediatric Cancer and

- Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Clin Infect Dis* 2020; 71 (1): 226–36.
13. Choi Y.B., Yi E.S., Kang J.M., Lee J.W., Yoo K.H., Kim Y.-J., et al. Infectious Complications during Tandem High-Dose Chemotherapy and Autologous Stem Cell Transplantation for Children with High-Risk or Recurrent Solid Tumors. *PLoS One* 2016; 11 (9): e0162178.
 14. Falcon C.P., Broglie L., Phelan R., Choi S.W., Auletta J.J., Chewing J.H., et al. Infection prophylaxis patterns following pediatric autologous hematopoietic stem cell transplantation: A survey of Pediatric Transplant and Cell Therapy Consortium centers. *Pediatr Transplant* 2020; 24 (8): e13821.
 15. Barone A. Antibacterial prophylaxis in neutropenic children with cancer. *Pediatr Rep* 2011; 3 (1): e3.
 16. Mikulska M., Viscoli C., Orasch C., Livermore D.M., Averbuch D., Cordonnier C., et al. Aetiology and resistance in bacteraemias among adult and paediatric haematology and cancer patients. *J Infect* 2014; 68: 321–31.
 17. Averbuch D., Tridello G., Hoek J., Mikulska M., Akan H., Yanez San Segundo L., et al. Antimicrobial resistance in gram-negative rods causing bacteremia in hematopoietic stem cell transplant recipients: intercontinental prospective study of the infectious diseases working party of the European bone marrow transplantation group. *Clin Infect Dis* 2017; 65: 1819–28.
 18. Mikulska M., Raiola A.M., Galaverna F., Balletto E., Borghesi M.L., Varaldo R., et al. Pre-engraftment bloodstream infections after allogeneic hematopoietic cell transplantation: impact of T cell-replete transplantation from a haploidentical donor. *Biol Blood Marrow Transplant* 2018; 24: 109–18.
 19. Girmenia C., Bertaina A., Piciocchi A., Perruccio K., Algarotti A., Busca A., et al. Incidence, risk factors and outcome of pre-engraftment gram-negative bacteremia after allogeneic and autologous hematopoietic stem cell transplantation: an Italian prospective multicenter survey. *Clin Infect Dis* 2017; 65: 1884–96.
 20. Jagasia M.H., Greinix H.T., Arora M., Williams K.M., Wolff D., Cowen E.W., et al. National Institutes of Health Consensus Development Project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. The 2014 Diagnosis and Staging Working Group report. *Biol Blood Marrow Transplant* 2015; 21 (3): 389–401.e1.
 21. Epstein J.B., Schubert M.M. Oropharyngeal mucositis in cancer therapy. Review of pathogenesis, diagnosis, and management. *Oncology (Williston Park)* 2003; 17: 1767.
 22. Ljungman P., de la Camara R., Robin C., Crocchiolo R., Einsele H., Hill J.A., et al. Guidelines for the management of cytomegalovirus infection in patients with haematological malignancies and after stem cell transplantation from the 2017 European Conference on Infections in Leukaemia (ECIL 7). *Lancet Infect Dis* 2019; 19 (8): e260–72.
 23. Hussein A.A., Al-Antary E.T., Najjar R., Al-Hamdan D.S., Al-Zaben A., Frangoul H., et al. Incidence and risk factors for cytomegalovirus (CMV) reactivation following autologous hematopoietic stem cell transplantation in children. *Pediatr Blood Cancer* 2015; 62 (6): 1099–101.
 24. Jain T., John J., Kotecha A., Deol A., Saliminia T., Revankar S., Chandrasekar P. Cytomegalovirus infection in autologous stem cell transplant recipients in the era of rituximab. *Ann Hematol* 2016; 95 (8): 1323–7.
 25. Randolph-Habecker J., Iwata M., Torok-Storb B. Cytomegalovirus mediated myelosuppression. *J Clin Virol* 2002; 25 Suppl 2: S51–6.
 26. Gerber D.E., Segal J.B., Levy M.Y., Deol A., Saliminia T., Revankar S., Chandrasekar P., et al. The incidence and risk factors for venous thromboembolism (VTE) and bleeding among 1514 patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation: implications for VTE prevention. *Blood* 2008; 112: 504–10.
 27. Chaturvedi S., Neff A., Nagler A., Savani U., Mohty M., Savani B.N., et al. Venous thromboembolism in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplant* 2016; 51: 473–8.
 28. Nadir Y., Brenner B. Hemorrhagic and thrombotic complications in bone marrow transplant recipients. *Thromb Res* 2007; 120 (Suppl 2): 592–8.
 29. Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE). Version 4.0. Published: May 28, 2009 (v4.03: June 14, 2010) U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health, National Cancer Institute. [Electronic resource] URL: https://www.eortc.be/services/doc/ctc/CTCAE_4.03_2010-06-14_QuickReference_5x7.pdf (accessed 28.05.2024).
 30. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines). Antiemesis. Version 2.2017. March 28, 2017. [Electronic resource] URL: https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/antiemesis.pdf (accessed 28.05.2024).
 31. Алиев Т.З., Мачнева Е.Б., Сидорова Н.В., Бelysheva Т.С., Валиев Т.Т., Киргизов К.И. Поражение кожных покровов при трансплантации гемопоэтических стволовых клеток. Обзор литературы. *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии* 2020; 19 (2): 184–92. DOI: 10.24287/1726-1708-2020-19-2-184-192 [Aliiev T.Z., Machneva E.B., Sidorova N.V., Belysheva T.S., Valiev T.T., Kirgizov K.I. Skin damage after the hematopoietic stem cell transplantation. Literature review. *Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology* 2020; 19 (2): 184–92. (In Russ.)].
 32. Wachowiak J., et al. Intravenous treosulfan in conditioning before allogeneic HSCT from MSD in children with high risk of toxic complications related to conventional preparative regimen. *Bone Marrow Transplant* 2002; (30): S12.
 33. Głowska F.K., Romański M., Wachowiak J. High-dose treosulfan in conditioning prior to hematopoietic stem cell transplantation. *Expert Opin Investig Drugs* 2010; 19: 1275–95.
 34. Алиев Т.З., Мачнева Е.Б., Костарева И.О., Сергеев К.А., Бурлака Н.А., Кудяева Л.М. и др. Токсические осложнения высоких доз треоосульфана у детей: опыт ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. *Российский журнал детской гематологии и онкологии* 2023;

- 10 (3): 55–62. DOI: 10.21682/2311-1267-2023-10-3-55-62 [Aliev T.Z., Machneva E.B., Kostareva I.O., Sergeenko K.A., Burlaka N.A., Kudaeva L.M., et al. Toxic complications of high doses of treisulfan in children: experience of the N.N. Blokhin National Medical Research Centre of Oncology, Ministry of Health of Russia. *Russian Journal of Pediatric Hematology and Oncology* 2023; 10 (3): 55–62. (In Russ.)].
35. Алиев Т.З., Потемкина Т.И., Бelysheva Т.С., Валиев Т.Т., Сергеев К.А., Костарева И.О. и др. Дерматологическая токсичность высоких доз тиоптепы у детей. Описание клинического случая. *Педиатрическая фармакология* 2023; 20 (2): 134–40. DOI: 10.15690/pf.v20i2.2543 [Aliev T.Z., Potemkina T.I., Belysheva T.S., Valiev T.T., Sergeenko K.A., Kostareva I.O., et al. Dermatologic toxicity of high doses of thiothepa in children. Case report. *Pediatric pharmacology*. 2023;20(2):134–140. (In Russ.)].
36. Cooke K.R., Yanik G.A. Lung injury following hematopoietic cell transplantation. In: Forman S.J., Negrin R.S., Antin J.H., Appelbaum F.R. (eds.). *Thomas' hematopoietic cell transplantation*. 5th ed. Hoboken: Wiley; 2016. Pp. 1090–104, 1157–70.
37. Cesaro S., Dalianis T., Hansen Rinaldo C., Koskenvuo M., Pegoraro A., Einsele H., et al. ECIL guidelines for the prevention, diagnosis and treatment of BK polyomavirus-associated haemorrhagic cystitis in haematopoietic stem cell transplant recipients. *J Antimicrob Chemother* 2018; 73: 12–21.
38. Hockenbery D.M., Strasser S.I., McDonald G.B. Gastrointestinal and hepatic complications. In: Forman S.J., Negrin R.S., Antin J.H., Appelbaum F.R. (eds.). *Thomas' hematopoietic cell transplantation*. 5th ed. Hoboken: Wiley; 2016. Pp. 1140–56.
39. Carreras E. How I treat sinusoidal obstruction syndrome after hematopoietic cell transplantation. *Br J Haematol* 2015; 168: 481–91.
40. Костарева И.О., Мачнева Е.Б., Сидорова Н.В., Киргизов К.И. Веноокклюзионная болезнь печени при трансплантации гемопоэтических стволовых клеток и высокодозных режимах химиотерапии. Обзор литературы. *Российский журнал детской гематологии и онкологии* 2020; 7 (3): 94–101. DOI: 10.21682/2311-1267-2020-7-3-94-101 [Kostareva I.O., Machneva E.B., Sidorova N.V., Kirgizov K.I. Veno-occlusive liver disease after hematopoietic stem cell transplantation and high-dose chemotherapy regimens. Literature review. *Russian Journal of Pediatric Hematology and Oncology* 2020; 7 (3): 94–101. (In Russ.)].
41. Cooke K.R., Yanik G.A. Lung injury following hematopoietic cell transplantation. In: Forman S.J., Negrin R.S., Antin J.H., Appelbaum F.R. (eds.). *Thomas' hematopoietic cell transplantation*. 5th ed. Hoboken: Wiley; 2016. Pp. 1157–70.
42. Lucena C.M., Torres A., Rovira M., Marcos M.A., de la Bellacasa J.P., Sánchez M., et al. Pulmonary complications in hematopoietic SCT: a prospective study. *Bone Marrow Transplant* 2014; 49: 1293–9.
43. Rondón G., Saliba R.M., Chen J., Ledesma C., Alousi A.M., Oran B., et al. Impact of fluid overload as new toxicity category on hematopoietic stem cell transplantation outcomes. *Biol Blood Marrow Transplant* 2017; 23: 2166–71.
44. Panoskaltsis-Mortari A., Griesse M., Madtes D.K., Belperio J.A., Haddad I.Y., Folz R.J., Cooke K.R.; American Thoracic Society Committee on Idiopathic Pneumonia Syndrome. An official American Thoracic Society research statement: noninfectious lung injury after hematopoietic stem cell transplantation: idiopathic pneumonia syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 2011; 183: 1262–79.
45. Maffini E., Festuccia M., Brunello L., Boccadoro M., Giaccone L., Bruno B., et al. Neurologic complications after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2017; 23 (3): 388–97.
46. Denier C., Bourhis J.-H., Lacroix C., Koscielny S., Bosq J., Sigal R., et al. Spectrum and prognosis of neurologic complications after hematopoietic transplantation. *Neurology* 2006; 67: 1990–7.
47. Eberly A.L., Anderson G.D., Bubalo J.S., McCune J.S. Optimal prevention of seizures induced by high-dose busulfan. *Pharmacotherapy* 2008; 28: 1502–10.
48. Fuji S., Mori T., Lee V., et al. A multi-center international survey related to the nutritional support after hematopoietic stem cell transplantation endorsed by the ASIA Pacific Blood and Marrow Transplantation (APBMT). *Food Nutr Sci* 2012; 3: 417–21.
49. Baumgartner A., Bargetzi A., Zueger N., Bargetzi M., Medinger M., Bounoure L., et al. Revisiting nutritional support for allogeneic hematologic stem cell transplantation – a systematic review. *Bone Marrow Transplant* 2017; 52: 506–13.
50. Bozzetti F., Arends J., Lundholm K., Micklewright A., Zurcher G., Muscaritoli M. ESPEN guidelines on parenteral nutrition: non-surgical oncology. *Clin Nutr* 2009; 28: 445–54.
51. Duro D., Bechard L.J., Feldman H.A., Klykov A., O'Leary A., Guinan E.C., Duggan C., et al. Weekly measurements accurately represent trends in resting energy expenditure in children undergoing hematopoietic stem cell transplantation. *J Parenter Enter Nutr* 2008; 32: 427–32.

© 2024 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ
им. Дмитрия Рогачева»
Минздрава России
Поступила 13.03.2024
Принята к печати 08.04.2024



EDN: GEE0YX

DOI: 10.24287/1726-1708-2024-23-2-128-139

Сравнительная характеристика клеточного состава и функциональных свойств анти-CD19-биомедицинских клеточных продуктов, произведенных с помощью платформ CliniMACS Prodigy и G-Rex

Е.А. Малахова^{1,2}, Д.Е. Першин¹, В.А. Ведмедская¹, М.С. Фадеева¹, Е.А. Кулаковская¹,
О.Б. Лодоева¹, Т.А. Созонова¹, Э.Я. Мусаева¹, Я.О. Музалевский¹, А.С. Казаченок¹,
В.Е. Бельчиков¹, А.К. Мелькова¹, Л.Н. Шелихова¹, О.О. Молостова¹, Е.А. Бадрин¹, М.А. Масчан¹

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, Москва

²ФГБУН Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук, Пущино

Контактная информация:

Малахова Екатерина Андреевна,
врач клинической лабораторной
диагностики лаборатории
трансплантационной иммунологии
и иммунотерапии гемобластозов
ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева»
Минздрава России; научный сотрудник
ФГБУН ИТЭБ РАН
Адрес: 117997, Москва,
ул. Саморы Машела, 1
E-mail: mallahovka@yandex.ru

На сегодняшний день применение анти-CD19-биомедицинских клеточных продуктов (БМКП) для лечения В-клеточных опухолей становится все более популярным и показывает впечатляющие результаты. Разработано несколько биореакторов, позволяющих производить высококачественные клеточные продукты для последующего клинического применения, вопрос выбора которых остается актуальным. В данном исследовании представлена сравнительная характеристика иммунофенотипических и функциональных свойств анти-CD19-БМКП, произведенных с помощью автоматизированной системы CliniMACS Prodigy (Milteny Biotec, Германия) и неавтоматизированной платформы G-Rex 10M-CS (Wilson Wolf, США). Производство БМКП и последующая CAR-T-клеточная терапия осуществлялись на базе ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева». Донорами Т-лимфоцитов являлись пациенты, перенесшие ТГСК, а также аутологичные и аллогенные доноры. В исследование были включены 26 анти-CD19-БМКП, производство которых осуществлялось в соответствии с требованиями GMP с использованием автоматизированной системы CliniMACS Prodigy, а также 25 клеточных продуктов, полученных с помощью платформы G-Rex. Исследование одобрено независимым этическим комитетом и утверждено решением ученого совета НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева. Контроль качества осуществлялся на протяжении всего производственного цикла и включал в себя оценку клеточного состава, выживаемости, эффективности трансдукции, клеточной экспансии, экспрессии маркеров истощения, а также противоопухолевой анти-CD19-специфической активности. Исследование показало, что в финале производства мы получаем стабильные высококачественные продукты с достаточной для последующей CAR-T-терапии клеточной экспансией, жизнеспособностью и трансдукцией Т-лимфоцитов при использовании обеих производственных платформ. При этом медиана эффективности трансдукции была статистически значимо выше в БМКП, изготовленных с использованием платформы CliniMACS Prodigy, и составила 41%, в то время как при производстве с помощью биореактора G-Rex она достигла 26%. Исследование показало, что в анти-CD19-БМКП наблюдаются преобладание популяции T_{scm} над T_{em}, низкая экспрессия маркеров клеточного истощения, а также выраженная анти-CD19-специфическая активность. Однако в БМКП, произведенных с помощью платформы CliniMACS Prodigy, содержание T_{scm} статистически значимо выше по сравнению с продуктами, изготовленными в биореакторе G-Rex (86,7% CD8⁺ T_{scm}-лимфоцитов и 82,3% CD4⁺ T_{scm}-лимфоцитов для CliniMACS Prodigy; 69,0% CD8⁺ T_{scm}-лимфоцитов и 72,0% CD4⁺ T_{scm}-лимфоцитов для G-Rex). Несмотря на более низкое содержание анти-CD19 CAR-T-лимфоцитов в финальных клеточных продуктах, полученных в биореакторе G-Rex, во всех процессах этого количества было достаточно для последующей CAR-T-терапии. Таким образом, платформы CliniMACS Prodigy и G-Rex могут быть использованы для производства высококачественных анти-CD19-БМКП.

Ключевые слова: CliniMACS Prodigy, G-Rex, иммунотерапия, биомедицинский клеточный продукт, CAR-T-клеточная терапия

Малахова Е.А. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2024; 23 (2): 128–39. DOI: 10.24287/1726-1708-2024-23-2-128-139

Comparative characterization of the cell composition and functional properties of anti-CD19 biomedical cell products manufactured using the CliniMACS Prodigy and G-Rex platforms

Е.А. Malakhova^{1,2}, D.E. Pershin¹, V.A. Vedmedskaya¹, M.S. Fadeeva¹, E.A. Kulakovskaya¹, O.B. Lodoeva¹,
T.A. Sozonova¹, E.Ya. Musaeva¹, Ya.O. Muzalevsky¹, A.S. Kazachenok¹, V.E. Belchikov¹, A.K. Melkova¹,
L.N. Shelikhova¹, O.O. Molostova¹, E.A. Badrin¹, M.A. Maschan¹

¹The Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology of Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow

²Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Pushchino

© 2024 by «D. Rogachev NMRCPHOI»

Received 13.03.2024

Accepted 08.04.2024

Today, the use of anti-CD19 biomedical cell products (BMCPs) for the treatment of B-cell malignancies yields impressive results and is becoming ever more popular. Several bioreactors have been developed that allow the manufacturing of high-quality cell products for clinical use. Choosing an appropriate bioreactor is an important step in this process. The aim of this study was to characterize and compare immunophenotypic and functional properties of anti-CD19 BMCPs manufactured using the automated CliniMACS Prodigy system (Miltenyi Biotec, Germany) and the manual G-Rex 10M-CS platform (Wilson Wolf, USA). The manufacturing of BMCPs and subsequent CAR T-cell therapy were carried out at the Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology of Ministry of Healthcare of Russia. We used T cells from patients who had undergone HSCT as well as from autologous and allogeneic donors. In this study, we employed 26 anti-CD19 BMCPs manufactured using the automated CliniMACS Prodigy system in accordance with the GMP requirements as well as 25 cell products produced with the G-Rex platform. The study was approved by the Independent Ethics Committee and the Scientific Council of the Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology. Quality control was ensured throughout the entire manufacturing cycle and included assessment of cell composition and survival, transduction efficiency, cell expansion, expression of exhaustion markers, and CD19-specific antitumor activity. Our research showed that both manufacturing platforms generate stable high-quality products with sufficient cell expansion, viability and T cell transduction for subsequent CAR-T therapy. However, the median transduction efficiency of the BMCPs produced using the CliniMACS Prodigy platform was statistically significantly higher than that of the BMCPs manufactured using the G-Rex bioreactor (41% vs 26%). The study showed that in the anti-CD19 BMCPs, there was a predominance of Tcm subpopulation over Tem subpopulation, a low expression of exhaustion markers and a pronounced CD19-specific activity. Nevertheless, the percentage of Tcm cells in the BMCPs manufactured using the CliniMACS Prodigy platform was statistically significantly higher than in the BMCPs produced using the G-Rex bioreactor (86.7% CD8⁺ Tcm cells and 82.3% CD4⁺ Tcm cells for CliniMACS Prodigy vs 69.0% CD8⁺ Tcm cells and 72.0% CD4⁺ Tcm cells for G-Rex). Despite the lower number of anti-CD19 CAR-T cells in the final cell products obtained with the G-Rex bioreactor, in all processes this amount was sufficient for subsequent CAR-T therapy. Thus, the CliniMACS Prodigy and G-Rex platforms can be used to produce high-quality anti-CD19 BMCPs.

Key words: CliniMACS Prodigy, G-Rex, immunotherapy, biomedical cell product, CAR T-cell therapy

Malakhova E.A., et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology 2024; 23 (2): 128–39.
DOI: 10.24287/1726-1708-2024-23-2-128-139

В течение последних десятилетий был достигнут огромный прогресс в понимании механизмов противоопухолевого иммунитета и опухолевой прогрессии. Это привело к появлению совершенно нового подхода к лечению злокачественных новообразований – адаптивной клеточной терапии с использованием генетически модифицированных клеток иммунной системы: Т-лимфоцитов [1, 2], NK-клеток [2, 3], $\gamma\delta$ -Т-клеток [4], NKT-клеток [5], макрофагов [6], экспрессирующих на своей поверхности химерные антигенные рецепторы (chimeric antigen receptor, CAR). В настоящее время по всему миру активно проводятся клинические испытания, по данным ClinicalTrials.gov, зарегистрировано около 1500 CAR-T- и 70 CAR-NK-клеточных исследований. Начиная с 2017 г. Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (Food and Drug Administration) одобрено 6 CAR-T-клеточных продуктов для лечения онкогематологических заболеваний [7]. Использование коммерчески доступных CAR-T-клеточных продуктов показало впечатляющие результаты при лечении злокачественных рецидивирующих/рефрактерных В-клеточных новообразований [8, 9]. Однако длительность такого производства, высокая стоимость, сложности с логистикой, требующей дополнительного времени и криоконсервации CAR-T-клеточного продукта, – все это ограничивает возможность применения терапии. Производство биомедицинских клеточных продуктов (БМКП) и последующее их применение в условиях одного медицинского центра помогает избежать этих проблем и сделать данный способ лечения экономически более доступным [10, 11]. Таким образом, на сегодняшний день актуальной задачей является повышение доступности технологии производства CAR-T-лимфоцитов, что сопровождается появлением различных систем, начиная с

мешков для культивирования из полимерных материалов, заканчивая полностью автоматизированными платформами [12].

Система CliniMACS Prodigy является наиболее широко используемой для автоматизированного производства CAR-T-клеточных продуктов [12–14]. Данная платформа предоставляет возможность производить БМКП в том же месте, где будет проводиться последующая терапия [13, 15–17]. Система CliniMACS Prodigy позволяет выполнять основные этапы производства, такие как магнитная сепарация, активация, трансдукция и экспансия CAR-T-лимфоцитов в стерильной закрытой системе. Платформа требует минимального вмешательства пользователя, снижая риск контаминации, позволяет производить БМКП, соответствующий требованиям надлежащей производственной практики (Good Manufacturing Practice, GMP) [13, 16].

Еще одним очень популярным устройством для производства БМКП является система G-Rex, которая представляет собой колбу со специальной газопроницаемой силиконовой мембраной на дне [18, 19]. Использование системы G-Rex показывает высокую эффективность культивирования клеток и позволяет успешно производить клинические БМКП. Силиконовая мембрана обеспечивает оптимальный газообмен, а большой объем среды – достаточное количество питательных веществ для клеток [18, 20]. Производство БМКП в системе G-Rex является экономически более выгодным, чем в CliniMACS Prodigy, однако требует большего вмешательства со стороны человека [12].

В данном исследовании мы представляем сравнение клеточного состава и функциональных свойств клинических анти-CD19 БМКП, произведенных с помощью платформ G-Rex и CliniMACS Prodigy.

Correspondence:

Ekaterina A. Malakhova,
MD in Clinical Laboratory Medicine
at the Laboratory of Transplantation
Immunology and Immunotherapy of Blood
Malignancies at the Dmitry Rogachev
National Medical Research Center of Pediatric
Hematology, Oncology and Immunology
of Ministry of Healthcare of the Russian
Federation; a researcher at the Institute
of Theoretical and Experimental Biophysics
Address: 1 Samory Mashela St.,
Moscow 117997, Russia
E-mail: mallahovka@yandex.ru

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Пациенты

В нашем исследовании были произведены 51 анти-CD19-БМКП: 26 с помощью системы CliniMACS Prodigy и 25 с помощью платформы G-Rex. В работе применяли CAR второго поколения с костимулирующим доменом 4-1BB и трансмембранным доменом TNFRSF19 (белок суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли 19). Изготовленные анти-CD19-БМКП использовали для лечения педиатрических пациентов с рецидивирующим/рефрактерным В-клеточным острым лимфобластным лейкозом (~5% пациентов с В-клеточной лимфомой). Медиана возраста в выборке доноров при использовании CliniMACS Prodigy составила 11 лет, G-Rex – 32 года. Данное исследование было одобрено независимым этическим комитетом и утверждено решением ученого совета ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева». Доноры и пациенты предоставили письменное согласие на участие в исследовании. Все этапы подготовки и самой процедуры изготовления БМКП проводились в соответствии с правилами GMP.

Производство анти-CD19-биомедицинских клеточных продуктов с помощью платформы CliniMACS Prodigy

Для успешного производства БМКП каждому донору производилась предварительная оценка содержания наивных Т-лимфоцитов в периферической крови. В исследование включались доноры, имеющие более 50 клеток/мкл. В день –1 осуществляли сбор мононуклеарных клеток периферической крови на автоматическом сепараторе Spectra Optia (TERUMO BCT), после чего определяли количество Т-лимфоцитов в полученном продукте (стадия лейкофереза). В день 0 продукт лейкофереза в количестве $3\text{--}5 \times 10^8$ Т-клеток разводили буфером CliniMACS PBS/EDTA GMP (Milteny Biotec, Германия), содержащим 0,5% сывороточного альбумина человека, который затем помещали в систему CliniMACS Prodigy для последующей селекции CD4⁺- и CD8⁺-лимфоцитов. Процесс селекции проводили с использованием реагентов Microbeads CliniMACS CD4 GMP Reagent (Milteny Biotec, Германия) и CliniMACS CD8 GMP Reagent (Milteny Biotec, Германия). Затем 100×10^6 полученных Т-лимфоцитов активировали в среде TechMACS GMP (Milteny Biotec, Германия), содержащей 12,5 нг/мл рекомбинантных человеческих IL-7 и IL-15 MACS GMP (Milteny Biotec, Германия), с добавлением реагента MACS GMP T-cell TransAct (Milteny Biotec, Германия) в соответствии с рекомендациями производителя. Через 24 ч к активированным Т-лимфоцитам добавляли лентивирусный

вектор aCD19 CAR SF (рисунок 1А) (Milteny Biotec, Германия), после чего клетки инкубировали в течение 2 дней. На день +3 продукт отмывали и продолжали культивирование. Замену среды осуществляли каждые 24 ч, начиная с дня +5. Длительность производственного процесса составляла 7 дней (рисунок 1Б).

Производство анти-CD19-биомедицинских клеточных продуктов с помощью платформы G-Rex

В день 0 осуществляли взятие периферической крови в пробирки CPT (Becton Dickinson, США) с последующим выделением мононуклеарных клеток согласно протоколу производителя. Затем фракции CD4⁺ и CD8⁺ лимфоцитов сортировали с использованием антител CD4-VioBlue human GMP (Milteny Biotec, Германия) и CD8-APC human GMP (Milteny Biotec, Германия) с помощью MACSQuant Tyto (Milteny Biotec, Германия). После процесса сортировки 5×10^6 Т-лимфоцитов помещали в биореактор G-Rex 10M-CS и активировали в среде TechMACS GMP (Milteny Biotec, Германия), содержащей 12,5 нг/мл рекомбинантных человеческих IL-7 и IL-15 MACS GMP (Milteny Biotec, Германия) с добавлением реагента MACS GMP T-cell TransAct (Milteny Biotec, Германия). Через 24 ч к активированным Т-лимфоцитам добавляли лентивирусный вектор aCD19 CAR SF (Milteny Biotec, Германия), после чего клетки инкубировали в течение 2 дней. На день +3 осуществляли доливку среды. Замену среды производили 1 раз на день +7. Длительность процесса производства составляла 9 дней (рисунок 1В).

Культивирование клеточной линии

Клеточную линию мантийноклеточной лимфомы Jeko-1, экспрессирующую CD19, культивировали в среде RPMI-1640 (Stemcell Technologies, Канада) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (Stemcell Technologies, Канада), 1% пенициллина-стрептомицина (Gibco, США) и 2 мМ L-глутамин (Servicebio, Китай). Клетки поддерживали в концентрации $4\text{--}6 \times 10^5$ клеток/мл в инкубаторе при 37°C и 5% CO₂.

Анализ дегрануляции и внутриклеточной секреции цитокинов

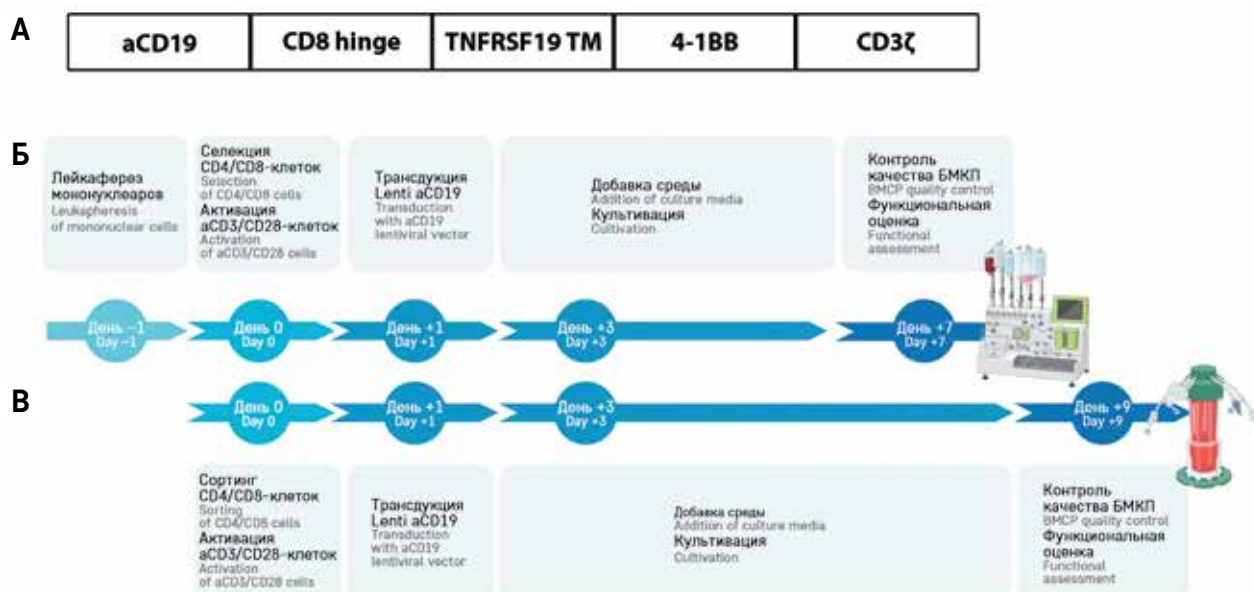
Функциональное тестирование анти-CD19-БМКП включало исследование дегрануляции и анализ секреции цитокинов фактор некроза опухоли-α (ФНО-α), интерферон-γ (ИФН-γ) после инкубации с клеточной линией Jeko-1. Перед функциональной оценкой анти-CD19-БМКП культивировали в среде TechMACS (Milteny Biotec, Германия) без добавления IL-7, IL-15 в течение 24 ч. Для оценки дегрануляции анти-CD19-БМКП инкубировали с клеточной линией Jeko-1 в соотношении 1:1 в количестве

Рисунок 1

А – структура лентивирусного вектора, кодирующего CAR. Схемы процессов производства анти-CD19-БМКП с помощью платформ CliniMACS Prodigy (Б) и G-Rex (В)

Figure 1

The structure of a lentiviral vector encoding CAR (A). Schematics showing the manufacturing processes for anti-CD19 biomedical cell products (BMCP) on the CliniMACS Prodigy (Б) and G-Rex (В) platforms



2×10^5 клеток на лунку в течение 2 ч при 37°C и 5% CO₂ с добавлением моноклонального антитела CD107a-PE (Becton Dickinson, США). Для исследования секреции цитокинов клетки инкубировали в тех же условиях в течение 3 ч с добавлением GlogiPlug (Becton Dickinson, США). Затем образцы отмывали и инкубировали с панелями антител CD8-FITC (Miltenyi Biotec, Германия), CD107a-PE (Becton Dickinson, США), CD4-APC-Cy7 (Miltenyi Biotec, Германия) для оценки дегрануляции и CD8-VioGreen (Miltenyi Biotec, Германия), CD4-APC-Cy7 (Miltenyi Biotec, Германия), CD3-APC (Becton Dickinson, США), 7-AAD-PerCP (Becton Dickinson, США) для анализа секреции цитокинов. Внутриклеточное окрашивание ФНО-α и ИФН-γ осуществляли по протоколу производителя Inside Stain Kit (Miltenyi Biotec, Германия), используя антитела TNF-α-PE-Vio-770 (Miltenyi Biotec, Германия) и IFNγ-PE (Miltenyi Biotec, Германия). Эффективность внутриклеточной секреции цитокинов и поверхностную экспрессию CD107a на Т-лимфоцитах оценивали с помощью проточного цитометра CytoFlex (Beckman Coulter, США). Для каждого образца в регионе CD3⁺ было собрано не менее 50 000 событий. Данные обрабатывали с помощью программы CytExpert версии 2.3.

В качестве контроля в функциональных тестах использовали Т-лимфоциты (МОСК-клетки), эффект которых вычитали из эффекта анти-CD19-БМКП. Для сравнения результатов эффективности экспрессии CD107a и внутриклеточной секреции ФНО-α, ИФН-γ мы нормализовали полученные данные на процент трансдукции.

Оценка клеточного состава продуктов селекции, сортировки и анти-CD19-биомедицинских клеточных продуктов

Для оценки качества производства анти-CD19-БМКП использовали метод проточной цитометрии. На стадиях лейкофереза, в стартовых продуктах сортировки и селекции, а также в финальных анти-CD19-БМКП оценивали клеточный состав и жизнеспособность, используя панель антител А, представленную в таблице 1. Для определения эффективности трансдукции анти-CD19-БМКП инкубировали с CD19 CAR Detection Reagent Biotin (Miltenyi Biotec, Германия). Затем клетки отмывали и инкубировали с панелью антител Б (таблица 1). Образцы в описанных выше экспериментах анализировали с помощью проточного цитометра MACSQuant. Для каждого исследования было собрано не менее 100 000 событий в регионе CD3⁺. Данные обрабатывали с помощью программы MACS Quantify версии 2.13.1.

В продуктах сортировки и селекции, а также в финальных анти-CD19-БМКП оценивали состав Т-клеток памяти и экспрессию маркеров истощения. Состав Т-клеток памяти охарактеризовали по экспрессии маркеров CD197 и CD45RA: T_n – CD3⁺CD197⁺CD45RA⁺ (наивные), T_{cm} – CD3⁺CD197⁺CD45RA⁻ (центральные), T_{em} – CD3⁺CD197⁻CD45RA⁻ (эффекторные), T_{EMRA} – CD3⁺CD197⁻CD45RA⁺ (терминально дифференцированные эффекторные).

Экспрессию маркеров истощения в продуктах селекции и анти-CD19-БМКП, произведенных с

помощью системы CliniMACS Prodigy, оценивали, используя панель антител В, состав Т-клеток памяти – панель Г (таблица 1). Для определения состава Т-клеток памяти и экспрессии маркеров истощения в продуктах сортирования и анти-CD19-БМКП, полученных с использованием биореактора G-Rex, применяли панели антител Д, Е (таблица 1). Образцы, описанные выше, анализировали с использованием проточного цитометра CytoFlex (Beckman Coulter, США). Для каждого исследования было собрано не менее 50 000 событий в регионе CD3+. Данные обрабатывали с помощью программы CytExpert версии 2.3.

Статистический анализ

Для статистической обработки результатов исследования использовали программу GraphPad Prism 8.0.1 (GraphPad Software, США). Уровень статистической значимости описывался как *, **, *** и **** для значений $p < 0,05$, $< 0,01$, $< 0,001$ и $< 0,0001$ соответственно. Для сравнения 2 выборок применяли непарный критерий Манна–Уитни. Для поиска корреляции между 2 выборками использовали критерий Спирмена.

Таблица 1

Используемые панели антител

Tables 1

Antibody panels used in the study

Панель А – Клеточный состав Panel A – Cell composition	Панель Б – Клеточная трансдукция Panel B – Cell transduction	Панель В – Клеточное истощение, Prodigy Panel B – Cell exhaustion, Prodigy	Панель Г – Фенотип популяций Т-клеток памяти, Prodigy Panel G – Phenotype of memory T cell populations, Prodigy	Панель Д – Клеточное истощение, G-Rex Panel D – Cell exhaustion, G-Rex	Панель Е – Фенотип популяций Т-клеток памяти, G-Rex Panel E – Phenotype of memory T cell populations, G-Rex
CD45-VioBlue human (Miltenyi Biotec, 5B1, Germany)	CD45-VioBlue human (Miltenyi Biotec, 5B1, Germany)	TIGIT-PE-Vio770 human (Miltenyi Biotec, REA1004, Germany)	CD45RA-PerCP human (Miltenyi Biotec, T6D11, Germany)	TIGIT-PE-Vio770 human (Miltenyi Biotec, REA1004, Germany)	CD45RA-Alexa Fluor 700 human (Beckman Coulter, 2H4LDH11LDB9, USA)
CD4-VioGreen human (Miltenyi Biotec, REA623, Germany)	CD4-VioGreen human (Miltenyi Biotec, REA623, Germany)	CD4-VioGreen human (Miltenyi Biotec, VIT4, Germany)	CD4-VioGreen human (Miltenyi Biotec, VIT4, Germany)	CD4-VioBlue human (Miltenyi Biotec, M-T466, Germany)	CD4-VioBlue human (Miltenyi Biotec, M-T466, Germany)
CD3-FITC human (Miltenyi Biotec, REA613, Germany)	CD3-FITC human (Miltenyi Biotec, BW264/56, Germany)	CD3-PE-Vio615 human (Miltenyi Biotec, REA613, Germany)	CD3-PE-Vio615 human (Miltenyi Biotec, REA613, Germany)	CD3-VioGreen human (Miltenyi Biotec, REA613, Germany)	CD3-VioGreen human (Miltenyi Biotec, REA613, Germany)
CD8-APC-Vio770 human (Miltenyi Biotec, REA734, Germany)	CD8-APC-Vio770 human (Miltenyi Biotec, REA734, Germany)	CD8-Qdot655 human (Invitrogen, 3B5, USA)	CD8-APC-Vio770 human (Miltenyi Biotec, REA734, Germany)	CD8-APC human (Miltenyi Biotec, BW135/80, Germany)	CD8-APC human (Miltenyi Biotec, BW135/80, Germany)
7AAD-Per-CP (Miltenyi Biotec, Germany)	7AAD-Per-CP (Miltenyi Biotec, Germany)	7AAD-Per-CP (Miltenyi Biotec, Germany)	CD197-PE-Vio770 human (Miltenyi Biotec, REA108, Germany)	7AAD-Per-CP (Miltenyi Biotec, Germany)	7AAD-Per-CP (Miltenyi Biotec, Germany)
CD19-PE-Vio770 human (Miltenyi Biotec, LT19, Germany)	Anti-Biotin-PE human (Miltenyi Biotec, REA746, Germany)	CD279-Vio Bright FITC human (Miltenyi Biotec, PD1.3.1.3, Germany)		CD279-Vio Bright FITC human (Miltenyi Biotec, PD1.3.1.3, Germany)	CD279-Vio Bright FITC human (Miltenyi Biotec, PD1.3.1.3, Germany)
CD14-APC human (Miltenyi Biotec, REA599, Germany)	CD14-APC human (Miltenyi Biotec, REA599, Germany)				CD197-PE-Vio770 human (Miltenyi Biotec, REA108, Germany)
CD56-PE human (Miltenyi Biotec, REA196, Germany)					CD45-PE-Vio615 human (Miltenyi Biotec, REA747, Germany)
CD16-PE human (Miltenyi Biotec, REA423, Germany)					

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В нашем исследовании были успешно произведены 51 анти-CD19-БМКП: 26 с помощью автоматизированной системы CliniMACS Prodigy и 25 с использованием неавтоматизированной платформы G-Rex. К концу культивирования в CliniMACS Prodigy количество Т-лимфоцитов возросло в 15,6 раза, достигнув $1,6 \times 10^9$ ($0,4\text{--}2,5 \times 10^9$). При производстве в системе G-Rex число Т-клеток увеличилось в 48 раз, составив $2,4 \times 10^8$ ($1\text{--}3,9 \times 10^8$) (рисунок 2А). Отмечается преобладание CD4+ Т-лимфоцитов, медиана CD4/CD8 для процессов в CliniMACS Prodigy не изменилась в ходе культивирования и составила 1,3. Для процессов в G-Rex медиана снизилась с 2,1 на старте производства до 1,2 в финале (рисунок 2Б, В). Эффективность трансдукции статистически значимо преобладала в анти-CD19-БМКП, произведенных в системе CliniMACS Prodigy, и достигла 41,0% (19,4–60,6%) от CD3+, в то время как в процессах, полученных с помощью G-Rex, медиана составила 26,3% (13,2–38,7%) (рисунок 2Г). Несмотря

Рисунок 2

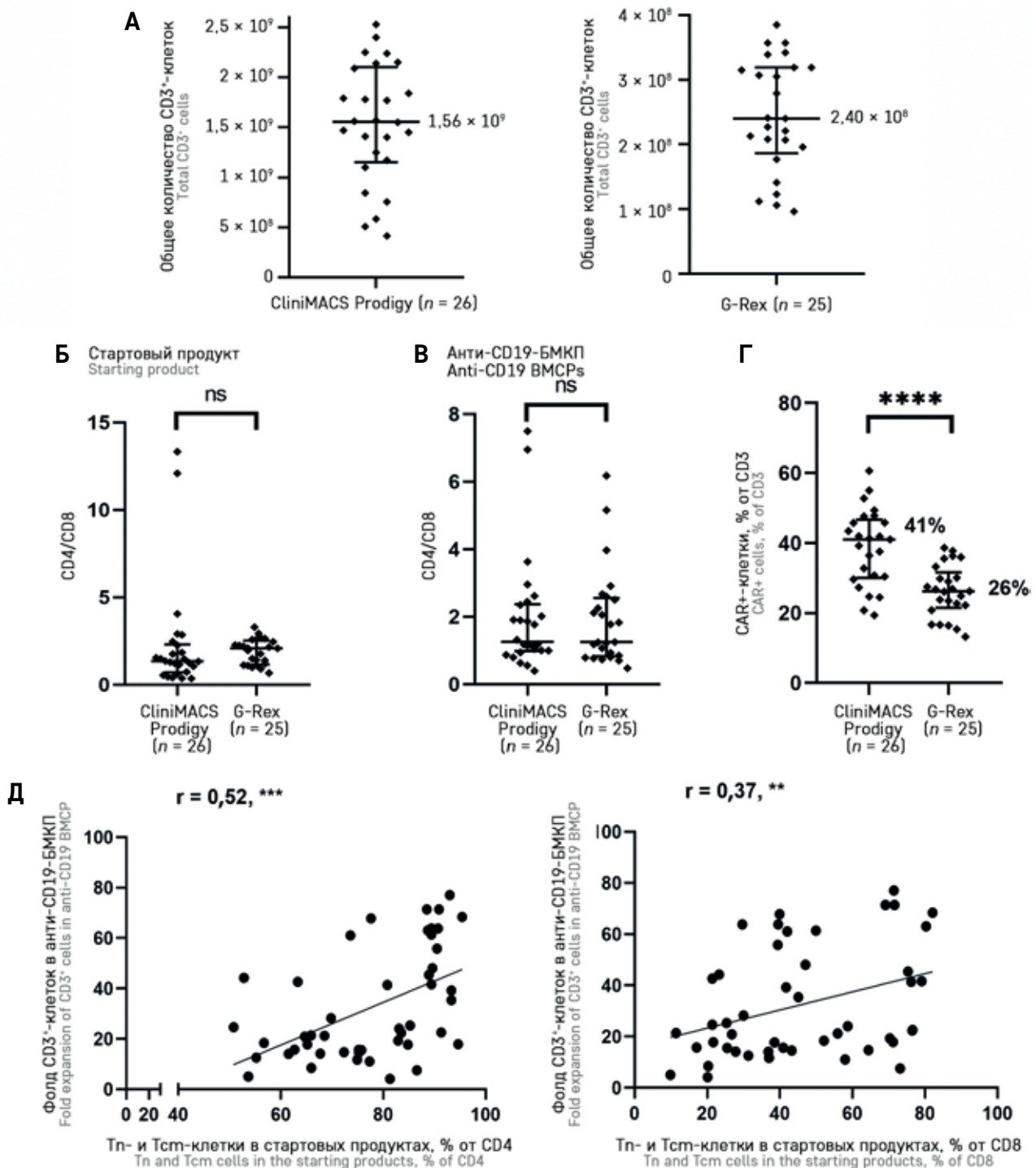
А – общее количество $CD3^+$ -лимфоцитов в анти-CD19-БМКП, произведенных с помощью платформ CliniMACS Prodigy (слева) и G-Rex (справа). Влияние способа производства на $CD4/CD8$ в стартовых продуктах (Б) и в финальных анти-CD19-БМКП (В). Г – влияние типа производственной платформы на эффективность трансдукции в финальных анти-CD19-БМКП. Д – корреляция между суммой Т-наивных и Т-клеток центральной памяти в стартовых продуктах в $CD4^+$ (слева) и $CD8^+$ (справа) лимфоцитах и значениями прироста клеток в финальных анти-CD19-БМКП.

Для рисунков А–Г представлены медианы с межквартильными размахами. Уровень статистической значимости описывался как ns – незначимый; *, **, *** и **** для значений $p < 0,05$, $< 0,01$, $< 0,001$ и $< 0,0001$ соответственно.

Figure 2

А – a total number of $CD3^+$ cells in the anti-CD19 BMCPs manufactured using the CliniMACS Prodigy (left) and G-Rex (right) platforms. The effect of the manufacturing method on the $CD4/CD8$ ratio in the starting products (Б) and in the final anti-CD19 BMCPs (В). Г – the effect of the type of manufacturing platform on transduction efficiency in the final anti-CD19 BMCPs. Д – a correlation between the sum of naïve and central memory T cells in the starting products in $CD4^+$ (left) and $CD8^+$ (right) cells and cell growth values in the final anti-CD19 BMCPs.

For Figures А–Г, medians with interquartile ranges are presented. Statistical significance was described as follows: ns, not significant; * – $p < 0.05$; ** – $p < 0.01$; *** – $p < 0.001$; **** – $p < 0.0001$.



на полученную разницу в значениях трансдукции, в данном исследовании количество необходимых CAR-специфичных Т-лимфоцитов было достигнуто для всех процессов.

Анти-CD19-БМКП, произведенные с помощью обеих платформ, в основном были представлены CD3⁺-лимфоцитами. В части продуктов, изготовленных в CliniMACS Prodigy, встречалась популяция CD3⁺CD56⁺, медиана составила 2,0% (0,6–24,2%), в G-Rex-процессах – 0,8% (0,1–3,7%). Других клеточных популяций (моноцитов, нейтрофилов, эозинофилов), включая CD19⁺ В-лимфоциты и бластные клетки, при производстве на обеих платформах обнаружено не было. Содержание NK-клеток во всех процессах не превышало 0,2%.

Характеристика анти-CD19-БМКП, а также продуктов, полученных после процессов сортировки или селекции, представлены в *таблицах 2, 3*. Нами продемонстрировано, что CD4⁺ Т-лимфоциты в продуктах сортировки и селекции в основном представлены популяциями T_H и T_{CM}. CD8⁺ Т-лимфоциты также содержали TEMRA: в продукте селекции – 24,1%, в продукте сортировки – 17,3% (*рисунок 3А*). Количество CD4⁺ T_H-лимфоцитов было незначительно выше в продуктах сортировки ($p = 0,0459$), а число CD4⁺ T_{CM}-лимфоцитов преобладало в продуктах селекции ($p = 0,0102$) (*таблица 2*). Статистически значимых различий в составе CD8⁺ Т-лимфоцитов обнаружено не было. Также мы обнаружили положительную корреляцию между популяциями, имеющими высокий пролиферативный потенциал (сумма Т-наивных и Т-клеток центральной памяти в CD8⁺- и CD4⁺-лимфоцитах соответственно) в стартовых продуктах, и значениями прироста клеток в финальных анти-CD19-БМКП ($r = 0,52$ для CD4⁺, $r = 0,37$ для CD8⁺) (*рисунок 2Д*).

В финале производства анти-CD19-БМКП, полученные с помощью платформ CliniMACS Prodigy и G-Rex, были представлены популяциями T_{CM}-и T_{EM}-клеток памяти (*таблица 3*). При этом в продуктах, произведенных с помощью системы CliniMACS Prodigy, наблюдалось более выраженное преобладание популяции T_{CM} над T_{EM} в CD4⁺ ($p = 0,0277$) и CD8⁺ ($p = 0,0001$) Т-лимфоцитах по сравнению с БМКП, полученными в G-Rex (*рисунок 3Б*). Количество T_{EM}, соответственно, было статистически значимо выше в анти-CD19-БМКП, произведенных с помощью платформы G-Rex, по сравнению с CliniMACS Prodigy (для CD4⁺ $p = 0,0188$, для CD8⁺ $p = 0,0002$) (*рисунок 3Б*).

Анализ экспрессии маркеров клеточного источника показал, что в ходе производства анти-CD19-БМКП, содержание TIGIT и CD279 на поверхности Т-лимфоцитов, снижается (*рисунок 3В, таблицы 2, 3*). В продуктах, полученных после процессов селекции,

медиана экспрессии CD279 составляла 29,9% в CD4⁺ и 26,0% в CD8⁺ Т-лимфоцитах, при этом в финале производственного цикла количество CD279⁺ Т-клеток снижалось до 13,3% в CD4⁺ и до 7,5% в CD8⁺. В процессах с использованием платформы G-Rex наблюдались схожие изменения. В продуктах, полученных после процессов сортировки, содержание CD279 составляло 20,4% в CD4⁺ и 25,4% в CD8⁺ Т-лимфоцитах, при этом в финале производства количество CD279⁺ Т-клеток снизилось до 18,3% в CD4⁺ и до 7,6% в CD8⁺. Кроме того, было обнаружено, что уровень экспрессии TIGIT на поверхности CD4⁺ Т-лимфоцитов статистически значимо выше в процессах с использованием системы CliniMACS Prodigy в продуктах сортировки ($p = 0,0477$) и финальных анти-CD19-БМКП ($p = 0,0046$) (*рисунок 3В, таблицы 2, 3*). При этом статистически значимых различий в уровне экспрессии CD279 при использовании разных производственных платформ найдено не было.

Анализ функциональной активности показал, что все анти-CD19-БМКП, произведенные с помощью платформ CliniMACS Prodigy и G-Rex, экспрессировали CD107a и продуцировали ФНО-α после инкубации с клеточной линией Jeko-1. При этом уровни экспрессии CD107a и секреции ФНО-α статистически значимо были выше в процессах с использованием системы CliniMACS Prodigy ($p < 0,0001$) (*рисунок 3Г, таблица 3*). Внутриклеточная секреция ИФН-α в анти-CD19-БМКП, произведенных с помощью платформы G-Rex, практически отсутствовала, медиана составила 1,1% (0,3–9,9%), в то время как в процессах с использованием CliniMACS Prodigy выработка ИФН-α достигла 20,4% (2,0–51,7%).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Производство БМКП, соответствующее требованиям GMP, в местах оказания высокотехнологичной медицинской помощи делает CAR-T-терапию более доступной. Вместе с ростом количества различных видов БМКП появляется все больше платформ, способных обеспечить их высококачественное клиническое производство [12]. В данном исследовании мы представили сравнение анти-CD19-БМКП, изготовленных с помощью 2 наиболее часто используемых технологий: системы CliniMACS Prodigy ($n = 26$) и платформы G-Rex ($n = 25$). Наша работа подтверждает предыдущие сообщения о том, что с помощью обеих платформ можно получить анти-CD19-БМКП высокого качества, имеющий удовлетворительные параметры трансдукции и достаточное количество клеток для дальнейшего клинического применения. В настоящий момент отсутствуют четкие рекомендации относительно доз использования анти-CD19-БМКП, более того, для каждого

Рисунок 3

А – состав $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-лимфоцитов в продуктах селекции (слева) и сортировки (справа). Б – влияние типа производственной платформы на процент $CD4^+$ Tcm, $CD4^+$ Tem, $CD8^+$ Tcm, $CD8^+$ Tem (слева направо) в анти-CD19-БМКП. В – влияние типа производственной платформы на экспрессию маркеров клеточного истощения TIGIT, CD279 в $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-лимфоцитах в анти-CD19-БМКП. Г – влияние типа производственной платформы на экспрессию CD107a и выработку цитокинов (ФНО- α и ИФН- γ) после инкубации анти-CD19-БМКП с клеточной линией Јеко-1. Для рисунка А представлены медианные значения; для рисунков Б–Г – медианы с межквартильными размахами. Уровень статистической значимости описывался как ns – незначимый; *, **, *** и **** для значений $p < 0,05$, $< 0,01$, $< 0,001$ и $< 0,0001$ соответственно.

Figure 3

A – the composition of $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells in the products of selection (left) and products of sorting (right). Б – the effect of the type of manufacturing platform on the percentage of $CD4^+$ Tcm, $CD4^+$ Tem, $CD8^+$ Tcm, $CD8^+$ Tem (from left to right) in the anti-CD19 BMCPs. B – the effect of the type of manufacturing platform on the expression of T cell exhaustion markers TIGIT and CD279 in $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells in anti-CD19 BMCP. Г – the effect of the type of manufacturing platform on CD107a expression and cytokine production (TNF- α and IFN- γ) after the incubation of anti-CD19 BMCP with the Јеко-1 cell line. Tn – naive T cells; Tcm – central memory T cells; Tem – effector memory T cells; TEMRA – terminally differentiated effector memory cells, median values are presented. For Figure A, median values are presented; for Figures Б–Г, medians with interquartile ranges are presented. Statistical significance was described as follows: ns, not significant; * – $p < 0.05$; ** – $p < 0.01$; *** – $p < 0.001$; **** – $p < 0.0001$.

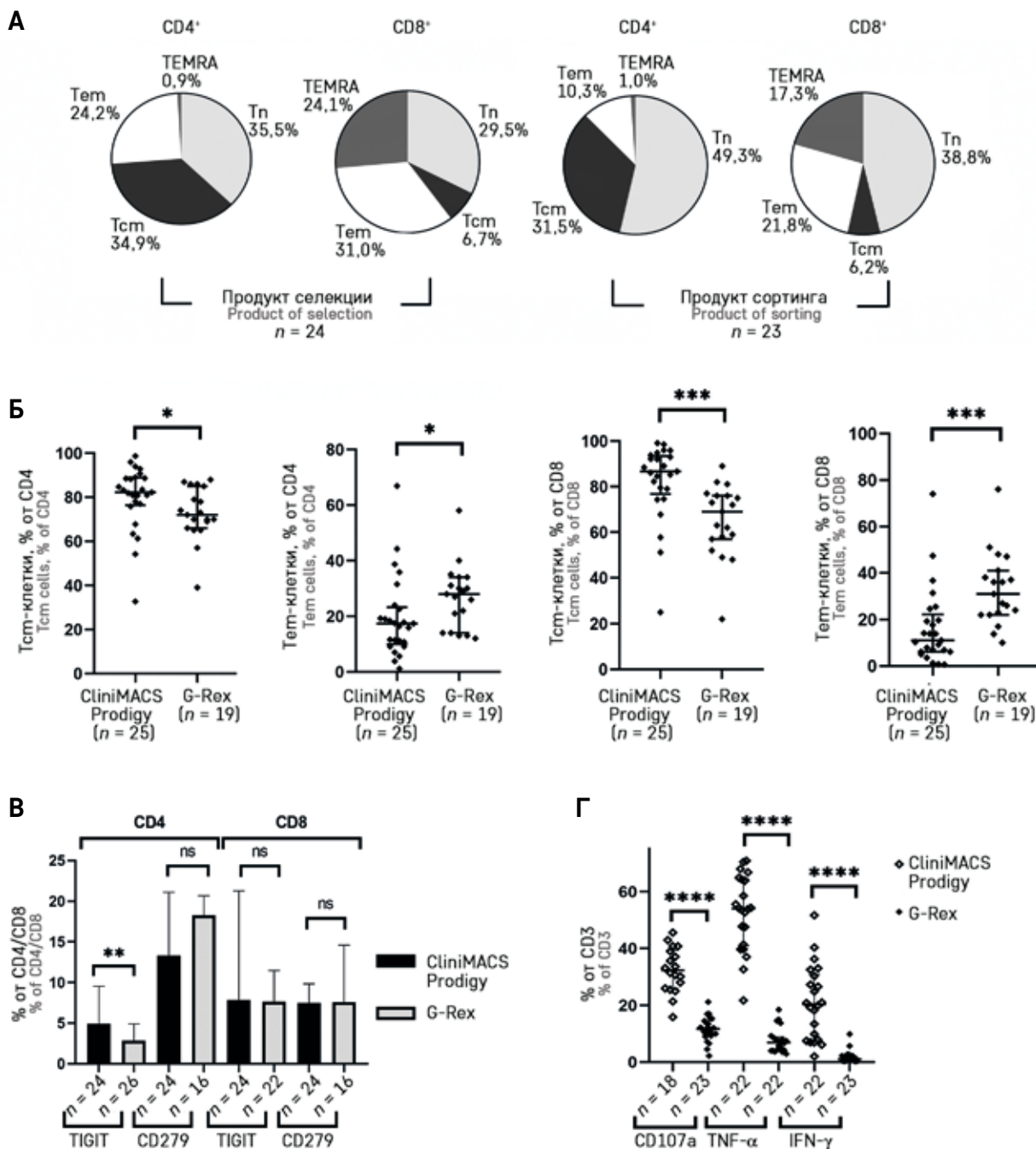


Таблица 2

Основные характеристики продуктов сортирования и селекции на старте изготовления БМКП

Tables 2

The main characteristics of sorting and selection products at the start of BMCP manufacturing process

Клеточные популяции Cell populations	Продукт селекции Product of selection	Продукт сортирования Product of sorting	p-значение p value
CD8 ⁺ Tn	29,5% (2,6–67,8%), n = 24	38,8% (14,4–80,9%), n = 23	ns
CD4 ⁺ Tn	35,5% (14,3–69,3%), n = 24	49,3% (16,7–78,7%), n = 23	0,0459*
CD8 ⁺ Tcm	6,7% (0,9–13,9%), n = 24	6,2% (0,6–27,5%), n = 23	ns
CD4 ⁺ Tcm	34,9% (18,1–52,4%), n = 24	31,5% (16,7–53,1%), n = 23	ns
CD8 ⁺ Tem	31,0% (6,5–65,6%), n = 24	21,8% (4,8–56,1%), n = 23	ns
CD4 ⁺ Tem	24,2% (5,0–45,2%), n = 24	10,3% (4,0–45,3%), n = 23	0,0102*
CD8 ⁺ TEMRA	24,1% (4,4–47,7%), n = 24	17,3% (3,7–55,2%), n = 23	ns
CD4 ⁺ TEMRA	0,9% (0,2–6,0%), n = 24	1,0% (0,1–5,4%), n = 23	ns
CD8 ⁺ CD279 ⁺	26,0% (1,7–67,9%), n = 24	25,4% (6,8–46,0%), n = 20	ns
CD4 ⁺ CD279 ⁺	29,9% (4,1–62,2%), n = 24	20,4% (7,0–44,8%), n = 20	ns
CD8 ⁺ TIGIT ⁺	27,0% (13,8–60,8%), n = 24	30,5% (4,8–59,1%), n = 22	ns
CD4 ⁺ TIGIT ⁺	17,6% (7,7–48,9%), n = 24	14,0% (5,4–24,0%), n = 22	0,0477*

Примечание. Представлены медианные, а также минимальные и максимальные значения (в скобках) различных характеристик. Уровень статистической значимости описывался как ns – незначимый; * – $p < 0,05$.

Notes. Data are presented as median and minimum-to-maximum range. Statistical significance was described as follows: ns, not significant; * – $p < 0.05$.

Таблица 3

Основные характеристики анти-CD19-БМКП (финальные продукты)

Tables 3

The main characteristics of the anti-CD19 BMCPs (final products)

Клеточные популяции Cell populations	CliniMACS Prodigy	G-Rex	p-значение p value
CD3 ⁺ CAR ⁺	41,0% (19,4–60,6%), n = 25	26,3% (13,2–38,7%), n = 25	< 0,0001****
CD8 ⁺ Tcm	86,7% (25,0–99,1%), n = 25	69,0% (22,0–89,0%), n = 19	0,0001***
CD4 ⁺ Tcm	82,3% (32,8–98,8%), n = 25	72,0% (39,0–88,0%), n = 19	0,0277*
CD8 ⁺ Tem	11,1% (0,7–74,0%), n = 25	31,0% (10,0–76,0%), n = 19	0,0002*
CD4 ⁺ Tem	17,4% (1,2–66,9%), n = 25	28,0% (12,0–58,0%), n = 19	0,0188*
CD8 ⁺ CD279 ⁺	7,5% (1,5–15,1%), n = 24	7,6% (0,9–30,9%), n = 16	ns
CD4 ⁺ CD279 ⁺	13,3% (4,8–42,3%), n = 24	18,3% (0,5–40,7%), n = 16	ns
CD8 ⁺ TIGIT ⁺	7,9% (3,0–29,3%), n = 24	7,7% (2,0–20,9%), n = 22	ns
CD4 ⁺ TIGIT ⁺	4,9% (2,0–16,5%), n = 24	2,9% (1,0–9,4%), n = 22	0,0046**
CD3 ⁺ CD107a ⁺	32,3% (15,9–45,6%), n = 18	11,7% (2,2–21,2%), n = 23	< 0,0001****
CD3 ⁺ TNF- α ⁺	54,1% (21,8–70,9%), n = 22	7,0% (2,9–18,5%), n = 22	< 0,0001****
CD3 ⁺ IFN- γ ⁺	20,4% (2,0–51,7%), n = 22	1,1% (0,3–9,9%), n = 23	< 0,0001****

Примечание. Представлены медианные, а также минимальные и максимальные значения (в скобках) различных характеристик. Уровень статистической значимости описывался как ns – незначимый; *, ** и **** для значений $p < 0,05$, $< 0,01$, $< 0,001$ и $< 0,0001$ соответственно.

Notes. Data are presented as median and minimum-to-maximum range. Statistical significance was described as follows: ns – not significant; * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$; **** – $p < 0,0001$.

отдельного вида клеточного продукта необходимо учитывать такие факторы, как опухолевая нагрузка, кинетика экспансии CAR-T и частота развития сочетанных с терапией осложнений. Наше исследование предполагало дальнейшее использование клеточного продукта в дозе 1×10^5 клеток/кг массы тела пациента. Все полученные продукты имели удовлетворительные характеристики дозы CAR-T: минимальное количество клеток при производстве на платформе G-Rex составило $1,8 \times 10^7$, при использовании CliniMACS Prodigy – $1,2 \times 10^8$. Следует отметить, что к концу культивирования в системе G-Rex число Т-клеток увеличилось в 48 раз, достигнув $2,4 \times 10^8$, в то время как в CliniMACS Prodigy количество Т-лимфоцитов возросло в 15,6 раза, составив $1,6 \times 10^9$. Данное различие согласуется с ранее опубликованными результатами [16] и может быть связано с продолжительностью процесса (CliniMACS

Prodigy – 7 дней, G-Rex – 9 дней), особенностями строения устройств для выращивания клеток, а также разным количеством CD3⁺-клеток, используемых в начале производства для активации (CliniMACS Prodigy – 100×10^6 , G-Rex – 5×10^6), что затрудняет прямое сравнение. Согласно рекомендациям производителей, в системе G-Rex 10M-CS возможно вырастить $200\text{--}400 \times 10^6$ клеток, в CliniMACS Prodigy – 5×10^9 . Еще одним важным отличием при производстве в системе CliniMACS Prodigy является возможность применения анти-CD19-БМКП для терапии без этапа криоконсервации. При использовании платформы G-Rex криоконсервация является обязательной, так как требуется более расширенный контроль качества из-за высокого риска контаминации.

Важным этапом в нашем исследовании являлась детальная характеристика состава Т-лимфоцитов на

разных этапах производства. Мы показали, что CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоциты в стартовых продуктах содержат значительную долю популяций Tn и Tcm, что является важным маркером качественного CAR-T-клеточного продукта. Кроме того, мы обнаружили положительную корреляцию между суммой популяций Tn и Tcm в стартовых продуктах сортировки, селекции и значениями уровня клеточной экспансии Т-лимфоцитов в анти-CD19-БМКП. Полученные нами данные согласуются с результатами другой работы, где была продемонстрирована связь между содержанием популяции Tn в CD8⁺-лимфоцитах в продуктах селекции и общим количеством CD3⁺-клеток в финальных анти-CD19-БМКП, произведенных с помощью платформы CliniMACS Prodigy [21]. На сегодняшний день отдельное внимание уделяют не только составу CD4 и CD8 Т-клеток, но и сохранению более стволового фенотипа Т-лимфоцитов. Вопрос о том, какие качественные и количественные характеристики должны демонстрировать Т-лимфоциты на старте и в финале культивирования, является предметом больших дискуссий. Так, отдельное внимание уделяют не только составу CD4- и CD8-лимфоцитов, но и сохранению максимально возможной клеточной «молодости», пытаясь так или иначе приблизить продукт к популяции Tscm, имеющей высокий пролиферативный потенциал. Например, использование ингибитора Gsk-3 (glycogen synthase kinase 3) в ряде работ демонстрирует улучшенные качества Т-клеточного продукта за счет снижения экспрессии FasL, увеличения пролиферативных свойств и уменьшения истощенности из-за снижения экспрессии PD-1 [22]. Группа исследователей D. Sommermeier и соавт. [23] показала, что использование комбинации популяций из CD8⁺ Tcm и CD4⁺ Tn-лимфоцитов для выращивания CAR-T-клеток приводит к наиболее выраженному противоопухолевому эффекту *in vivo*. Существуют исследования, показывающие, что популяции Tn и Tcm являются наиболее подходящими для трансдукции лентивирусного вектора и производства CAR-T-клеточного продукта с высокой противоопухолевой активностью и низкой экспрессией маркеров истощения [10, 23]. В нашей работе экспрессия маркеров клеточного истощения CD279 и TIGIT в продуктах сортировки и селекции наблюдалась на поверхности Т-лимфоцитов в незначительном количестве.

В нашем исследовании в финале производства анти-CD19-БМКП, изготовленные с помощью платформ CliniMACS Prodigy и G-Rex, были представлены популяциями Т-клеток памяти с преобладанием Tcm. Отсутствие Tn-лимфоцитов в финальных анти-CD19-БМКП связано с активацией и пролиферацией Т-клеток в процессе производства, которые сопровождаются потерей экспрессии маркера CD45RA

и переходом Tn в Tcm, что согласуется с ранее опубликованными данными [23, 24]. Также существуют сообщения о том, что костимулирующий домен 4-1BB, входящий в структуру CAR, способствует повышенному содержанию Tcm-лимфоцитов в финале производства, в то время как домен CD28 приводит к преобладанию популяции Tem [24, 25]. Найденное нами статистически значимое более выраженное преобладание популяции Tcm над Tem в CD4⁺ ($p = 0,0277$) и CD8⁺ ($p = 0,0001$) Т-лимфоцитах в анти-CD19-БМКП, изготовленных с помощью системы CliniMACS Prodigy, может быть связано с отличающимися условиями культивации: наличие шейкера, более частая смена среды и, как следствие, поддержание более стабильной концентрации IL-7 и IL-15 в CliniMACS Prodigy. Кроме того, более длительный цикл культивирования в системе G-Rex также может влиять на Tcm/Tem в анти-CD19-БМКП. Помимо преобладания Tcm-популяции в анти-CD19-БМКП мы наблюдали низкую экспрессию маркеров, ассоциированных с истощением Т-лимфоцитов, CD279, TIGIT при производстве с помощью обеих платформ, что, по ранее опубликованным данным, положительно влияет на последующую CAR-T-терапию [26, 27]. Известно, что наличие маркеров CD279 и TIGIT связано с дисфункциональным фенотипом Т-лимфоцитов, поэтому их повышенная экспрессия на CAR-T-клетках может привести к снижению эффективности терапии [26, 27].

Оценка специфичности анти-CD19-БМКП показала, что все CAR-T-лимфоциты, произведенные с помощью платформ CliniMACS Prodigy и G-Rex, проявляли таргетные свойства (экспрессировали CD107a и продуцировали цитокины) в отношении CD19-экспрессирующей клеточной линии Jeko-1. Однако функциональная активность продуктов, произведенных с помощью платформ CliniMACS Prodigy, была значительно выше. В работе F. Zhu и соавт. [16] упоминается о более низком проценте трансдуцированных клеток, а также сниженной функциональной активности CAR-T-клеточных продуктов, произведенных с использованием системы G-Rex по сравнению с CliniMACS Prodigy. В нашем исследовании мы наблюдаем те же эффекты, что может быть связано с особенностями режимов клеточного культивирования в этих системах. Более высокая доля дегранулирующих CAR-T-лимфоцитов после 7-дневного производственного цикла в CliniMACS Prodigy по сравнению с G-Rex процессами, длящимися 9 дней, может отражать более раннюю кинетику созревания эффекторов после активации Т-лимфоцитов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Наше исследование показало, что системы CliniMACS Prodigy и G-Rex представляют собой

надежные платформы, которые можно использовать для производства высококачественных анти-CD19-БМКП в местах оказания медицинской помощи. Несмотря на имеющиеся различия, все полученные БМКП, вне зависимости от выбора платформы, демонстрировали удовлетворительные характеристики. Исходя из предполагаемых к использованию доз ($\sim 0,1\text{--}1 \times 10^6$ CAR-T-лимфоцитов), производство в бioreакторе G-Rex представляется экономически более выгодным и доступным, так как требует меньшего расхода реагентов. Однако производство с помощью неавтоматизированной платформы более трудозатратно и требует усиления надзора со стороны системы контроля качества.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Не указан.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

ORCID

Malakhova E.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7334-0706>
Pershin D.E. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6148-7209>
Vedmedskaya V.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7247-4844>
Fadeeva M.S. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6553-2505>
Kulakovskaya E.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9639-2779>
Lodoeva O.B. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2874-0014>
Sozonova T.A. ORCID: <https://orcid.org/0009-0004-0057-2727>
Musaeva E.Ya. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0581-9472>
Muzalevsky Ya.O. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3513-8299>
Kazachenok A.S. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0497-9175>
Belchikov V.E. ORCID: <https://orcid.org/0009-0001-7491-6906>
Melkova A.K. ORCID: <https://orcid.org/0009-0000-3801-0931>
Shelikhova L.N. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0520-5630>
Molostova O.O. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2247-9337>
Badrin E.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8678-9705>
Maschan M.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1735-0093>

Литература / References

1. Rotte A., Frigault M.J., Ansari A., Gliner B., Heery C., Shah B. Dose-response correlation for CAR-T cells: a systematic review of clinical studies. *J Immunother Cancer* 2022; 10 (12): e005678.
2. Albinger N., Hartmann J., Ullrich E. Current status and perspective of CAR-T and CAR-NK cell therapy trials in Germany. *Gene Ther* 2021; 28 (9): 513–27.
3. Liu E., Marin D., Banerjee P., Macapinlac H.A., Thompson P., Basar R., et al. Use of CAR-Transduced Natural Killer Cells in CD19-Positive Lymphoid Tumors. *N Engl J Med* 2020; 382 (6): 545–53.
4. Saura-Esteller J., de Jong M., King L.A., Ensing E., Winograd B., de Gruijl T.D., et al. Gamma Delta T-Cell Based Cancer Immunotherapy: Past-Present-Future. *Front Immunol* 2022; 13: 915837.
5. Hadiloo K., Tahmasebi S., Esmaeilzadeh A. CAR-NKT cell therapy: a new promising paradigm of cancer immunotherapy. *Cancer Cell Int* 2023; 23 (1): 86.
6. Pan K., Farrukh H., Chittepu V.C.S.R., Xu H., Pan C., Zhu Z. CAR race to cancer immunotherapy: from CAR T, CAR NK to CAR macrophage therapy. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 2022; 41 (1): 119.
7. Chen Y.-J., Abila B., Mostafa Kamel Y. CAR-T: What Is Next? *Cancers (Basel)* 2023; 15 (3): 663.
8. Awasthi R., Maier H.J., Zhang J., Lim S. Kymriah® (tisagenlecleucel) – An overview of the clinical development journey of the first approved CAR-T therapy. *Hum Vaccin Immunother* 2023; 19 (1): 2210046.
9. Papadoulis I., Mueller-Berghaus J., Beuneu C., Ali S., Hofner B., Petavy F., et al. EMA Review of Axicabtagene Ciloleucel (Yescarta) for the Treatment of Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Oncologist* 2020; 25 (10): 894–902.
10. Arcangeli S., Falcone L., Camisa B., De Girardi F., Biondi M., Giglio F., et al. Next-Generation Manufacturing Protocols Enriching TSCM CAR T Cells Can Overcome Disease-Specific T Cell Defects in Cancer Patients. *Front Immunol* 2020; 11: 1217.
11. Erdoğan E., Yalçın K., Hemşinlioğlu C., Sezgin A., Seyis U., Kançağı D.D., et al. Preliminary Report of the Academic CAR-T (ISIKOK-19) Cell Clinical Trial in Turkey: Characterization of Product and Outcomes of Clinical Application. *Turk J Haematol* 2022; 39 (3): 206–10.
12. Ganeeva I., Zmievskaya E., Valiullina A., Kudriaeva A., Miftakhova R., Rybalov A., et al. Recent Advances in the Development of Bioreactors for Manufacturing of Adoptive Cell Immunotherapies.

- Bioengineering (Basel) 2022;9 (12): 808.
13. Mock U., Nickolay L., Philip B., Cheung GW-K., Zhan H., Johnston I.C.D., et al. Automated manufacturing of chimeric antigen receptor T cells for adoptive immunotherapy using CliniMACS prodigy. *Cytotherapy* 2016; 18 (8): 1002–11.
 14. Gee AP. GMP CAR-T cell production. *Best Pract Res Clin Haematol* 2018; 31 (2): 126–34.
 15. Castella M., Boronat A., Martín-Ibáñez R., Rodríguez V., Suñé G., Caballero M., et al. Development of a Novel Anti-CD19 Chimeric Antigen Receptor: A Paradigm for an Affordable CAR T Cell Production at Academic Institutions. *Mol Ther Methods Clin Dev* 2019; 12: 134–44.
 16. Zhu F., Shah N., Xu H., Schneider D., Orentas R., Dropulic B., et al. Closed-system manufacturing of CD19 and dual-targeted CD20/19 chimeric antigen receptor T cells using the CliniMACS Prodigy device at an academic medical center. *Cytotherapy* 2018; 20 (3): 394–406.
 17. Maschan M., Caimi P.F., Reese-Koc J., Sanchez G.P., Sharma A.A., Molostova O., et al. Multiple site place-of-care manufactured anti-CD19 CAR-T cells induce high remission rates in B-cell malignancy patients. *Nat Commun* 2021; 12 (1): 7200.
 18. Bajgain P., Mucharla R., Wilson J., Welch D., Anurathapan U., Liang B., et al. Optimizing the production of suspension cells using the G-Rex “M” series. *Mol Ther Methods Clin Dev* 2014; 1: 14015.
 19. Gagliardi C., Khalil M., Foster A.E. Streamlined production of genetically modified T cells with activation, transduction and expansion in closed-system G-Rex bioreactors. *Cytotherapy* 2019; 21 (12): 1246–57.
 20. Song H.W., Somerville R.P., Stroncek D.F., Highfill S.L. Scaling up and scaling out: Advances and challenges in manufacturing engineered T cell therapies. *Int Rev Immunol* 2022; 41 (6): 638–48.
 21. Malakhova E., Pershin D., Kulakovskaya E., Vedmedskaia V., Fadeeva M., Lodoeva O., et al. Extended characterization of anti-CD19 CAR T cell products manufactured at the point of care using the CliniMACS Prodigy System: comparison of donor sources and process duration. *Cytotherapy* 2024; S1465324924000677.
 22. Sahin I., Erturk A., De Souza A., Pamarthi S., Tavora F., Giles F.J., et al. Glycogen synthase kinase-3 beta inhibitors as novel cancer treatments and modulators of antitumor immune responses. *Cancer Biol Ther* 2019; 20 (8): 1047–56.
 23. Sommermeyer D., Hudecek M., Kosasih P.L., Gogishvili T., Maloney D.G., Turtle C.J., et al. Chimeric antigen receptor-modified T cells derived from defined CD8⁺ and CD4⁺ subsets confer superior antitumor reactivity *in vivo*. *Leukemia* 2016; 30 (2): 492–500.
 24. Castella M., Caballero-Baños M., Ortiz-Maldonado V., González-Navarro E.A., Suñé G., Antóna-Vidósola A., et al. Point-Of-Care CAR T-Cell Production (ARI-0001) Using a Closed Semi-automatic Bioreactor: Experience From an Academic Phase I Clinical Trial. *Front Immunol* 2020; 11: 482.
 25. Kawalekar O.U., O'Connor R.S., Fraietta J.A., Guo L., McGettigan S.E., Posey A.D., et al. Distinct Signaling of Coreceptors Regulates Specific Metabolism Pathways and Impacts Memory Development in CAR T Cells. *Immunity* 2016; 44 (2): 380–90.
 26. Josefsson S.E., Beiske K., Blaker Y.N., Førsund M.S., Holte H., Østenstad B., et al. TIGIT and PD-1 Mark Intratumoral T Cells with Reduced Effector Function in B-cell Non-Hodgkin Lymphoma. *Cancer Immunol Res* 2019; 7 (3): 355–62.
 27. Jackson Z., Hong C., Schaurer R., Dropulic B., Caimi P.F., de Lima M., et al. Sequential Single-Cell Transcriptional and Protein Marker Profiling Reveals TIGIT as a Marker of CD19 CAR-T Cell Dysfunction in Patients with Non-Hodgkin Lymphoma. *Cancer Discov* 2022; 12 (8): 1886–903.

© 2024 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ
им. Дмитрия Рогачева»
Минздрава России
Поступила 29.03.2024
Принята к печати 08.05.2024



EDN: KOBSLM

Контактная информация:

Обыденный Сергей Иванович,
научный сотрудник лаборатории клеточного
гемостаза и тромбоза ФГБУ «НМИЦ ДГОИ
им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России
Адрес: 117997, Москва,
ул. Саморы Машела, 1
E-mail: obydenyj@physics.msu.ru

DOI: 10.24287/1726-1708-2024-23-2-140-144

Анализ морфометрических характеристик тромбоцитов методом электронной просвечивающей микроскопии

А.А. Кузнецова¹, И.И. Киреев², С.И. Обыденный^{1,3}

¹ФГБУН «Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии» РАН, Москва

²ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», Москва

³ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, Москва

Тромбоциты – вторые по распространенности клетки крови человека. Они выполняют важную функцию – формирование тромбов в местах повреждения сосудов для остановки кровотечений. Патологии строения тромбоцитов способны приводить к различным дисфункциям и угрожающим жизни ситуациям. При некоторых наследственных тромбоцитопатиях могут требоваться морфологические исследования тромбоцитов с применением электронной просвечивающей микроскопии. Эти исследования сложны технически, и их применение ограничено из-за высокой стоимости оборудования и необходимости привлечения обученного персонала. В данной работе с помощью электронной просвечивающей микроскопии мы выполнили анализ морфометрических показателей тромбоцитов, полученных от 20 здоровых доноров. Исследование одобрено независимым этическим комитетом и утверждено решением ученого совета НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева.

Ключевые слова: морфология тромбоцитов, патологии строения тромбоцитов, электронная микроскопия, дефицит пула хранения тромбоцитов

Обыденный С.И. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2024; 23 (2): 140–4. DOI: 10.24287/1726-1708-2024-23-2-140-144

A morphometric analysis of platelets using transmission electron microscopy

A.A. Kuznetsova¹, I.I. Kireev², S.I. Obydenyi^{1,3}

¹Center for Theoretical Problems of Physicochemical Pharmacology, RAS, Moscow

²Lomonosov Moscow State University, Moscow

³Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow

Platelets are the second most abundant human blood cells. They have an important function to form blood clots at sites of vascular injury to prevent bleeding. Abnormalities of platelet structure can lead to various dysfunctions and life-threatening situations. In some hereditary platelet disorders, morphological examination of platelets with transmission electron microscopy (TEM) may be required. TEM is technically complex, and its use is limited due to the need for expensive equipment and trained personnel. In our study, we assessed the morphometric parameters of platelets obtained from 20 healthy donors using TEM. The study was approved by the Independent Ethics Committee and the Scientific Council of the Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology.

Key words: platelet morphology, abnormalities of platelet structure, electron microscopy, platelet storage pool deficiency

Obydenyi S.I., et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology 2024; 23 (2): 140–4.

DOI: 10.24287/1726-1708-2024-23-2-140-144

Система гемостаза человека необходима для поддержания крови в жидком состоянии, остановки кровотечений, а также разрушения тромбов, которые уже выполнили свою функцию. Систему гемостаза образуют 2 звена – плазменное и тромбоцитарное. Тромбоцитарное звено составляют тромбоциты – циркулирующие в неактивном состоянии небольшие форменные элементы крови, под действием активатора приобретающие способность к адгезии и агрегации для последующего формирования тромба. Важными органеллами тромбоцитов являются альфа-гранулы, содержимое которых при активации секретируется во внеклеточное пространство, способствует свертыванию (образованию тромба) и стимулирует дальнейшую активацию тромбоцитов [1].

Отдельную группу наследственных и приобретенных заболеваний образуют болезни, связанные с нарушением морфологических особенностей тромбоцитов.

Одним из подобных заболеваний является синдром серых тромбоцитов, сопровождаемый кровотечениями и тромбоцитопенией, связанный с недостатком альфа-гранул в тромбоцитах и дефицитом белкового наполнения в них, а также с увеличенным размером тромбоцита. При синдроме Пари–Труссо у пациентов также наблюдаются тромбоцитопения, значительное увеличение размера альфа-гранул и нарушения в агрегации тромбоцитов [2–4].

Использование электронной микроскопии – эталон для исследования тромбоцитарных гранул в клинической диагностике [4]. Альтернативные методы анализа гранул, такие как CD62P в проточной цитометрии или использование флуоресцентной микроскопии, не позволяют получить полную информацию о наполнении гранул, а с помощью электронной микроскопии это можно сделать более подробно.

Главными причинами, определяющими сложность метода, являются дороговизна оборудования и трудоемкость процедур пробоподготовки [3, 4]. Совокупность этих факторов приводит к тому, что сейчас в России нет разработанной методики с соответствующим набором стандартных значений, позволяющих не только качественно выявлять, но и количественно оценивать отклонения морфометрических показателей тромбоцитов.

Целью данного исследования является разработка метода электронной микроскопии для анализа морфологии тромбоцитов крови.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследовании были задействованы 20 здоровых доноров крови случайного возраста и пола. Исследование одобрено независимым этическим комитетом и утверждено решением ученого совета НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева. Цельная кровь набиралась в вакуумные пробирки 3 мл с 3,2% цитратом натрия, затем она отстаивалась в вертикальном штативе в течение 60 мин при 37°C для осаждения эритроцитов и образования слоя богатой тромбоцитами плазмы.

Собранная богатая тромбоцитами плазма (0,5 мл) добавлялась к раствору глутарового альдегида (9,5 мл) (Sigma-Aldrich, St. Louis, США) с конечной концентрацией 1,25% в натрий-фосфатном буфере (Sigma-Aldrich, St. Louis, США), фиксация проходила в течение 1 ч. После чего проводилось центрифугирование в течение 5 мин при 1000g для осаждения тромбоцитов с последующим удалением плазмы. Затем тромбоциты фиксировались в 1% водном растворе тетраоксида осмия (SPI-Chem, West Chester, PA, США) в течение 1 ч. Далее следовала процедура дегидратации образца в ацетоне (Panreac, Испания), образец последовательно выдерживался по 10 мин в растворах с концентрацией ацетона 30, 50, 70 и 90%. Завершалась дегидратация в 100% ацетоне 3 раза, после чего образец пропитывался смолой Epon 812 (Sigma-Aldrich, St. Louis, США) с ацетоном в соотношениях 1:2 и 2:1 по 30 мин. Затем образец пропитывался смолой без добавок на ночь при 37°C, далее смола заменялась и образец выдерживался для полимеризации не менее 36 ч при 60°C [5, 6].

После полимеризации блоки нарезались на ультрамикротоме (Leica EM UC7). Толщина срезов составляла порядка 100 нм. Срезы помещались на медные сеточки, покрытые пленкой из 0,5% раствора формвара (SPI-Chem, West Chester, PA, США) в 1,2-дихлорэтаноле (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, США). Контрастирование срезов производилось 2% водным раствором ацетата уранила (SPI-Chem, West Chester, PA, США) 30 мин и 3 мин цитратом свинца (Sigma-Aldrich, St. Louis, США) [7]. Для просмотра образца использовался просвечивающий электронный микроскоп JEM-1011 JEOL.

Измерение морфометрических характеристик проводилось в программе ImageJ.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Подбор морфометрических показателей тромбоцитов

Первой задачей исследования было подобрать условия для воспроизводимого получения образцов неактивированных тромбоцитов. Морфология тромбоцитов оказалась очень чувствительна к методике выделения и фиксации клеток. Было установлено, что наилучшее сохранение формы тромбоцитов достигается при фиксации богатой тромбоцитами плазмы, полученной путем оседания эритроцитов в вертикально стоящей пробирке при 37°C за 60 мин. Попытки сконцентрировать живые тромбоциты путем их центрифугирования и осаждения на стенке пробирки часто приводили к серьезным нарушениям формы. Далее были подобраны оптимальные условия заключения образца в смолу, нарезки и контрастирования солями тяжелых металлов.

Были выбраны морфометрические параметры для количественной оценки тромбоцитов:

- 1) площадь тромбоцита в срезе;
- 2) периметр тромбоцита;
- 3) больший диаметр тромбоцита (D_{max});
- 4) меньший диаметр тромбоцита (D_{min});
- 5) D_{max}/D_{min} ;
- 6) количество альфа-гранул в тромбоците;
- 7) диаметр альфа-гранул;
- 8) количество альфа-гранул на единицу площади тромбоцита.

На *рисунке 1* показан пример определения альфа-гранул, митохондрий, D_{max} и D_{min} . При идентификации митохондрий и альфа-гранул могут быть сложности, так как эти органеллы очень схожи по размерам. Их отличия заключаются в том, что у митохондрий есть кристы, а у гранул внутреннее содержимое более однородно. Способом упростить определение является подбор условий толщины нарезки и времени контрастирования ультратонких срезов. Было установлено, что при толщине срезов 120 нм митохондрии легче отличить от гранул, чем при толщине срезов 100 нм.

Активация тромбоцитов влияет на их морфологию, у тромбоцитов появляются ложноножки, происходит расширение открытой канальцевой системы (ОКС), нарушаются дискообразная форма, централизация гранул. На *рисунке 2* показано сравнение состояний ОКС.

Для качественной оценки степени активации тромбоцитов рассматривались 2 критерия:

- 1) степень расширения ОКС тромбоцита: 0 – закрыта; 1 – каналы расширены;

2) наличие ложноножек: 0 – отсутствуют; 1 – присутствуют.

Морфометрические характеристики тромбоцитов здоровых доноров

Далее нами были измерены морфометрические характеристики тромбоцитов 20 здоровых доноров (рисунк 3). Каждая точка на графике соответствует усредненному значению для 50–100 тромбоцитов от отдельного донора. Полученные усредненные значения визуализированы в виде «ящика с усами». Средние значения и стандартные отклонения приведены в таблице.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Тромбоциты – сложные для экспериментальной работы клетки, так как имеют свойство активироваться от многих факторов, в том числе от механического и температурного воздействия. Важной частью данной работы было получение тромбоцитов с минимально возможными изменениями формы

и строения. Поэтому было отдано предпочтение фиксации богатой тромбоцитами плазмы, полученной с помощью отстаивания пробирки без каких-либо дополнительных манипуляций, которые часто приводят к подактизации тромбоцитов и, как следствие, к изменению их морфометрических характеристик. Полученные морфометрические значения хорошо соотносятся с опубликованными данными других авторов [8].

На основе данных о доле тромбоцитов с расширенной ОКС и наличием ложноножек при дальнейшем увеличении статистики будет выбран порог, при превышении которого потребуется проведение повторного исследования во избежание ошибок.

К другим сложностям описанной методики можно отнести различие митохондрий и альфа-гранул. В нашем исследовании мы оптимизировали методику подготовки образцов и получение изображений путем подбора толщины срезов и длительности контрастирования для улучшения качества дифференцировки. Собственно, различие митохондрий и альфа-гранул проводилось оператором визуально. Приме-

Рисунок 1

Фотографии тромбоцитов в разных сечениях

Пример измерения морфометрических параметров: А – определение альфа-гранул: α – альфа-гранулы, m – митохондрии; Б – измерение D_{max} и D_{min} . Масштабный отрезок 1 мкм, электронная просвечивающая микроскопия

Figure 1

Microscope images of platelets in different sections

An example of assessing the morphometric parameters of platelets: A – identification of alpha granules: α – alpha granules, m – mitochondria; B – measurement of the maximum (D_{max}) and minimum (D_{min}) diameters. Scale bar: 1 μm , transmission electron microscopy

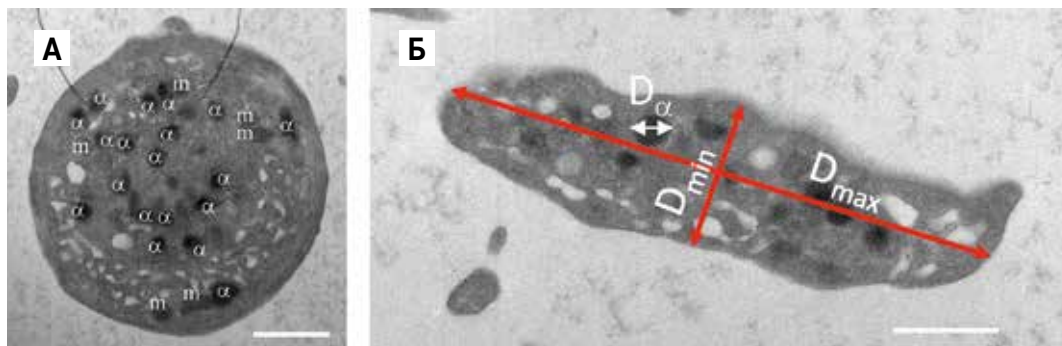


Рисунок 2

Иллюстрация нерасширенной (А) и расширенной (Б) ОКС

Тромбоцит с ложноножками (Б). Масштабный отрезок 1 мкм, электронная просвечивающая микроскопия

Figure 2

Images showing a non-dilated open canalicular system (OCS) (A) and a dilated OCS (B)

A platelet with pseudopods (B). Scale bar: 1 μm , transmission electron microscopy

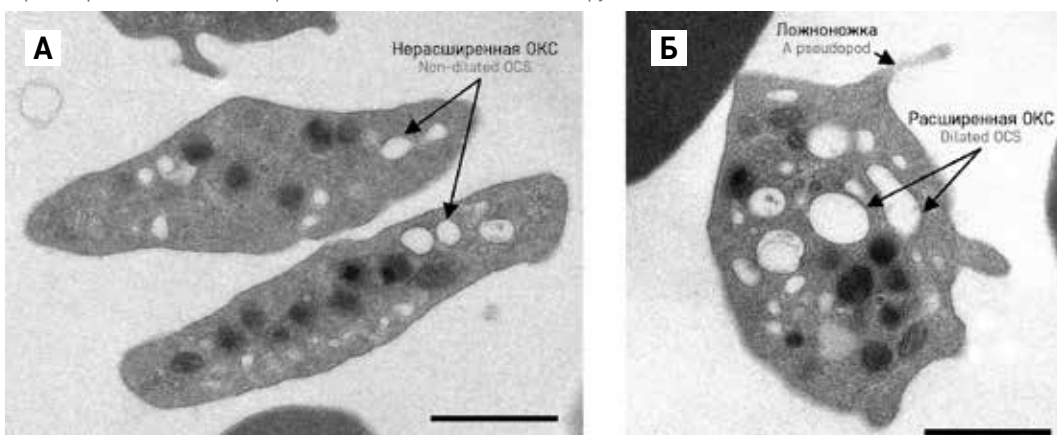


Рисунок 3

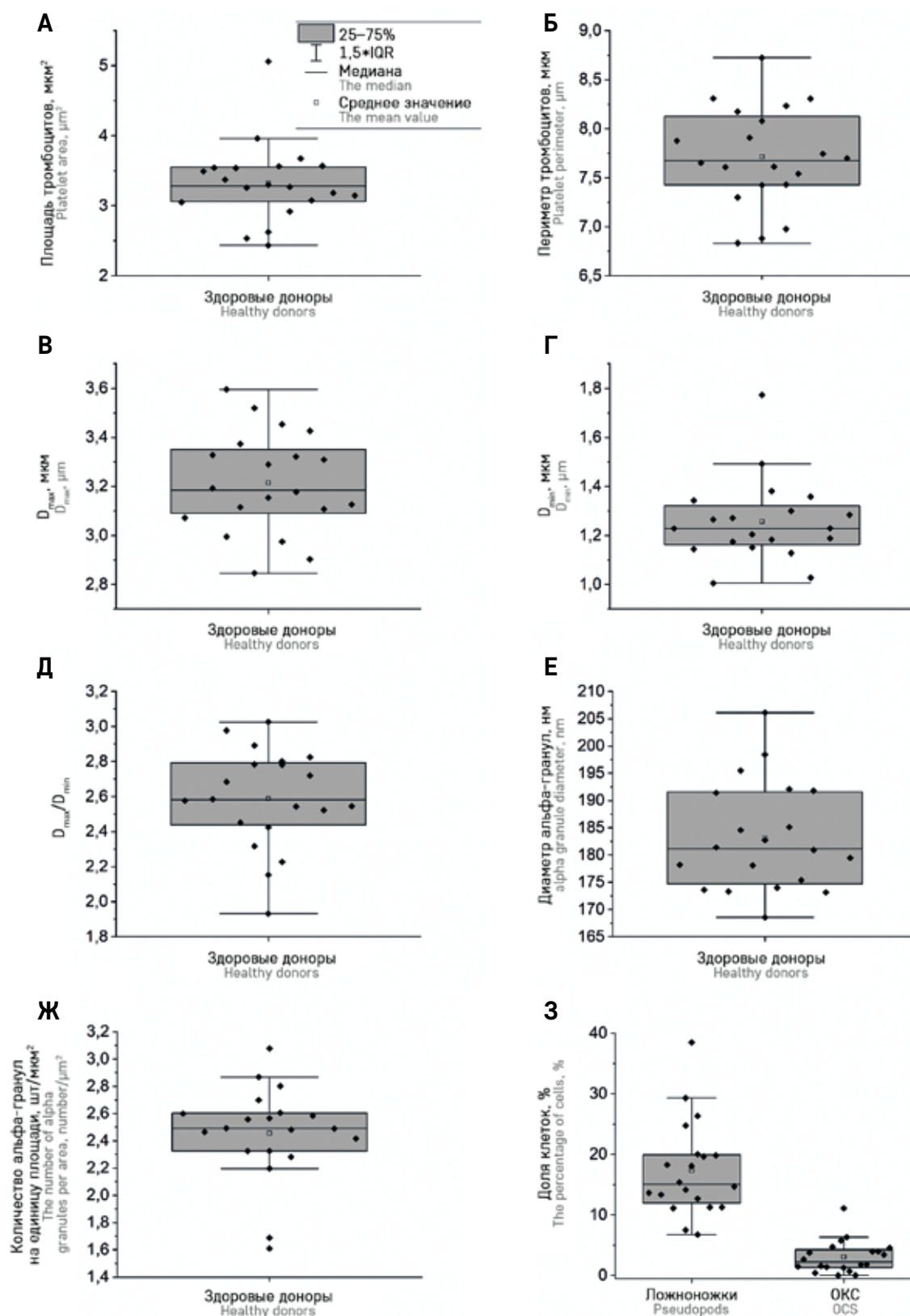
Морфометрические характеристики тромбоцитов 20 здоровых доноров

Каждая точка является средним значением 50–100 тромбоцитов 1 донора. Данные представлены в виде «ящиков с усами», «усы» характеризуют диапазон $1,5 \cdot \text{IQR}$ (межквартильный размах). А – площадь тромбоцитов; Б – периметр тромбоцитов; В – D_{max} ; Г – D_{min} ; Д – $D_{\text{max}}/D_{\text{min}}$; Е – диаметр альфа-гранул тромбоцитов; Ж – отношение количества альфа-гранул к площади тромбоцита; З – оценка доли тромбоцитов с образованными ложноножками и расширенной ОКС

Figure 3

The morphometric parameters of platelets obtained from 20 healthy donors

Each point represents a mean value of 50–100 platelets from 1 donor. The data are expressed as the box-and-whisker plots; the whiskers showing the range of the data extend to $1,5 \cdot \text{IQR}$ (interquartile range). А – platelet area; Б – platelet perimeter; В – D_{max} ; Г – D_{min} ; Д – $D_{\text{max}}/D_{\text{min}}$; Е – alpha granule diameter; Ж – the number of alpha granules per platelet area; З – the percentage of platelets with pseudopods and dilated OCS



Таблица

Морфометрические характеристики тромбоцитов 20 здоровых доноров

Tables

The size and morphology of platelets from 20 healthy donors

Морфометрический параметр Morphometric parameter	Среднее значение Mean value	Стандартное отклонение Standard deviation
Площадь тромбоцитов, мкм ² Platelet area, μm^2	3,6	0,6
Периметр тромбоцитов, мкм Platelet perimeter, μm	7,7	0,5
D_{max} , мкм D_{max} , μm	3,2	0,2
D_{min} , мкм D_{min} , μm	1,3	0,2
$D_{\text{max}}/D_{\text{min}}$	2,6	0,3
Диаметр альфа-гранул, нм Diameter of alpha granules, nm	183	10
Количество альфа-гранул на единицу площади, шт/мкм ² The number of alpha granules per area, number/ μm^2	2,5	0,3

нение нейросетей для морфометрии тромбоцитов позволило бы в будущем автоматизировать этот тест.

Метод трансмиссионной электронной микроскопии позволяет получать информацию, прежде всего, об аномалиях строения тромбоцитов [9], состояния и количества гранул [4]. Стоит отметить, что разработанная методика оценивает только пул альфа-гранул и не может оценить количество плотных гранул из-за их значительно меньшей встречаемости в тромбоците и малой толщины срезов. Одним из вариантов расширения исследования на другие морфометрические показатели может стать изучение плотных гранул. Методика их оценки кардинально отличается от приведенной выше. Тромбоциты без фиксации помещаются под электронный микроскоп. Из-за отсутствия фиксации плотные гранулы быстро деградируют (в течение 1–2 сут) и могут изучаться только при наличии быстрого доступа на электронный микроскоп, что является существенным ограничением.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, нами был осуществлен выбор морфологических параметров для количественной оценки тромбоцитов и сформирован набор здоровых доноров с получением достоверных интервалов измененных показателей. Для продолжения данной работы планируется пополнение выборки здоровых доноров (в норме), исследование пациентов с нарушениями строения тромбоцитов, формирование соответствующей выборки показателей (в патологии), объединенных единой методикой пробоподготовки, и сравнение их между собой. Это важно как для получения новых научных данных, так и для улучшения качества диагностики редких наследственных заболеваний, связанных с патологиями морфологии тромбоцитов.

При большем количестве наблюдений имеется тенденция к расщеплению выборок по показателям: площадь тромбоцитов, отношение количества гранул к площади тромбоцита.

БЛАГОДАРНОСТЬ

Авторы выражают благодарность Программе развития МГУ (ПНР 5.13), ЦКП «Субдифракционная микроскопия и спектроскопия» НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского и фонду «Наука – детям» за предоставление доступа к оборудованию.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов Российского научного фонда №21-75-00109 и №23-75-10120 (руководитель С.И. Обыденный).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

ORCID

Kuznetsova A.A. ORCID: <https://orcid.org/0009-0003-7209-945X>

Kireev I.I. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9252-6808>

Obyedennyi S.I. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2930-8768>

Литература / References

- van der Meijden P.E., Heemskerk J.W. Platelet biology and functions: new concepts and clinical perspectives. *Nat Rev Cardiol* 2019; 16 (3):166–79.
- Дёмина И.А., Кумскова М.А., Пантелеев М.А. Тромбоцитопатии. Российский журнал детской гематологии и онкологии 2015; (1): 54–60. DOI: 10.17650/2311-1267-2015-1-54-60 [Demina I.A., Kumsikova M.A., Panteleev M.A. Thrombocytopathy. *Russian Journal of Pediatric Hematology and Oncology* 2015; 2 (1): 54–60. (In Russ.)].
- Обыденный С.И., Киреев И.И., Пантелеев М.А. Вклад электронной микроскопии в исследование нарушений морфологии тромбоцитов. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2022; 21 (3): 142–6. DOI: 10.24287/1726-1708-2022-21-3-142-146 [Obyedennyi S.I., Kireev I.I., Panteleev M.A. The electron microscopy contribution to platelet structural pathology investigation. *Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology* 2022; 21 (3): 142–6. (In Russ.)].
- Фёдорова Д.В., Жарков П.А., Плясунова С.А., Серёгина Е.А., Игнатова А.А. Диагностика врожденных нарушений функций тромбоцитов: современное состояние вопроса. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2017; 16 (1): 83–95. DOI: 10.24287/1726-1708-2017-16-1-83-95 [Fedorova D.V., Zharkov P.A., Plyasunova S.A., Seregina E.A., Ignatova A.A. Modern approach to diagnosis of inherited functional platelet disorders. *Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology* 2017; 16 (1): 83–95. (In Russ.)].
- Luft J.H. Improvements in epoxy resin embedding methods. *J Biophys Biochem Cytol* 1961; 9 (2): 409.
- Обыденный С.И. Динамика и механизмы образования прокоагулянтной субпопуляции тромбоцитов: Дис. ... канд. биол. наук. М., 2019. 105 с. [Obyedennyi S.I. Dynamics and the mechanisms of formation of procoagulant platelet subpopulation: Thesis ... Cand. Bio. Sci. M., 2019. 105 p. (In Russ.)].
- Reynolds E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol* 1963; 17 (1): 208.
- Stahl K., Themann H., Dame W. R. Ultrastructural morphometric investigations on normal human platelets. *Haemostasis* 1978; 7 (4): 242–51.
- White J.G. Ultrastructural defects in congenital disorders of platelet function. *Ann N Y Acad Sci* 1972; 201 (1): 205–33.

DOI: 10.24287/1726-1708-2024-23-2-145-151

Метод фильтруемости эритроцитов в диагностике наследственного сфероцитоза

Д.С. Прудинник^{1,2}, Л.Д. Колева^{1,2}, Е.А. Бовт^{1,2}, Н.С. Кушнир^{1,2}, А.С. Суворова¹, И.А. Долгих¹, С.С. Шахиджанов^{1,2}, В.М. Витвицкий², Ф.И. Атауллаханов², Е.И. Синауридзе^{1,2}, С.А. Плясунова¹, Н.С. Сметанина¹

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, Москва

²ФГБУН «Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии» РАН, Москва

Дифференциальная диагностика наследственного сфероцитоза является сложной задачей из-за схожести клинических и лабораторных проявлений у пациентов с данным заболеванием и другими формами наследственных гемолитических анемий, а также из-за малой доступности молекулярно-генетических исследований. Разработка легко выполнимых лабораторных исследований для дифференциальной диагностики наследственных гемолитических анемий остается актуальной. В настоящей работе впервые предложено использовать для диагностики наследственного сфероцитоза метод измерения фильтруемости эритроцитов. Цель исследования: сравнить метод фильтруемости эритроцитов с другими методами диагностики наследственного сфероцитоза и оценить его специфичность и чувствительность. В исследование включены 30 пациентов (18 девочек и 12 мальчиков, средний возраст 8,6 года) с наследственным сфероцитозом и 15 пациентов (9 девочек и 6 мальчиков, средний возраст 10 лет) с другими наследственными гемолитическими анемиями (дефицит пируваткиназы ($n = 14$) и стоматоцитоз ($n = 1$)). Для диагностики наследственной гемолитической анемии пациентам выполнялись исследование общего анализа крови на автоматическом гематологическом анализаторе, осмотической резистентности до и после 24 ч инкубации при 37°C, эритроцитометрия с расчетом индекса сферичности, ЭМА-тест (связывание эозин-5-малеимида) и измерение фильтруемости эритроцитов через искусственные фильтры с цилиндрическими порами диаметром 3–5 мкм. Настоящее исследование одобрено независимым этическим комитетом и утверждено решением ученого совета НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева. Родители всех пациентов, включенных в исследование, подписали добровольное информированное согласие на забор крови из периферической вены и проведение диагностических исследований. Фильтруемость эритроцитов для всех случаев диагностированного в соответствии с действующими клиническими рекомендациями наследственного сфероцитоза очень низкая (0–0,31 ед.). Она была выше только в 3 случаях и составила 0,47, 0,64 и 0,82 ед., но в 2 из них отсутствовали данные генетики, а еще в 1 случае была обнаружена мутация *SPTA1* с.4339>T, которая ранее была охарактеризована не только как наследственный сфероцитоз, но и как эллиптоцитоз. Фильтруемость эритроцитов в группе других гемолитических анемий составила от 0,55 до 0,86 ед. (медиана 0,77 ед.). Чувствительность метода фильтруемости по отношению к наследственному сфероцитозу составила 93% (при специфичности 100%), тогда как для ЭМА-теста – 89% (при специфичности 95%). Проведенные сравнительные исследования показали, что при диагностике наследственного сфероцитоза измерение фильтруемости эритроцитов не уступает ЭМА-тесту по чувствительности и специфичности, однако это исследование гораздо менее трудоемко и затратно, поскольку не требует дорогого оборудования и может быть легко проведено в любой лаборатории.

Ключевые слова: эритроцит, гемолитическая анемия, наследственный сфероцитоз, фильтруемость эритроцитов, дефицит пируваткиназы, осмотическая резистентность эритроцитов, ЭМА-тест, индекс сферичности

Прудинник Д.С. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2024; 23 (2): 145–51. DOI: 10.24287/1726-1708-2024-23-2-145-151

Red blood cell filterability measurement in the diagnosis of hereditary spherocytosis

D.S. Prudinnik^{1,2}, L.D. Koleva^{1,2}, E.A. Bovt^{1,2}, N.S. Kushnir^{1,2}, A.S. Suvorova¹, I.A. Dolgikh¹, S.S. Shakhidjanov^{1,2}, V.M. Vitvitsky², F.I. Ataulakhonov², E.I. Sinauridze^{1,2}, S.A. Plyasunova¹, N.S. Smetanina¹

¹The Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology of Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow

²Center for Theoretical Problems of Physico-Chemical Pharmacology of the Russian Academy of Sciences, Moscow

The differential diagnosis of hereditary spherocytosis is a great challenge because of the similar clinical and laboratory signs it shares with other hereditary hemolytic anemias as well as due to the limited availability of molecular genetic testing. The development of easy-to-perform laboratory tests for the differential diagnosis of hereditary hemolytic anemias remains as relevant as ever. Here, a method of measuring red blood cell filterability for the diagnosis of hereditary spherocytosis is proposed for the first time. The aim of our study was to compare red blood cell filterability measurement with other diagnostic tests for hereditary spherocytosis as well as to assess its specificity and sensitivity. We included 30 patients (18 girls and 12 boys, with the median age of 8.6 years) with hereditary spherocytosis and 15 patients (9 girls and 6 boys, with the median age of 10 years) with other hereditary hemolytic anemias (pyruvate kinase deficiency ($n = 14$) and stomatocytosis ($n = 1$)). The diagnostic work-up for hereditary hemolytic anemia included a complete blood count test using an automated hematology analyzer, an osmotic resistance analysis before and after 24 hours of incubation at 37°C, erythrocytometry with sphericity index calculation, EMA test (eosin-5-maleimide binding assay) and red blood cell filterability measurement using artificial filters with cylindrical pores 3–5 μm in diameter. The study was approved by the Independent Ethics Committee and the Scientific Council of the Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology. The parents of all of the enrolled children signed a voluntary informed consent form for peripheral blood collection and diagnostic

© 2024 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России
Поступила 29.04.2024
Принята к печати 31.05.2024



EDN: NSAJAA

Контактная информация:

Синауридзе Елена Ивановна,
д-р биол. наук, канд. хим. наук, заведующая лабораторией биофизики
ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России; заведующая лабораторией физиологии и биофизики
клетки ФГБУН «Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии» РАН
Адрес: 117997, Москва, ул. Саморы Машела, 1
E-mail: sinaurid@list.ru

© 2024 by «D. Rogachev NMRCPHOI»

Received 29.04.2024
Accepted 31.05.2024

Correspondence:

Elena Sinauridze,
Doctor of Biological Sciences, Candidate of Chemical Sciences, Head of the Laboratory of Biophysics at the Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology of Ministry of Healthcare of the Russian Federation; Head of the Laboratory of Cell Physiology and Biophysics at the Center for Theoretical Problems of Physico-Chemical Pharmacology of the Russian Academy of Sciences
Address: 1 Samory Mashela St., Moscow 117997, Russia
E-mail: sinaurid@list.ru

testing. In all the cases of hereditary spherocytosis diagnosed in accordance with the relevant clinical recommendations, red blood cell filterability was very low (0–0.31 units). It was higher only in 3 instances, reaching 0.47, 0.64 и 0.82 units, but in two of these cases there were no genetic data available, and the remaining patient was found to harbor the *SPTA1* c.4339–99C>T mutation which was characterized both as spherocytosis and elliptocytosis. Red blood cell filterability in the group of the patients with other hemolytic anemias equalled 0.55 to 0.86 units (with the median of 0.77 units). The sensitivity of the RBC filterability measurement method in diagnosing hereditary spherocytosis was 93% (with 100% specificity), while the EMA test had a sensitivity of 89% and specificity of 95%. Our comparative study showed that red blood cell filterability measurement and the EMA test have similar sensitivity and specificity in diagnosing hereditary spherocytosis but the former is much cheaper and easier to perform since it does not require expensive equipment and can be carried out at any laboratory.

Key words: red blood cell, hemolytic anemia, hereditary spherocytosis, red blood cell filterability, pyruvate kinase deficiency, osmotic resistance of red blood cells, EMA test, sphericity index

Prudinnik D.S., et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology 2024; 23 (2): 145–51.
DOI: 10.24287/1726-1708-2024-23-2-145-151

Наследственный сфероцитоз (НС) является наиболее распространенной причиной врожденной гемолитической анемии (ГА). Он диагностируется с частотой 1 на 2000 человек, хотя значительное количество бессимптомных случаев могут оставаться недиагностированными [1]. Причиной анемии при НС является сокращение времени жизни эритроцитов в кровотоке в результате снижения их деформируемости. Обусловленный генетическими мутациями качественный или количественный дефицит мембранных белков приводит к нарушению связи цитоскелета внутренней мембраны эритроцитов с ее внешним липидным бислоем. Это сопровождается прогрессирующей потерей площади мембраны в микроциркуляторном русле (уменьшением отношения площади поверхности клетки к ее объему), что приводит к изменению формы и сокращению продолжительности жизни эритроцитов. Аномалии мембраны сопровождаются снижением способности эритроцита к деформации при прохождении микрокапилляров. Такие эритроциты секвестрируются селезенкой, что приводит к анемии. Молекулярные дефекты, приводящие к НС, очень гетерогенны. Наиболее часто встречаются дефицит белка полосы 3 (54%) и дефициты спектрина (31%) [2].

В настоящее время диагностика НС основывается на положительном семейном анамнезе, клинической картине и результатах лабораторных исследований. Диагноз считается установленным, если у пациента наблюдаются Кумбс-негативная ГА, повышенная средняя концентрация гемоглобина в эритроците и сниженный индекс сферичности по данным эритроцитометрии, сниженная осмотическая резистентность эритроцитов (ОРЭ) до и после инкубации, а также снижение ЭМА-теста (связывание эозин-5-малеимида). Дифференциальная диагностика НС является сложной задачей из-за схожести клинических и лабораторных проявлений у пациентов с данным заболеванием и другими формами наследственных ГА (дефицит пируваткиназы эритроцитов, ГА вследствие нестабильного гемоглобина, дизэритропоэтические анемии, наследственный стоматоцитоз), а также из-за малой доступности молекулярно-генетических исследований [3, 4].

Несмотря на то, что ОРЭ и ЭМА-тест являются основными методами в диагностике НС, они имеют ограничения. ОРЭ не является высокоспецифичным для НС, так как в 10–20% случаев НС могут быть получены ложноотрицательные значения [5]. В работе Y.J. Shim и соавт. [6] чувствительность и специфичность ОРЭ в диагностике НС составили 66% и 81,8% соответственно. Однако было показано, что недавно внедренная ОРЭ с использованием проточной цитометрии (FCMOF) может повысить чувствительность и специфичность до 91,3% и 95,8% соответственно [6]. Исследование ОРЭ также не позволяет дифференцировать НС от других состояний, сопровождающихся появлением сфероцитов в периферической крови, в частности от аутоиммунного гемолиза [7].

В отличие от ОРЭ ЭМА-тест демонстрирует лучшие чувствительность и специфичность. Суть метода состоит в связывании флуоресцентного красителя эозин-5-малеимида (ЭМА) с белком полосы 3. N-концевой участок белка полосы 3 взаимодействует с анкирином и белком полосы 4.2, который, в свою очередь, соединяется со спектринным цитоскелетом, обеспечивая дополнительную стабильность мембране эритроцита. Отсутствие или снижение экспрессии любого из белков мембраны эритроцита приводит к нарушению стабильности цитоскелета клетки и снижению количества белка полосы 3 на поверхности мембраны эритроцита. В результате снижается связывание ЭМА с белком полосы 3 и, соответственно, происходит снижение измеряемой флуоресценции. Представленные M. King и соавт. данные [3, 8] свидетельствуют о высокой чувствительности (92,7%) и специфичности (99,1%) метода, что позволяет авторам рекомендовать его в качестве основного для диагностики НС. Существенными ограничениями этого метода являются необходимость использования проточного цитометра, который имеется не во всех диагностических лабораториях, отсутствие стандартных референсных значений из-за широкого диапазона шкал флуоресценции на разных моделях проточных цитометров, дороговизна используемого красителя ЭМА.

Таким образом, разработка легковыполнимых лабораторных исследований для дифференциальной диагностики наследственных ГА остается актуальной.

В настоящей работе впервые предложено использовать для диагностики НС метод измерения фильтруемости эритроцитов.

Цель настоящего исследования – сравнение метода фильтруемости эритроцитов с другими методами диагностики НС и оценка его специфичности и чувствительности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Пациенты

В работе была использована периферическая кровь пациентов, обратившихся в ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России в период с 2017 г. по май 2024 г. с установленным согласно действующим клиническим рекомендациям диагнозом НС ($n = 30$, 18 девочек, 12 мальчиков, средний возраст 8,6 (0,5–17) года, у 10 человек диагноз подтвержден молекулярно-генетически), и пациентов с другими ГА ($n = 15$, дефицит пируваткиназы ($n = 14$) и стоматоцитоз ($n = 1$), 9 девочек и 6 мальчиков, средний возраст 10 (1–30) лет, диагноз генетически верифицирован у всех кроме одного пациента с дефицитом пируваткиназы). Настоящее исследование одобрено независимым этическим комитетом и утверждено решением ученого совета НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева. Родители всех пациентов, включенных в исследование, подписали добровольное информированное согласие на забор крови из периферической вены и проведение диагностических исследований.

Измеряемые параметры

Всем пациентам были проведены измерение фильтруемости эритроцитов и стандартные исследования для диагностики наследственных ГА: общий клинический анализ крови с подсчетом эритроцитарных индексов, числа ретикулоцитов и нормобластов, ОРЭ, ЭМА-тест, эритроцитометрия с подсчетом индекса сферичности. Исследования выполнялись в клинко-диагностической лаборатории Центра им. Дмитрия Рогачева по общепринятой методике. Наличие дефицита пируваткиназы подтверждено снижением активности пируваткиназы эритроцитов и выявлением мутаций/делеций гена *PKLR*.

Измерение фильтруемости эритроцитов

Забор крови и пробоподготовка

Кровь у пациентов с НС забирали в вакуумную пробирку объемом 3 мл (S-monovette, Sarstedt, Германия) с 3,2% (0,106 М) цитратом натрия. У пациентов с дефицитом пируваткиназы и другими ГА кровь забирали в вакуумную пробирку объемом 2,6 мл (S-monovette, Sarstedt, Германия) с K_2 EDTA в качестве антикоагулянта. Для выделения эритроцитов

кровь была центрифугирована при 1000g в течение 8 мин. Верхний слой плазмы вместе с лейкотромбослоем был удален, и эритроциты далее отмылись центрифугированием при 1000g в течение 8 мин дважды 4-кратным объемом раствора Тироде (135 мМ NaCl, 4 мМ KCl, 0,33 мМ NaH_2PO_4 , 1 мМ $MgCl_2$, 11 мМ глюкозы, 2,5 мМ $CaCl_2$, 10 мМ HEPES и 1 мг/мл бычьего сывороточного альбумина, pH 7,4). Отмытые эритроциты были последовательно ресуспендированы в том же растворе до гематокрита 1% и использованы для измерения фильтруемости.

Определение фильтруемости эритроцитов

Определение фильтруемости эритроцитов проводили в соответствии с ранее описанной методикой [9] с помощью запатентованного нами ранее фильтрометра ИДА-1 [10, 11] (рисунк 1). С помощью ИДА-1 измеряли время прохождения через один и тот же фильтр сначала 250 мкл буфера (tb), а затем 250 мкл 1% суспензии исследуемых эритроцитов (ts). Фильтруемость (F) была определена как отношение этих времен ($F = tb/ts$). В качестве фильтров была использована полиэтилентерфталатная пленка (Институт ядерных исследований, Дубна, Московская область, Россия) толщиной 10 мкм с цилиндрическими порами диаметром 3,5 мкм.

Статистический анализ данных

Сравнение между группами пациентов с НС и другими ГА для всех тестов было сделано с помощью U-критерия Манна–Уитни. Рассчитанные величины p приведены на рисунке 2. Различия между группами

Рисунок 1
Общий вид фильтрометра ИДА-1

Figure 1
An IDA-1 filterometer



считали достоверными при $p < 0,05$. Всю статистическую обработку проводили в программе OriginPro 8.1 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время в России диагностика НС основывается на использовании нескольких лабораторных методов: ЭМА-тест, ОРЭ (с и без дополнительной инкубации суспензии эритроцитов в течение

24 ч при 37°C), эритроцитометрия с расчетом индекса сферичности [2, 5].

Результаты измерения фильтруемости эритроцитов, ЭМА-теста, ОРЭ (H_{50} после 24 ч инкубации при 37°C), а также значения индекса сферичности, полученные у пациентов с НС и при других ГА представлены на рисунке 2. Рассчитанные медианы и области (полутонный межквартильный интервал) значений каждого теста в обеих группах представлены в таблице 1. Очевидно, что все лабораторные методы достоверно различают 2 исследованные

Рисунок 2

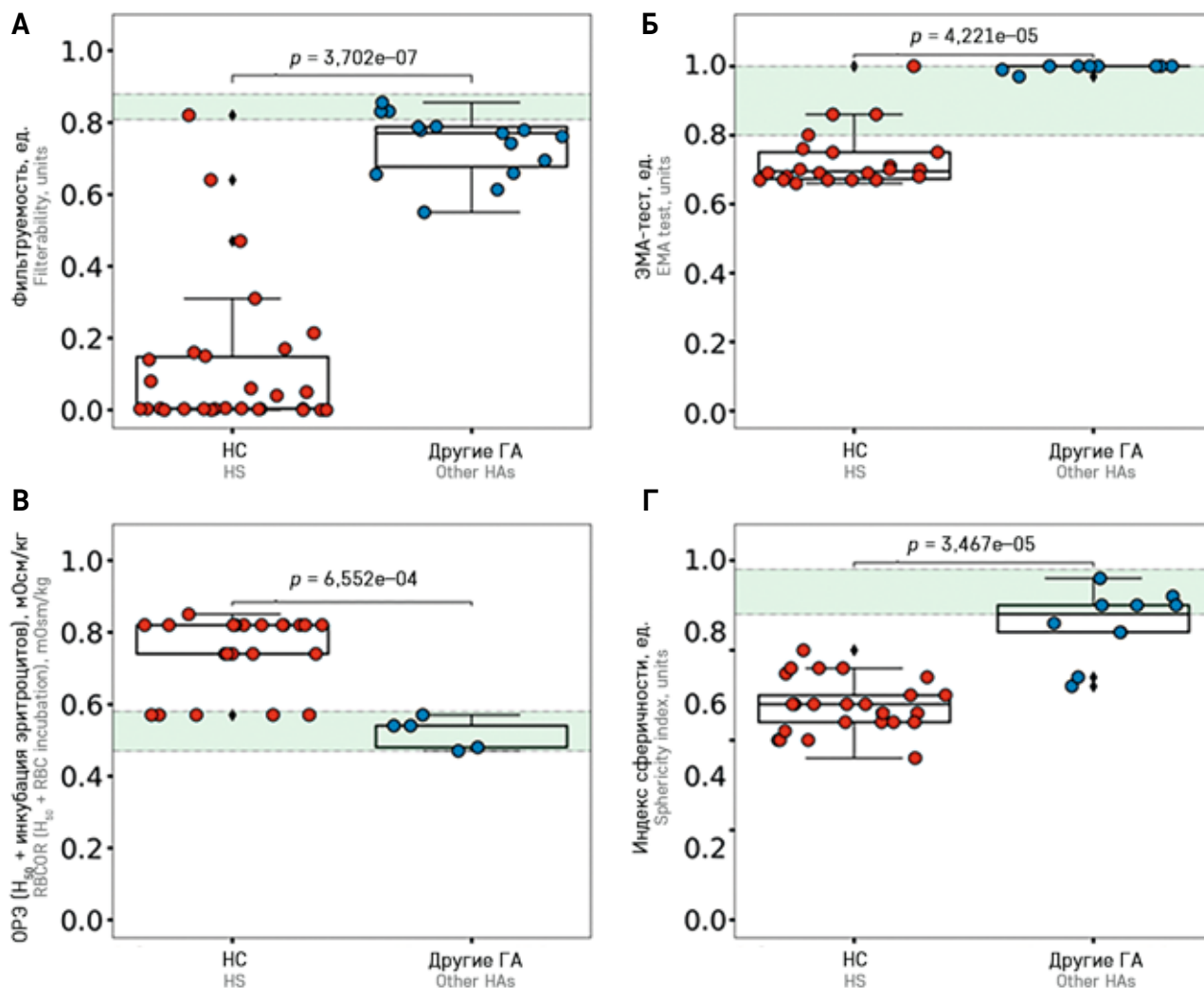
Распределение величин фильтруемости (А), ЭМА-теста (Б), ОРЭ (величина осмоляльности, при которой лизировано 50% клеток (H_{50}) после 24 ч инкубации эритроцитов при 37°C) (В) и индекса сферичности (Г) в группах пациентов с НС и другими ГА

Размер боксов соответствует области от 25-го до 75-го перцентиля всех измеренных величин. Медианы показаны горизонтальными линиями, длина «усов» соответствует полутонному размеру межквартильной области. Черные ромбики отмечают точки, выходящие за 1,5 межквартильных интервала, однако, имея дело с популяцией пациентов, мы не можем отбрасывать эти точки, так как они являются не ошибками измерения, а характеризуют индивидуальные различия пациентов. Достоверность различий между группами для всех тестов определена U-критерием Манна-Уитни. Закрашенные области соответствуют области нормальных значений для каждого теста. Различия считали достоверными при $p < 0,05$

Figure 2

The distribution of the results of filterability measurement (A), EMA test (Б), red blood cell osmotic resistance analysis (RBCOR) (osmolality at which 50% of cells lyse (H_{50}) after 24 hours of incubation at 37°C) (В) and sphericity index calculation (Г) in the groups of the patients with hereditary spherocytosis (HS) and other hemolytic anemias (HA)

The boxes extend from the 25th to the 75th percentile of all the measured values, with the horizontal lines indicating the medians, and the length of each whisker equal to 1.5 times the interquartile range (IQR). The black diamonds indicate data points outside the 1.5 IQR. However, since we study a population of patients we cannot disregard these data points because they are not miscalculations but rather a representation of individual differences among the patients. In all the tests, the significance of differences between the patient groups was determined using the Mann-Whitney U test. The filled-in areas indicate normal ranges for all the tests. The differences were considered significant at $p < 0.05$



группы, однако достоверность различий между группами самая высокая при исследовании фильтруемости эритроцитов (величина $p = 3,702 \times 10^{-7}$). Эта величина выше, чем для ЭМА-теста ($p = 4,221 \times 10^{-5}$).

Обращает на себя внимание тот факт, что большая часть пациентов с НС имели очень низкую фильтруемость (в области 0–0,31 ед.), но существуют также несколько пациентов, у которых фильтруемость была выше (0,47; 0,64 и 0,82 ед.). Этим пациентам диагноз НС был поставлен в соответствии с клиническими рекомендациями.

Таблица 1
Средние значения всех тестов в обеих группах пациентов*

Параметр Parameter	НС HS	Другие ГА Other HAs	Нормальные значения Normal range
ЭМА-тест, ед. EMA test, units	0,695 (0,556; 0,866)	1 (1; 1)	0,8–1,0
Фильтруемость, ед. Filterability, units	0,004 (–0,214; 0,364)	0,770 (0,510; 0,954)	0,810–0,880
ОРЭ (Н ₅₀ после инкубации эритроцитов), мОсм/кг RBCOR (H ₅₀ after RBC incubation), mOsm/kg	0,82 (0,62; 0,94)	0,54 (0,39; 0,63)	0,47–0,58
Индекс сферичности, ед. Sphericity index, units	2,4 (1,75; 2,95)	3,4 (2,75; 3,95)	3,4–3,9

Примечание. * – представлены медианы и области, соответствующие полупорному межквартильному интервалу.
Notes. * – the medians and values within the 1.5 IQR.

Таблица 2
Фильтруемость эритроцитов у пациентов с различными мембранопатиями*

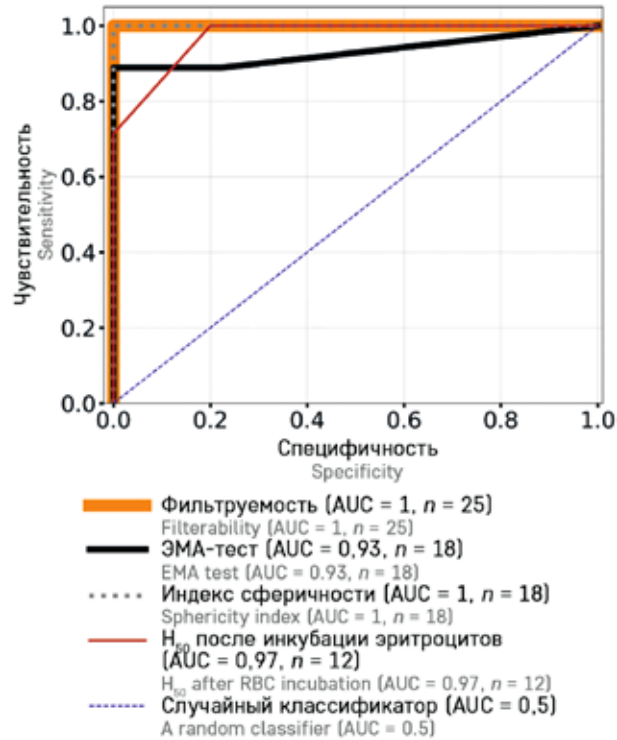
Tables 2
Red blood cell filterability in the patients with various membranopathies*

Пациент Patient	Величина фильтруемости, ед. Filterability, units	Диагноз (согласно клиническим рекомендациям) Diagnosis (established in accordance with the clinical recommendations)	Дополнительные данные Additional data
Все пациенты с НС кроме 1–3 (n = 27) All the patients with HS except pts. 1–3 (n = 27)	0–0,31	НС HS	У 10 пациентов диагноз подтвержден генетически, у остальных – клинико-лабораторно в соответствии с клиническими рекомендациями In 10 patients, the diagnosis was confirmed genetically, the others were diagnosed based on clinical and laboratory signs in accordance with the clinical recommendations
1	0,47	НС HS	Мутация гена <i>SPTA1</i> с.4339-99C>T в гетерозиготном состоянии, которая, по данным базы NCBI [12], была прежде охарактеризована и как сфероцитоз, и как эллиптоцитоз Heterozygous c.4339-99C>T mutation in the <i>SPTA1</i> gene which was previously characterized both as spherocytosis and elliptocytosis (according to the NCBI database [12])
2	0,64	НС HS	Нет данных о генетике и о возможных трансфузиях No data on genetics or possible transfusions
3	0,82	НС HS	Нет данных о генетике и о возможных трансфузиях No data on genetics or possible transfusions
4	0,86	Стоматоцитоз Stomatocytosis	Мутация гена <i>PIEZO1</i> , характерная для стоматоцитоза или ксероцитоза A mutation in the <i>PIEZO1</i> gene common in stomatocytosis or xerocytosis

Примечание. * – включены пациенты (с данными генетики и без) с величиной фильтруемости 0–0,31 ед., пациенты с диагностированным согласно клиническим рекомендациям НС, у которых величина фильтруемости превышает 0,31 ед., а также данные пациента со стоматоцитозом.
Notes. * – here we included the patients (with/without genetic data) with RBC filterability of 0–0.31 units, the patients diagnosed with HS according to the clinical recommendations whose RBC filterability was over 0.31 units as well as the patients with confirmed stomatocytosis.

Рисунок 3
ROC-кривые, построенные по данным каждого из тестов для пациентов с генетически подтвержденным диагнозом НС и с другими ГА, в первую очередь с дефицитом пируваткиназы, для определения чувствительности и специфичности каждого метода при постановке диагноза НС
Незначительное снижение чувствительности метода измерения фильтруемости эритроцитов, полученное при исследовании группы, куда вошли все пациенты с НС (даже без наличия его генетического подтверждения), может быть связано с тем, что в части случаев при молекулярно-генетическом исследовании диагноз может измениться, как, например, у пациента с гетерозиготной мутацией гена *SPTA1* с.4339-99C>T, которая в части случаев была характеризована как эллиптоцитоз. Чувствительность становилась максимальной, если в группу были включены только генетически подтвержденные НС. При этом специфичность метода оставалась максимальной в любом варианте

Figure 3
ROC curves generated using the test results of the patients with genetically confirmed HS or other HAs (mostly, with pyruvate kinase deficiency) in order to determine sensitivity and specificity of each method for HS diagnosis
The slightly decreased sensitivity of the RBC filterability measurement method tested in the group of all the HS patients (even if the diagnosis had not been genetically confirmed) may be explained by the fact that in some patients, molecular genetic testing may lead to a change of diagnosis, as it happened in the patient with heterozygous с.4339-99C>T mutation in the *SPTA1* gene that was in some cases characterized as elliptocytosis. The sensitivity reached its maximum when the analysis included the patients with genetically confirmed HS only. The specificity remained high in both cases



тически. Полученные в результате расчетов величины чувствительности и специфичности каждого из исследованных методов по отношению к диагностике НС приведены в *таблице 3*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследование фильтруемости эритроцитов показало высокую чувствительность, а также максимальную специфичность при дифференциальной

Таблица 3
Чувствительность и специфичность различных методов, используемых для диагностики НС

Метод Method	Чувствительность Sensitivity	Специфичность Specificity	AUC	n
Данные для всех пациентов The entire cohort				
Фильтруемость эритроцитов RBC filterability	0,93	1,00	0,97	45
ЭМА-тест EMA test	0,89	0,95	0,97	31
ОРЭ (H ₅₀ после 24 ч инкубации эритроцитов при 37°C) RBCOR (H ₅₀ after RBC incubation at 37°C over 24 hours)	1,00	0,80	0,98	28
Индекс сферичности эритроцитов RBC sphericity index	0,80	1,00	0,95	35
Данные только для пациентов с генетически подтвержденным НС Only the patients with genetically confirmed HS				
Фильтруемость эритроцитов RBC filterability	1,00	1,00	1,00	25
ЭМА-тест EMA test	0,89	0,78	0,93	18
ОРЭ (H ₅₀ после 24 ч инкубации эритроцитов при 37°C) RBCOR (H ₅₀ after RBC incubation at 37°C over 24 hours)	1,00	0,80	0,97	12
Индекс сферичности эритроцитов RBC sphericity index	1,00	1,00	1,00	18

диагностике НС и других ГА, в первую очередь дефицита пируваткиназы. Отмечаются особенно высокие значения величин чувствительности и специфичности (100%), если в группу с НС входят только пациенты с генетически подтвержденным диагнозом. Простой и доступный метод измерения фильтруемости эритроцитов может быть легко применен в любой лаборатории и стать надежной альтернативой дорогому и ограниченно доступному ЭМА-тесту.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ
Работа частично поддержана грантом Российского научного фонда №23-24-00178 (для В.М. Витвицкого и С.С. Шахиджанова).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ
Авторы статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

ORCID
Prudinnik D.S. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5995-7702>
Koleva L.D. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8803-5694>
Bovt E.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4724-8647>
Kushnir N.S. ORCID: <https://orcid.org/0009-0003-8800-6465>
Suvorova A.S. ORCID: <https://orcid.org/0009-0004-9565-5591>
Dolgikh I.A. ORCID: <https://orcid.org/0009-0007-6738-9558>
Shakhidjanov S.S. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5677-8052>
Vitvitsky V.M. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6251-6115>
Ataullakhanov F.I. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3403-181X>
Sinauridze E.I. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5948-3444>
Plyasunova S.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4503-0735>
Smetanina N.S. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2756-7325>

Литература / References

1. Ciepiela O. Old and new insights into the diagnosis of hereditary spherocytosis. *Ann Transl Med* 2018; 6 (17): 339. DOI: 10.21037/atm.2018.07.35
2. Bianchi P. Current Diagnostic Approach and Screening Methods for Hereditary Spherocytosis. *Thalass Rep* 2013; 3 (s1): e32. DOI: 10.4081/thal.2013.s1.e32
3. King M.J., Zanella A. Hereditary red cell membrane disorders and laboratory diagnostic testing. *Int J Lab Hem* 2013; 35: 237–43. DOI: 10.1111/ijlh.12070
4. Bolton-Maggs P.H., Langer J.C., Iolascon A., Tittensor P., King M.J. Guidelines for the diagnosis and management of hereditary spherocytosis – 2011 update. *Br J Haematol* 2012; 156 (1): 37–49. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2011.08921.x
5. Кузьминова Ж.А., Плясунова С.А., Жогов В.В., Сметанина Н.С. Цитометрический метод связывания эозин-5-малеимида в диагностике наследственного сфероцитоза. *Клиническая лабораторная диагностика* 2016; 61 (3): 168–72. DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-3-168-172 [Kuzminova Zh.A., Plyasunova S.A., Zhogov V.V., Smetanina N.S. The cytometric technique of binding of eosin-5-maleimide in diagnostic of hereditary spherocytosis. *Clinical Laboratory Diagnostics* 2016; 61 (3): 168–72. (In Russ.)].
6. Shim Y.J., Won D.I. Flow cytometric osmotic fragility testing does reflect the clinical severity of hereditary spherocytosis. *Cytometry B Clin Cytom* 2014; 86 (6): 436–43. DOI: 10.1002/cyto.b.21143
7. Справочник MSD, профессиональная версия. Сфероциты. [Электронный ресурс] URL: <https://www.msd-manuals.com/ru-ru/professional/multimedia/image/сфероциты> (дата обращения 03.06.2024). [MSD manual professional edition. Spherocytes. [Electronic source] URL: <https://www.msdmanuals.com/ru-ru/professional/multimedia/image/сфероциты> (Date of access: 03.06.2024). (In Russ.)].
8. King M.J., Behrens J., Rogers C., Flynn C., Greenwood D., Chambers K. Rapid flow cytometric test for the diagnosis of membrane cytoskeleton-associated haemolytic anaemia. *Br J Haematol* 2000; 111 (3): 924–33. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2000.02416.x
9. Prudinnik D.S., Sinauridze E.I., Shakhidzhanov S.S., Bovt E.A., Protsenko D.N., Rumyantsev A.G., Ataullakhanov F.I. Filterability of Erythrocytes in Patients with COVID-19. *Biomolecules* 2022; 12 (6): 782. Special Issue: Biochemical and Biophysical Properties of Red Blood Cells in Disease. DOI: 10.3390/biom12060782.
10. Атауллаханов Ф.И., Витвицкий В.М., Костына М.А., Лисовская И.Л. Способ определения деформируемости эритроцитов и устройство для его осуществления. Патент РФ №2052194С1 от 27.11.1991, дата публикации 10.01.1996. [Ataullakhanov F.I., Vitvitsky V.M., Kostyna M.A., Lisovskaya I.L. A method and a device for measuring red blood cell deformability. RF patent №2052194C1 of 27.11.1991, date of publication: 10.01.1996. (In Russ.)].
11. Lisovskaya I.L., Shurkhina E.S., Nesterenko V.M., Rozenberg J.M., Ataullakhanov F.I. Determination of the content of nonfilterable cells in erythrocyte suspensions as a function of the medium osmolality. *Biorheology* 1998; 35: 141–53.
12. NIH, National Library of Medicine (National Center for Biotechnology Information) [Electronic resource] URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/> (accessed 03.06.2024).

© 2024 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ
им. Дмитрия Рогачева»
Минздрава России
Поступила 06.03.2024
Принята к печати 08.04.2024



EDN: NTRMZP

Контактная информация:
Сергеенко Карина Андреевна,
врач-детский онколог отделения детской
трансплантации костного мозга
и гемопоэтических стволовых клеток
НИИ детской онкологии и гематологии
им. акад. Л.А. Дурнова ФГБУ «НМИЦ
онкологии им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России
Адрес: 115522, Москва,
ул. Каширское шоссе, 24
E-mail: karina_s19@mail.ru

DOI: 10.24287/1726-1708-2024-23-2-152-157

Аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток при рецидивах/ рефрактерном течении неходжкинских лимфом

К.А. Сергеенко¹, К.И. Киргизов¹, Е.Б. Мачнева^{1,2}, Н.А. Бурлака¹, Т.И. Потемкина¹,
К.В. Митраков¹, А.Ю. Елфимова¹, Д.С. Смирнова¹, М.Д. Малова¹, Ю.В. Лозован¹, Р.Р. Фатхуллин¹,
Н.Г. Степанян¹, Т.З. Алиев¹, И.О. Костарева¹, Ю.В. Скворцова³, А.В. Козлов⁴, Н.А. Батманова¹,
Н.В. Матинян¹, Т.В. Горбунова¹, Т.Т. Валиев¹, С.Р. Варфоломеева¹

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва

²Российская детская клиническая больница – филиал ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, Москва

³ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, Москва

⁴Научно-исследовательский институт детской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р.М. Горбачевой ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. И.П. Павлова» Минздрава России, Санкт-Петербург

Лечение неходжкинских лимфом (НХЛ) у детей с применением риск-ориентированных протоколов полихимиотерапии в настоящее время эффективно в 80–95% случаев даже при распространенных стадиях заболевания. При этом, несмотря на редкую встречаемость, рецидив/рефрактерные формы НХЛ имеют крайне неблагоприятное течение с низкими показателями выживаемости. Включение аутологичной и аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) в комплексную программу терапии рецидивов/рефрактерных форм НХЛ позволяет повысить результаты лечения за счет противоопухолевого действия химиопрепаратов режима кондиционирования и эффекта «трансплантат против опухоли», который, однако, менее выражен, чем при лейкозах. Кроме того, посттрансплантационные осложнения после аллогенной ТГСК в некоторых случаях способны нивелировать ее положительные результаты при НХЛ, в связи с этим для снижения токсичности, особенно при тяжелом соматическом статусе пациента, нередко отдается предпочтение режимам кондиционирования со сниженной интенсивностью. В статье представлено 2 клинических случая, в одном из них в связи с первым рецидивом лимфомы Беркитта выполнена аутологичная ТГСК. Тем не менее у больного развился повторный рецидив и была проведена аллогенная ТГСК от гаплоидентичного донора. Во втором случае ТГСК от неродственного HLA-идентичного донора выполнена пациенту с рецидивом анапластической крупноклеточной лимфомы. У обоих пациентов применялись режимы кондиционирования со сниженной интенсивностью. Такой подход позволил избежать развития тяжелых посттрансплантационных осложнений, обеспечив приживление трансплантата и донорский гемопоэтический химеризм. У пациента с рецидивом лимфомы Беркитта на ранних сроках после трансплантации развилась вторая опухоль – острый Т-лимфобластный лейкоз, от которого пациент погиб. У второго больного отмечалось прогрессирование лимфомы даже на фоне приема таргетного препарата кризотиниб, приведшее к летальному исходу. Родители пациентов дали согласие на использование информации, в том числе фотографий детей, в научных исследованиях и публикациях.

Ключевые слова: неходжкинские лимфомы, анапластическая крупноклеточная лимфома, лимфома Беркитта, химиотерапия, таргетная терапия, трансплантация гемопоэтических стволовых клеток

Сергеенко К.А. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2024; 23 (2): 152–7. DOI: 10.24287/1726-1708-2024-23-2-152-157

Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for relapsed/refractory non-Hodgkin lymphomas

K.A. Sergeenko¹, K.I. Kirgizov¹, E.B. Machneva^{1,2}, N.A. Burlaka¹, T.I. Potemkina¹, K.V. Mitrakov¹, A.Yu. Elfimova¹,
D.S. Smirnova¹, M.D. Malova¹, Yu.V. Lozovan¹, R.R. Fatkhullin¹, N.G. Stepanyan¹, T.Z. Aliev¹, I.O. Kostareva¹,
Yu.V. Skvortsova³, A.V. Kozlov⁴, N.A. Batmanova¹, N.V. Matinyan¹, T.V. Gorbunova¹, T.T. Valiev¹,
S.R. Varfolomeeva¹

¹The N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow

²Russian Children's Clinical Hospital of the N.I. Pirogov Russian National Research Medical University of Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow

³The Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology of Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow

⁴The R.M. Gorbacheva Research Institute for Pediatric Oncology, Hematology and Transplantation, the I. P. Pavlov First Saint-Petersburg State Medical University of Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Saint Petersburg

© 2024 by «D. Rogachev NMRCPOI»

Received 06.03.2024

Accepted 08.04.2024

Treatment of non-Hodgkin lymphomas (NHL) in children using risk-based chemotherapy protocols is currently effective in 80–95% of cases, even in advanced stages of the disease. However, relapsed/refractory forms of NHL (which are less common) have an extremely unfavorable course with low survival rates. The addition of autologous and allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) to a comprehensive treatment program for relapsed/refractory forms of NHL can improve treatment results due to the antitumor effect of chemotherapy drugs of the conditioning regimen and the graft-versus-tumor effect, which is, however, less significant than in leukemia. Moreover, post-transplant complications after allogeneic HSCT in some cases can offset its positive results in NHL; therefore, to reduce toxicity, especially in severe somatic status of the patient, preference is often given to reduced-intensity conditioning regimens. This article presents two clinical cases. In one case, autologous HSCT was carried out for the first relapse of Burkitt's lymphoma. However, the patient developed a second relapse and underwent allogeneic HSCT from a haploidentical donor. In the second case, HSCT from an unrelated HLA identical donor was carried out in a patient with relapsed anaplastic large cell lymphoma. Both patients received reduced-intensity conditioning regimens. This approach helped to avoid the development of severe post-transplant complications, ensuring successful engraftment and achievement of donor hematopoietic chimerism. Early after transplantation, the patient with relapsed Burkitt's lymphoma developed a second tumor – acute T-lymphoblastic leukemia, from which the patient died. Despite treatment with targeted drug crizotinib, the second patient showed lymphoma progression, which resulted in death. The patients' parents gave consent to the use of their children's data, including photographs, for research purposes and in publications.

Key words: non-Hodgkin lymphomas, anaplastic large cell lymphoma, Burkitt's lymphoma, chemotherapy, targeted therapy, hematopoietic stem cell transplantation

Sergeenko K.A., et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology 2024; 23 (2): 152–7.
DOI: 10.24287/1726-1708-2024-23-2-152-157

Correspondence:

Karina A. Sergeenko,
a pediatric oncologist at the Department
of Pediatric Bone Marrow and Hematopoietic
Stem Cell Transplantation
of the L.A. Durnov Research Institute
of Pediatric Oncology and Hematology of the
N.N. Blokhin National Medical Research Center
of Oncology, Ministry of Healthcare
of the Russian Federation
Address: 24 Kashirskoe Highway,
115522 Moscow, Russia
E-mail: karina_s19@mail.ru

Неходжкинские лимфомы (НХЛ) у детей и подростков представляют собой первично генерализованные злокачественные опухоли с диффузной гистологической структурой и высоким пролиферативным потенциалом, чувствительные к специфической цитостатической химиотерапии. У детей наиболее часто диагностируют такие варианты НХЛ, как лимфома Беркитта (ЛБ) (45–55%), Т-лимфобластная лимфома (15–20%), диффузная В-крупноклеточная лимфома (8–10%) и анапластическая крупноклеточная лимфома (АККЛ) (8–10%). В настоящее время для лечения НХЛ применяют риск-адаптированную интенсивную (по дозам и временным режимам) полихимиотерапию (ПХТ) в сочетании с выполнением комплекса сопроводительных мероприятий. Кроме того, в последние десятилетия широко применяют иммунотерапию [1, 2].

Прогноз пациентов детского возраста с НХЛ определяется стадией заболевания (распространенностью опухолевого процесса), ответом на индукционную терапию, соблюдением протокола лечения, а также качеством сопроводительной терапии [1].

При использовании современных методов терапии уровень излечения НХЛ колеблется от 80 до 95% даже у детей с диссеминированными опухолями. Основными проблемами терапии НХЛ, которые стоят в настоящее время перед учеными и клиницистами, являются оптимизация лечения для предотвращения рецидива, поскольку прогноз у пациентов с рецидивом/рефрактерным течением (р/р) заболевания остается плохим. Перспективные стратегии по лечению НХЛ у детей заключаются в использовании новых таргетных методов терапии, способных не только улучшить показатели выживаемости больных, но и снизить токсичность, а также избежать отдаленных побочных эффектов перенесенного лечения [3, 4].

Несмотря на то, что р/р НХЛ встречаются редко, лечение таких пациентов представляет собой крайне сложную задачу, а результаты терапии остаются

неудовлетворительными. В частности при агрессивных В-клеточных р/р НХЛ схемы терапии, включающие ритуксимаб, могут обеспечить полный/частичный ответ в 60–70% случаев, но многолетняя общая выживаемость (ОВ) больных не превышает 30%. Проведение аутологичной (ауто-ТГСК) или аллогенной (алло-ТГСК) трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) в настоящее время является обязательным методом у пациентов с химиочувствительным рецидивом НХЛ и обеспечивает ОВ в 50% случаев [5, 6].

Так, согласно рекомендациям EBMT (2019), при р/р ЛБ ауто-ТГСК можно использовать для улучшения статуса ремиссии у пациентов с недостаточным ответом на стандартную ПХТ [7]. Алло-ТГСК может применяться при р/р ЛБ во второй ремиссии. Согласно данным A.J. Peniket и соавт. (2003), предпочтительным является использование полностью совместимого донора и режимов кондиционирования со сниженной интенсивностью, при этом трансплантационная летальность составляет 30%, 5-летняя ОВ – 30–40%, а безрецидивная выживаемость – 35% [8]. Проведенный A.J. Peniket и соавт. (2003) анализ результатов лечения большой когорты пациентов с лимфомами, которым была выполнена ТГСК, показал преимущество алло-ТГСК перед ауто-ТГСК с точки зрения снижения частоты рецидивов, но преимуществ в выживаемости не было за счет тяжелых осложнений, сопровождающих больных в посттрансплантационном периоде [8].

Результаты крупного международного исследования, посвященного роли ТГСК у детей и подростков с р/р НХЛ, были опубликованы B. Burkhardt и соавт. (2018). Для популяции из 646 больных с р/р НХЛ (включены все морфо-иммунологические варианты) выживаемость составила 55% при проведении ауто-ТГСК и 48% при включении в программу терапии алло-ТГСК, в то время как для пациентов без ТГСК данный показатель составил менее 10%. Однако достоверно сравнить группы пациентов с ТГСК и без

нее не представляется возможным, так как в трансплантационной когорте пациенты преимущественно были в ремиссии, тем самым изначально имея более благоприятную ситуацию. А больным в когорте без ТГСК она не проводилась, так как большая часть пациентов имели противопоказания, находясь вне ремиссии. Таким образом, статус ремиссии перед ТГСК был связан с исходом: выживаемость прогрессивно снижалась в зависимости от ответа на предшествующую терапию – от 60% для пациентов, перенесших трансплантацию в полной ремиссии, до 11% у тех, кому ТГСК была выполнена во время прогрессии заболевания. В данном исследовании не было выявлено явного преимущества алло-ТГСК по сравнению с ауто-ТГСК – эффект «трансплантат против лимфомы» был нивелирован более высокой трансплантационной летальностью при алло-ТГСК по сравнению с ауто-ТГСК (16% против 7%). Смертность от основного заболевания была высокой и значимо не отличалась при алло-ТГСК и ауто-ТГСК: 34% и 31% соответственно [9, 10]. Для улучшения результатов алло-ТГСК у пациентов с НХЛ предлагаются различные варианты сочетания предтрансплантационного лечения с включением таргетных препаратов, иммунотерапии, радиоиммунотерапии. Одна из стратегий заключается в получении максимально полного ответа перед алло-ТГСК с помощью предшествующего проведения ауто-ТГСК с миелоаблативным кондиционированием и последующей алло-ТГСК после режима кондиционирования со сниженной интенсивностью. Данный подход позволяет несколько снизить смертность от осложнений алло-ТГСК, обусловленных миелоаблативным кондиционированием, сохраняя при этом эффект «трансплантат против лимфомы» [11–13].

Поскольку при проведении алло-ТГСК у больных р/р НХЛ куративный эффект основан не только на противоопухолевом действии режима кондиционирования, но и на феномене «трансплантат против лимфомы», в настоящее время одним из методов снижения токсичности, а следовательно, риска трансплантационной летальности представляется применение режимов кондиционирования со сниженной интенсивностью. Это особенно актуально для пациентов с тяжелым соматическим статусом, обусловленным предшествующим лечением, а также инфекционными осложнениями. Однако опубликованные данные о результатах ТГСК у пациентов с р/р НХЛ демонстрируют по-прежнему низкие показатели выживаемости, высокую частоту повторных рецидивов и трансплантационной летальности, что связано как с природой опухолевого процесса, так и с менее выраженным эффектом «трансплантат против опухоли», чем при алло-ТГСК у пациентов с лейкозами. Исключением является ALK-позитивная

АККЛ, при которой результаты алло-ТГСК показывают относительно высокую эффективность [14, 15]. Представляем описание клинических случаев, демонстрирующих низкую эффективность алло-ТГСК при р/р НХЛ. Родители пациентов дали согласие на использование информации, в том числе фотографий детей, в научных исследованиях и публикациях.

КЛИНИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ №1

Пациент М., 7 лет, основной клинический диагноз «ЛБ с поражением почек, печени, поджелудочной железы, лимфоузлов брюшной полости, забрюшинных лимфоузлов, легких, бронхопульмональных лимфоузлов справа. III стадия, 4-я группа риска». Проводилась терапия по протоколу B-NHL-BFM 95 с ритуксимабом. Достигнута первая ремиссия, но через 2 года был констатирован рецидив. С учетом позднего рецидива было принято решение о проведении терапии первой линии, что позволило получить полную повторную ремиссию и консолидировать полный противоопухолевый эффект высокодозной ПХТ с ауто-ТГСК. Через 4 мес от ауто-ТГСК констатирован ранний повторный рецидив с поражением легких, лимфатических узлов брюшной полости, почек, костного мозга. Выполнена ПХТ по схеме ICE (ифосфамид, карбоплатин, этопозид) с включением препаратов ниволумаб и ритуксимаб. Достигнута полная ремиссия 3.

Учитывая высокий риск рецидива основного заболевания, в качестве консолидирующей терапии принято решение о проведении алло-ТГСК от HLA-гаплоидентичного донора (матери). На момент начала предтрансплантационного кондиционирования у пациента отмечалось наличие осложнений предшествующей терапии: хроническая болезнь почек I стадии, состояние после гемодиализа, вторичная ренальная артериальная гипертензия, минимальная вторичная легочная гипертензия, белково-энергетическая недостаточность II степени. Учитывая нарастание степени тяжести сопутствующих осложнений, был выбран режим кондиционирования со сниженной интенсивностью: бендамустин 390 мг/м², флударабин 90 мг/м². Профилактика реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ) включала: ритуксимаб 375 мг/м² в –1-й день, абатацепт 10 мг/кг в дни –1, +7, +14, +21, +28, посттрансплантационный циклофосфамид в редуцированной дозе 40 мг/кг в дни +3-й и +4, циклоспорин А в стартовой дозе 1 мг/кг под контролем токсичности и концентрации в крови. В качестве источника гемопоэтических стволовых клеток использовался нативный костный мозг. Клеточность трансплантата по CD34⁺ составила $4,6 \times 10^6$ /кг массы тела реципиента.

Период кондиционирования осложнился активацией вируса герпеса 3-го типа с поражением кожных покровов и слизистых оболочек, разрешившегося на фоне противовирусной терапии ацикловиром в дозе 750 мг/м²/сут в течение 10 дней. Восстановление лейкопоза было зафиксировано на +16-й день, тромбоцитопоза – на +22-й день. В раннем посттрансплантационном периоде отмечалось развитие стандартных нетяжелых инфекционных и токсических осложнений: орофарингеального мукозита II степени, нейтропенического энтероколита II степени, реактивации цитомегаловируса в крови (1259 копий/мл). На фоне стандартной антибактериальной, противогрибковой, противовирусной, а также сопроводительной терапии осложнения разрешились.

На +25-й день отмечалась манифестация кожной формы острой РТПХ III степени, купированной введением метилпреднизолона 1 мг/кг/сут коротким курсом в течение 3 дней, топической терапией (такролимус + пимекролимус + метилпреднизолона ацепонат) на фоне планового приема циклоспорина А. На фоне проводимой терапии кожные проявления полностью нивелированы. К +50-му дню отмечалось ухудшение течения хронической болезни почек с появлением гиперазотемии, гиперкалиемии с развитием метаболического ацидоза, артериальной гипертензии, трудно поддающейся антигипертензивной терапии. С учетом нефротоксичности циклоспорин был отменен и в качестве базовой профилактики РТПХ назначен руксолитиниб. Симптомы были купированы путем редукции доз нефротоксичных препаратов.

На +30-й день от ТГСК в рамках контроля основного заболевания проведено комплексное обследование, констатирован статус ремиссии, полный донорский гемопоэтический химеризм. В дальнейшем пациент находился под динамическим наблюдением в рамках раннего посттрансплантационного периода.

По результатам обследования через 4 мес от проведения ТГСК в периферической крови у пациента выявлен лейкоцитоз $16 \times 10^9/\text{л}$, бластные клетки 12,6%. В костном мозге содержание бластов составляло 76%. По данным иммунофенотипирования иммунофенотип бластной популяции (CD1a⁺/CD2⁺/CD4⁺/CD5⁺/CD7⁺/CD8⁺/CD13⁺/CD45⁺/HLA-DR⁺/iCD3⁺/i79a⁺) соответствовал острому лимфобластному лейкозу, вариант TIII (кортикальный) с коэкспрессией CD13, iCD79a. Таким образом, констатирована вторая опухоль – острый Т-лимфобластный лейкоз. Учитывая развитие лейкоза на ранних сроках после алло-ТГСК, тяжелый соматический статус пациента, обусловленный предшествующей терапией, проведение радикальной терапии пациенту было невозможно, ребенку был присвоен паллиативный статус. Пациент погиб от прогрессирования основного

заболевания через 4 мес после констатации второй опухоли.

КЛИНИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ №2

Пациент Г., 10 лет, диагноз «АККЛ, ALK-позитивная. Поражение околоушной слюнной железы справа, шейных, подмышечных лимфоузлов справа, внутригрудных лимфоузлов, селезенки, внутрибрюшных лимфоузлов и лимфоузлов ворот печени. III стадия, 3-я группа риска». Пациенту проведена терапия по протоколу ALCL99, на фоне которой констатировано прогрессирование болезни. Терапия второй линии включала 4 курса ViGePD + брентуксимаб ведотин, достигнут полный метаболический ответ, подтвержденный результатами позитронно-эмиссионной томографии, совмещенной с компьютерной томографией, с ¹⁸F-фтордезоксиглюкозой. В целях консолидации ремиссии принято решение о проведении алло-ТГСК от неродственного HLA-идентичного донора, включая режим кондиционирования со сниженной интенсивностью: флударабин 90 мг/м², бендамустин 390 мг/м². Режим профилактики РТПХ включал иммуноглобулин антиtimoцитарный 90 мг/кг, ритуксимаб 375 мг/м² на –1-й день, абатацепт 10 мг/кг в дни –1, +7, +14, +21, такролимус в стартовой дозе 0,02 мг/кг с –1-го дня под контролем концентрации в крови. Клеточность трансплантата (нативный костный мозг) по CD34⁺ составила $7,5 \times 10^6/\text{кг}$ массы тела реципиента. Течение раннего посттрансплантационного периода осложнилось сывороточной болезнью, ассоциированной с введением иммуноглобулина антиtimoцитарного, а также кожной формой острой РТПХ III степени. Оба осложнения разрешились на фоне введения метилпреднизолона 1 мг/кг/сут коротким курсом. Восстановление лейкопоза фиксировано через 14 дней от ТГСК. По данным исследования гемопоэтического химеризма на +23-й день от ТГСК клеточность по линии CD34⁺ составила 16% собственных клеток.

На +20-й день от ТГСК отмечалась манифестация генерализованной лимфаденопатии с вовлечением шейных, заушных, надключичных, подмышечных, паховых лимфоузлов, рефрактерной фебрильной лихорадки с нарастанием уровня провоспалительных маркеров (без эффекта на проводимую комбинированную противомикробную терапию), экзантемы. По данным морфо-иммунологических исследований биоптата лимфоузла и кожи, а также инструментальных методов обследования у пациента диагностирован рецидив с поражением околоушных желез, внутригрудных, медиастинальных, шейных, подмышечных, надключичных, подключичных, паховых лимфоузлов, кожных покровов.

Учитывая экспрессию ALK в опухолевых клетках, была начата терапия ингибитором тирозинкиназ кризотинибом, введение винбластина. Терапия осложнилась развитием агранулоцитоза без ответа на стимуляцию лейкопоза гранулоцитарным колониестимулирующим фактором, орофарингеального мукозита III степени, пареза кишечника с выраженным абдоминальным болевым синдромом, вторичной артериальной гипертензии. На +60-й день от ТГСК отмечено стремительное ухудшение состояния с появлением общемозговых симптомов, угнетения сознания, отека вещества головного мозга (подтверждено компьютерной томограммой), церебральной ишемии. По данным анализа ликвора: цитоз 110 кл/мм³, лимфоидные клетки относящиеся к АККЛ – 63%. Таким образом, у ребенка диагностировано прогрессирование лимфомы с поражением центральной нервной системы, пациенту присвоен паллиативный статус. Летальный исход наступил в связи с дальнейшим прогрессированием основного заболевания на +70-й день от алло-ТГСК.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на хорошие результаты лечения НХЛ у детей в целом, лечение р/р НХЛ по-прежнему остается крайне сложной задачей, что продемонстрировано в 2 представленных клинических случаях, а также в крупных международных исследованиях [5, 8]. Пятилетняя ОВ пациентов с р/р НХЛ после ТГСК составляет не более 50%, а без трансплантации – всего 10%. В представленных нами клинических случаях оба пациента погибли на ранних сроках после ТГСК: один от второй опухоли, другой от прогрессии лимфопролиферативного заболевания, несмотря на предшествующую многолинейную терапию, отсутствие тяжелых посттрансплантационных осложнений, приживление трансплантата и хорошие показатели донорского гемопоэтического химеризма, а также развитие РТПХ на ранних сроках после ТГСК, что позволяло предположить потенциальный эффект «трансплантат против лимфомы».

Модификация препаративных режимов (использование режимов кондиционирования со сниженной интенсивностью) в целях снижения потенциальной токсичности на фоне тяжелого соматического статуса и предшествующих массивных блоков ПХТ позволила избежать у пациентов развития тяжелых посттрансплантационных осложнений, при этом обеспечила приживление трансплантата и донорский гемопоэтический химеризм. Несмотря на это, с помощью алло-ТГСК не удалось обеспечить достаточного противоопухолевого эффекта ни с помощью различных режимов ПХТ, в том числе с включением высокоэффективных химиопрепаратов

против лимфом, таких как бендамустин [16], ни с помощью функции иммунных факторов трансплантата. У первого пациента развилась вторая опухоль – острый Т-лимфобластный лейкоз, у второго – ранняя прогрессия лимфомы. Применение противорецидивной терапии с включением таргетного препарата кризотиниб у второго пациента также не позволило сдержать прогрессирование основного заболевания. Выбор источника периферических стволовых клеток также не повлиял на исход алло-ТГСК.

Таким образом, данные литературы и представленные клинические случаи указывают на крайне агрессивную природу некоторых вариантов НХЛ, не позволяющую достичь длительной ремиссии даже в случаях применения таких интенсивных методов терапии, как алло-ТГСК. Режимы кондиционирования со сниженной интенсивностью позволяют избежать тяжелых посттрансплантационных осложнений у пациентов с тяжелым соматическим статусом, обеспечивают хорошее приживление трансплантата и донорский химеризм. Однако, несмотря на удовлетворительную функцию трансплантата, а также развитие РТПХ, добиться достаточного эффекта «трансплантат против лимфомы» не удастся. В целях улучшения результатов алло-ТГСК у пациентов с подобными агрессивными р/р НХЛ необходимо проведение как дальнейших исследований природы НХЛ, так и клинических исследований с возможным применением «бридж»-терапии перед алло-ТГСК в виде предшествующей ауто-ТГСК, таргетной и иммунотерапии.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Не указан.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

ORCID

Sergeenko K.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3225-8412>
Kirgizov K.I. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1469-2365>
Machneva E.B. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2395-4045>
Burlaka N.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3289-223X>
Potemkina T.I. ORCID: <https://orcid.org/0009-0007-0074-7197>
Mitrakov K.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2010-5534>
Elfimova A.Yu. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8143-5791>
Smirnova D.S. ORCID: <https://orcid.org/0009-0007-2171-1951>
Malova M.D. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9112-5973>
Lozovan Yu.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0600-8962>
Fatkullin R.R. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5988-8428>
Stepanyan N.G. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7939-5129>
Aliev T.Z. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1091-1521>
Kostareva I.O. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0179-2479>
Skvortsova Yu.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0566-053X>
Kozlov A.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4072-601X>
Batmanova N.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3005-2085>
Matinyan N.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7805-5616>
Gorbunova T.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5805-726X>
Valiev T.T. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1469-2365>
Varfolomeeva S.R. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6131-1783>

Литература / References

1. Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению неходжкинских лимфом у детей. М.; 2015. [Электронный ресурс] URL: http://nodgo.org/sites/default/files/19%20%D0%9D%D0%A5%D0%9B_%D1%80%D0%B5%D0%B4%201.pdf (дата обращения 03.03.2024). [Federal clinical guidelines for the diagnosis and treatment of non-Hodgkin lymphomas in children. Moscow; 2015. [Electronic resource] URL: http://nodgo.org/sites/default/files/19%20%D0%9D%D0%A5%D0%9B_%D1%80%D0%B5%D0%B4%201.pdf (access date 03.03.2024). (In Russ.)].
2. Chiu B.C.-H., Hou N. Epidemiology and Etiology of Non-Hodgkin Lymphoma. *Cancer Treat Res* 2015; 165: 1–25. DOI: 10.1007/978-3-319-13150-4_1
3. Bollard C.M., Lim M.S., Gross T.G.; COG Non-Hodgkin Lymphoma Committee. Children's Oncology Group's 2013 blueprint for research: non-Hodgkin lymphoma. *Pediatr Blood Cancer* 2013; 60 (6): 979–84. DOI: 10.1002/pbc.24416. Epub 2012 Dec 19. PMID: 23255391; PMCID: PMC4327936.
4. Oliveira M.C.L., Sampaio K.C., Brito A.C., Campos M.K., Murao M., Gusmão R., et al. 30 Years of Experience with Non-Hodgkin Lymphoma in Children and Adolescents: a retrospective cohort study. *Rev Assoc Med Bras (1992)* 2020; 66 (1): 25–30. DOI: 10.1590/1806-9282.66.1.25
5. Moleti M.L., Testi A.M., Foà R. Treatment of relapsed/refractory paediatric aggressive B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Br J Haematol* 2020; 189 (5): 826–43. DOI: 10.1111/bjh.16461
6. Berning P., Schmitz N., Ngoya M., Finel H., Boumendil A., Wang F., et al. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for NK/T-cell lymphoma: an international collaborative analysis. *Leukemia* 2023; 37 (7): 1511–20. DOI: 10.1038/s41375-023-01924-x
7. Carreras E., Dufour C., Mohty M., Kröger N. (eds.). *The EBMT Handbook: Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Cellular Therapies*. 7th ed. Cham (CH): Springer; 2019.
8. Peniket A.J., Ruiz de Elvira M.C., Taghipour G., Cordonnier C., Gluckman E., de Witte T., Santini G., et al. An EBMT registry matched study of allogeneic stem cell transplants for lymphoma: allogeneic transplantation is associated with a lower relapse rate but a higher procedure related mortality rate than autologous transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2003; 31: 667–78. DOI: 10.1038/sj.bmt.1703891
9. Moleti M.L., Testi A.M., Foà R. Treatment of relapsed/refractory paediatric aggressive B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Br J Haematol* 2020; 189 (5): 826–43. DOI: 10.1111/bjh.16461
10. Burkhardt B., Pilon M., Taj M., Garnier N., Minard V., Hazar V., et al. Role of HST in children and adolescents with refractory or relapsed NHL. *Br J Haematol* 2018; 182 (Suppl 1): 24 (abstract 30).
11. Satwani P., Jin Z., Martin P.L., Bhattia M., Garvin J.H., George D., et al. Sequential myeloablative autologous stem cell transplantation and reduced intensity allogeneic hematopoietic cell transplantation is safe and feasible in children, adolescents and young adults with poor-risk refractory or recurrent Hodgkin and non-Hodgkin lymphoma. *Leukemia* 2015; 29 (2): 448–55. DOI: 10.1038/leu.2014.194
12. Chen Y.B., Li S., Fisher D.C., Driscoll J., Del Rio C., Abramson J., et al. Phase II Trial of Tandem High-Dose Chemotherapy with Autologous Stem Cell Transplantation Followed by Reduced-Intensity Allogeneic Stem Cell Transplantation for Patients with High-Risk Lymphoma. *Biol Blood Marrow Transplant* 2015; 21 (9): 1583–8. DOI: 10.1016/j.bbmt.2015.05.016
13. Baek D.W., Moon J.H., Lee J.H., Kang K.W., Lee H.S., Eom H.S., et al.; Korean Society of Blood and Marrow Transplantation. Real-world data of long-term survival in patients with T-cell lymphoma who underwent stem cell transplantation. *Blood Cancer J* 2023; 13 (1): 95. DOI: 10.1038/s41408-023-00868-w
14. Knörr F., Brugières L., Pilon M., Zimmermann M., Ruf S., Attarbaschi A. Stem Cell Transplantation and Vinblastine Monotherapy for Relapsed Pediatric Anaplastic Large Cell Lymphoma: Results of the International, Prospective ALCL-Relapse Trial. *J Clin Oncol* 2020; 38 (34): 3999–4009. DOI: 10.1200/jco.20.00157
15. Галимов А.Н., Лепик Е.Е., Козлов А.В., Геворгян А.Г., Казанцев И.В., Юхта Т.В. и др. Лечение рецидивирующей и рефрактерной анапластической крупноклеточной лимфомы, экспрессирующей киназу анапластической лимфомы: опыт одного Центра. *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии* 2023; 22 (1): 22–31. DOI: 10.24287/1726-1708-2023-22-1-22-31 [Galimov A.N., Lepik E.E., Kozlov A.V., Gevorgyan A.G., Kazantsev I.V., Yukhta T.V., et al. The treatment of relapsed/refractory anaplastic large cell lymphoma expressing the anaplastic lymphoma kinase: a single-center experience. *Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology* 2023; 22 (1): 22–31. (In Russ.)].
16. Munakata W., Tobinai K. The discovery and the development of bendamustine for the treatment of non-Hodgkin lymphoma. *Expert Opin Drug Discov* 2016; 11 (11): 1123–30. DOI: 10.1080/17460441.2016.1233174

© 2024 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России
Поступила 09.04.2024
Принята к печати 08.05.2024



EDN: 00Q0PH

Контактная информация:

Скворцова Юлия Валериевна,
д-р мед. наук, врач-гематолог, заместитель
заведующего отделением трансплантации
гемопозитических стволовых клеток №2
ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева»
Минздрава России
Адрес: 117997, Москва,
ул. Саморы Машела, 1
E-mail: yuscvo@mail.ru

© 2024 by «D. Rogachev NMRCPHOI»

Received 09.04.2024
Accepted 08.05.2024

Correspondence:

Yulia V. Skvortsova,
Dr. Med. Sci., a hematologist, Deputy Head
of Hematopoietic Stem Cell Transplantation
Department №2 at the Dmitry Rogachev
National Medical Research Center of Pediatric
Hematology, Oncology and Immunology
of Ministry of Healthcare
of the Russian Federation
Address: 1 Samory Mashela St.,
Moscow 117997, Russia
E-mail: yuscvo@mail.ru

DOI: 10.24287/1726-1708-2024-23-2-158-166

Хроническая реакция «трансплантат против хозяина» после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток

Ю.В. Скворцова

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, Москва

Хроническая реакция «трансплантат против хозяина» (РТПХ) является тяжелым осложнением аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК), в основе которого лежит иммунная дисрегуляция, приводящая к мультисистемному поражению с исходом в склерозирование тканей. Данное осложнение пролонгировано во времени и существенно нарушает качество жизни реципиентов ТГСК вследствие формирования вторичного иммунодефицита на фоне комбинированной иммуносупрессивной терапии, ограничения функций и реже – инвалидизации. Помимо активной профилактики хронической РТПХ необходим регулярный мониторинг пациентов для своевременного выявления первых признаков данного осложнения и проведения эффективной терапии. В кратком обзоре хронической РТПХ приведены новые подходы к определению и стадированию, а также указаны современные способы ее предотвращения и лечения.

Ключевые слова: хроническая реакция «трансплантат против хозяина», аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток

Скворцова Ю.В. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2024; 23 (2): 158–66. DOI: 10.24287/1726-1708-2024-23-2-158-166

Chronic graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation

Yu.V. Skvortsova

Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology of Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow

Chronic graft-versus-host disease (GVHD) is a serious complication of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) caused by immune dysregulation leading to multisystem involvement resulting in tissue sclerosis. This is a long-term complication that can significantly affect the quality of life of HSCT recipients due to secondary immunodeficiency associated with combined immunosuppressive therapy, impaired organ function and even disability. In addition to active prophylaxis for chronic GVHD, regular follow-up of patients is necessary for early detection of signs and symptoms of GVHD to enable timely and effective treatment. Here, we present a brief overview of novel approaches to diagnosis, classification, and staging of chronic GVHD, as well as current prophylaxis and treatment options.

Key words: chronic graft-versus-host disease, allogeneic hematopoietic stem cell transplantation

Skvortsova Yu.V., et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology 2024; 23 (2): 158–66.
DOI: 10.24287/1726-1708-2024-23-2-158-166

Хроническая реакция «трансплантат против хозяина» (хрРТПХ) остается одной из лидирующих причин заболеваемости и смертности после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК). Общая встречаемость данного осложнения составляет 40–70% [1], при этом при использовании совместимого родственного донора частота развития хрРТПХ варьирует в диапазоне 30–50%, при неродственном или гаплоидентичном доноре достигает 70% [2], частота развития данного осложнения у детей ниже и составляет 15–40% [3].

Среди реципиентов ТГСК, проживших более 2 лет, хрРТПХ остается ведущей причиной заболеваемости и смертности – на втором месте после рецидивов основного заболевания [4, 5]. Не связанная с рецидивом летальность у данных пациентов состав-

ляет 22% к 5 годам и 40% к 12 годам после ТГСК [6]. Основной причиной летальных исходов являются инфекции на фоне комбинированной иммуносупрессивной терапии (ИСТ), а также неинфекционные поражения легких, такие как облитерирующий бронхолит. Кроме того, у пациентов с хрРТПХ в 2,4 раза повышен риск развития вторичных опухолей [7]. У взрослых пациентов хрРТПХ существенно увеличивает риск развития сердечно-сосудистой патологии вследствие дислипидемии, гипергликемии, артериальной гипертензии [8].

Факторы риска и классификация

К наиболее значимым факторам риска развития хрРТПХ относятся HLA-различия между донором и реципиентом, различия по полу (донор-женщина, реципиент-мужчина), использование перифери-

ческих стволовых клеток в качестве источника трансплантата, предшествующая острая реакция «трансплантат против хозяина» (оРТПХ), тотальное облучение тела в кондиционировании [9, 10]. Также признана роль дефицита витамина D [11].

В основе современной классификации реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ) по-прежнему лежат прежде всего клинические проявления. Различают 4 категории РТПХ [12]:

- 1) классическая оРТПХ, возникающая в течение 100 дней после трансплантации или инфузии донорских лимфоцитов (ИДЛ);
- 2) персистирующая, возобновляющаяся или поздняя оРТПХ – признаки классической оРТПХ без отличительных симптомов хрРТПХ в течение 100 дней и более после трансплантации или ИДЛ (часто наблюдается при отмене ИСТ);
- 3) «синдром перекреста» оРТПХ и хрРТПХ (манифестация и той, и другой);
- 4) хрРТПХ.

Согласно Консенсусу Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), 2 последние категории формируют широкую категорию хрРТПХ. «Синдром

перекреста» является прогностически наиболее неблагоприятным [13].

Согласно последнему Консенсусу (от 2018 г.) [14], выделяют виды РТПХ в зависимости от статуса, начала развития, ответа на терапию глюкокортико-стероидами (ГКС) (таблица 1).

Клинические проявления хронической реакции «трансплантат против хозяина»

В основе клинических проявлений хрРТПХ лежит развитие склеротических изменений различных тканей или фиброза. Клинические критерии хрРТПХ представлены в таблице 2.

Наиболее характерные клинические проявления хрРТПХ представлены на рисунке 1.

Патогенез хронической реакции «трансплантат против хозяина»

В патогенезе хрРТПХ участвуют донорские В- и Т-клетки, а также другие клеточные популяции [16]. Схема патогенеза хрРТПХ представлена на рисунке 2.

Первый этап повреждения тканей происходит на этапе подготовки к ТГСК – в результате конди-

Таблица 1
Классификация хрРТПХ [14]

Tables 1
Classification of chronic graft-versus-host disease (cGVHD) [14]

хрРТПХ cGVHD	Характеристика Characteristic
В зависимости от статуса According to clinical status	
Активная Active	Сохраняется в настоящее время Currently present
Контролируемая Controlled	Нет активных проявлений на ИСТ или на протяжении ≥ 24 нед после ее окончания No signs of active GVHD on IST or for ≥ 24 weeks off IST
Неактивная Inactive	Нет активных проявлений вне ИСТ (завершена ≥ 24 нед назад), но остались необратимые изменения (диспигментация, фиброз, рубцы и т. д.) No signs of active GVHD off IST (IST stopped for ≥ 24 weeks), but irreversible changes, such as dyspigmentation, fibrosis, scars, etc., remain
Разрешившаяся Resolved	Проявления отсутствуют полностью спустя > 24 нед после ИСТ No GVHD manifestations for over 24 weeks off IST
В зависимости от начала развития According to GVHD onset	
De novo	Первый эпизод хрРТПХ без предшествующей оРТПХ (независимо от срока после ТГСК) First episode of cGVHD, without prior aGVHD (irrelevant to time post HSCT)
Плотно развивающаяся Quiescent	Развитие хрРТПХ после предшествующего периода контролируемой, неактивной или разрешившейся оРТПХ (независимо от срока после ТГСК) Development of cGVHD after a period of aGVHD control, inactivity or resolution (irrelevant to time post HSCT)
Прогрессирующая Progressive	Первый эпизод хрРТПХ при персистенции признаков оРТПХ (всегда – синдром «перекреста») First episode of cGVHD while aGVHD symptoms are still active (always "overlap" syndrome)
«Синдром перекреста» "Overlap" syndrome	Прогрессирующая хрРТПХ + все варианты сочетаний оРТПХ и хрРТПХ Progressive cGVHD + all combinations of aGVHD and cGVHD
В зависимости от ответа на терапию ГКС According to response to glucocorticoid treatment	
Рефрактерность (резистентность) к ГКС Refractoriness (resistance) to glucocorticoid treatment	Прогрессия хрРТПХ на дозе преднизолона ≥ 1 мг/кг/сут на протяжении 1–2 нед или стабильные проявления хрРТПХ на дозе преднизолона $\geq 0,5$ мг/кг/сут (или 1 мг/кг через день) на протяжении 1–2 мес cGVHD progression while on prednisone at a dose ≥ 1 mg/kg/day for 1–2 weeks or stable cGVHD disease while on prednisone at a dose ≥ 0.5 mg/kg/day (or 1 mg/kg every other day) for 1–2 months
Зависимость от ГКС Glucocorticoid dependence	Невозможность снизить дозу $< 0,25$ мг/кг/сут (или 0,5 мг/кг через день) на протяжении 2 попыток в течение минимум 8 нед Inability to taper prednisone < 0.25 mg/kg/day (or > 0.5 mg/kg every other day) in at least two attempts separated by at least 8 weeks
Непереносимость ГКС Glucocorticoid intolerance	Выраженная токсичность ГКС (инфекции, аваскулярные некрозы, артериальная гипертензия, диабет, миопатия, остеопороз и т. д.) Marked toxicity associated with glucocorticoid treatment (infections, avascular necrosis, arterial hypertension, diabetes mellitus, myopathy, osteoporosis, etc.)

Notes. IST – immunosuppressive treatment; aGVHD – acute graft-versus-host disease; HSCT – hematopoietic stem cell transplantation.

Таблица 2
Клинические критерии хрРТПХ (адаптировано из А.Н. Filipovich и соавт., 2005 [15])

Tables 2
Clinical criteria of cGVHD (adapted from A.H. Filipovich et al., 2005 [15])

Критерии Criteria	Локализация Site	Признаки Features
Диагностические – достаточно одного симптома для диагноза Diagnostic: one sign or symptom is sufficient to establish the diagnosis	Кожные покровы Skin	Лихеноиды, пойкилодерма, склеродермия Lichenoides, poikiloderma, scleroderma
	Слизистые оболочки Mucosa	Лихеноиды в полости рта, на слизистых оболочках половых путей, рубцевание влагалища или уретры Lichenoides involving oral and genital mucosa, vaginal or urethral scarring
	Желудочно-кишечный тракт Gastrointestinal tract	Стриктуры пищевода Esophageal strictures
	Легкие Lungs	Облитерирующий бронхиолит Bronchiolitis obliterans
	Опорно-двигательный аппарат Musculoskeletal system	Фасциит, контрактуры суставов вследствие склероза Fasciitis, joint contractures secondary to sclerosis
Отличительные – необходим один симптом + подтверждение (гистология, МСКТ, биохимические маркеры) Distinctive: one sign or symptom + diagnosis confirmed by histology, MSCT, biochemical markers	Кожа и ее придатки Skin and its appendages	Депигментация, шелушение, ониходистрофия, лизис пластинок, алопеция, себорея Depigmentation, desquamation, onychodystrophy, onycholysis, alopecia, seborrhea
	Полость рта Mouth	Сухость, мукоцеле, атрофия, язвы Dryness, mucoceles, mucosal atrophy, ulcers
	Глаза Eyes	Сухость, зуд, конъюнктивит, кератопатия Dry, gritty eyes, conjunctivitis, keratopathy
	Гениталии Genitalia	Эрозии, трещины, язвы Erosions, fissures, ulcers
	Легкие Lungs	Бронхиолит по данным МСКТ Bronchiolitis diagnosed with MSCT
	Мышцы Muscles	Миозит, слабость Myositis, weakness
Другие и общие – вспомогательная роль в постановке диагноза Other and common features: an additional role in diagnosis	Кожа Skin	Нарушение потоотделения, кератоз, эритема, зуд, изменение волос: истончение, поседение Sweat impairment, keratosis, erythema, pruritus, hair changes: thinning, graying
	Глаза Eyes	Фотофобия, блефарит, периорбитальная гиперпигментация Photophobia, blepharitis, periorbital hyperpigmentation
	Желудочно-кишечный тракт Gastrointestinal tract	Ферментативная недостаточность, потеря веса, анорексия, тошнота, диарея Enzyme insufficiency, weight loss, anorexia, nausea, diarrhea
	Печень Liver	Повышение общего билирубина, щелочной фосфатазы, трансаминаз в 2 раза и более Elevation of total bilirubin, alkaline phosphatase and transaminases $\geq 2 \times$ upper limit of normal
	Легкие Lungs	Интерстициальная пневмония, рестриктивные нарушения Interstitial pneumonia, restrictive abnormalities
	Мышцы Muscles	Судороги, артралгии и артриты Muscle cramps, arthralgia, arthritis
	Гемопозз Hematopoietic system	Тромбоцитопения, эозинофилия, лимфопения, аутоантитела Thrombocytopenia, eosinophilia, lymphopenia, autoantibodies
	Другие Other	Выпоты в полости, периферическая нейропатия, нефротический синдром, миастения, кардиомиопатия Effusions, peripheral neuropathy, nephrotic syndrome, myasthenia gravis, cardiomyopathy

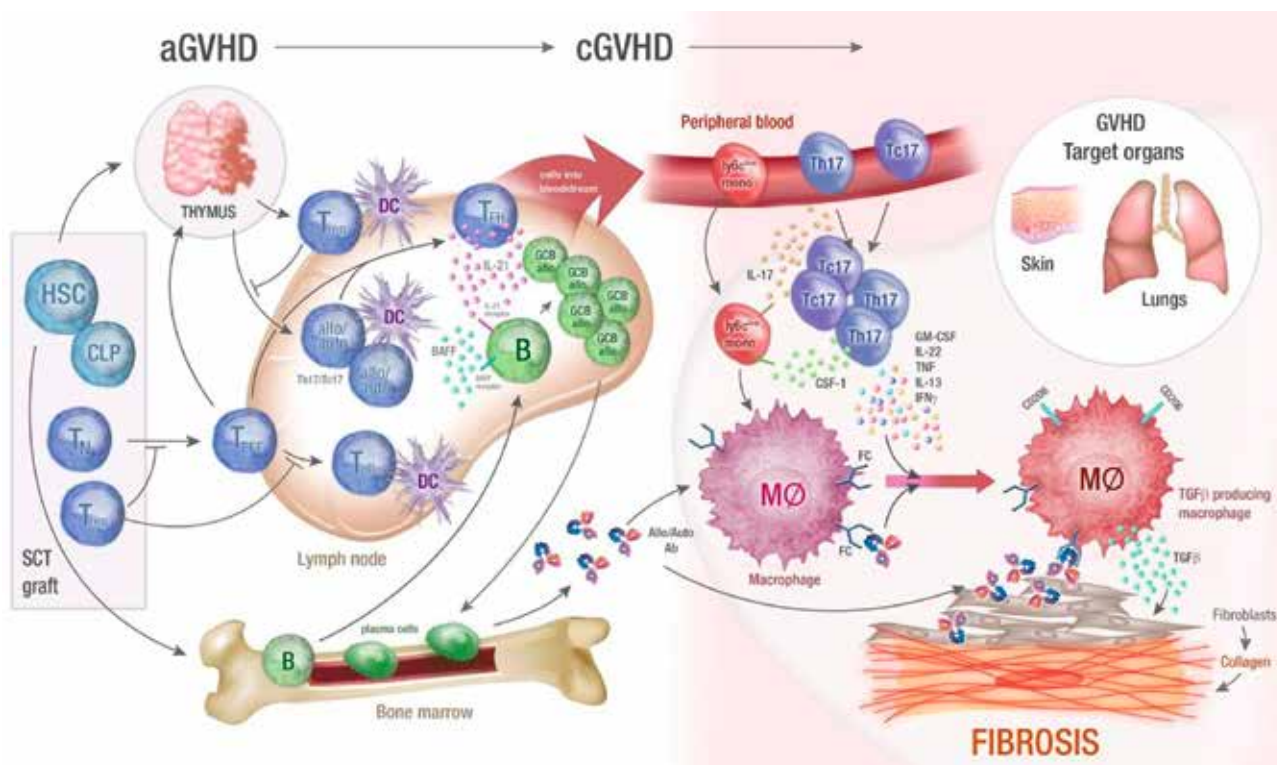
Примечание. МСКТ – мультиспиральная компьютерная томография.
Note. MSCT – multislice computed tomography.

Рисунок 1
Клинические проявления хрРТПХ (из архива автора): А – склеродермия с исходом в контрактуры; Б – лейкоплакия; В – «синдром перекреста»; Г – диспигментация

Figure 1
Clinical manifestations of cGVHD (from the author's archive): А – scleroderma leading to contractures; Б – leukoplakia; В – “overlap” syndrome; Г – dyspigmentation



Figure 2
A schematic representation of the cellular and molecular mediators contributing to aGVHD and cGVHD pathogenesis [16]



ционирования, а также развития воспаления с высвобождением провоспалительных цитокинов (TNF- α , интерлейкина (IL)-6 и IL-1). Эти цитокины совместно с антигенами, образующимися в результате разрушения тканей и микробного биоценоза кишечника, приводят к активации антигенпрезентирующих клеток. Активированные антигенпрезентирующие клетки стимулируют наивные Т-клетки донора и способствуют дифференцировке Т-лимфоцитов-хелперов, цитотоксических Т-лимфоцитов (Th1/Tc1 – ранние цитотоксические эффекторы в коже и слизистых оболочках), Т-лимфоцитов, вызывающих повреждение тканей и развитие фиброза (Th17/Tc17), а также приводят к экспансии эффекторных Т-клеток, которые опосредуют РТПХ в тканях, включая тимус, периферические лимфоидные органы, так же как и кожу, печень, кишечник, легкие [17, 18]. Повреждение тимуса и нарушение презентации антигенов донора в периферических тканях приводит к патологической активации и дифференцировке Т- и В-лимфоцитов, которые совместно производят клетки, секретирующие антитела. Дисфункция тимуса способствует формированию аутореактивных и аллореактивных Т-клеток. Главным медиатором и предиктором патологических изменений, особенно в коже, является IL-17 [19], а реализация нарушений происходит за счет деятельности В-клеток [20]. В-лимфоциты реагируют против

антигенов реципиента и донора, вырабатывают алло-антитела (к полиморфным антигенам реципиента) и аутоантитела (к неполоморфным антигенам, общим для реципиента и донора). Аллоантитела совместно с донорскими макрофагами приводят к формированию в тканях окружения, богатого трансформирующим фактором роста- β , что ведет к развитию склеродермы и облитерирующего бронхиолита (диагностические проявления хрРТПХ) [21]. Аутоантитела играют основную роль в развитии фиброза путем индукции фосфорилирования тирозина, аккумуляции активированного кислорода, стимуляции экспрессии гена коллагена I типа. Привлечение макрофагов в ткани осуществляется за счет IL-17, который стимулирует адгезию моноцитов и активирует провоспалительную транскриптом у макрофагов [22]. Для подавления патологических иммунных ответов необходимо присутствие регуляторных Т-клеток (T_{reg}), мигрировавших из герминативных центров (фолликулярные T_{reg}). Нарушение количества и функций T_{reg} приводит к развитию аутоиммунных заболеваний. хрРТПХ ассоциирована со сниженным количеством циркулирующих T_{reg} [23].

Профилактика и лечение хронической реакции «трансплантат против хозяина»

Основные эффективные методы профилактики РТПХ, согласно рандомизированным исследованиям,

представлены в *таблице 3*. Они подтверждают, что запуск данного осложнения происходит на этапе кондиционирования и ТГСК, поэтому способы профилактики оРТПХ и хрРТПХ едины.

В настоящее время эффективным в профилактике хрРТПХ признано использование антител к Т-клеткам в кондиционировании (антитимоцитарный глобулин или алемтузумаб) [24, 25], а также назначение высоких доз циклофосфида на 3-й и 4-й дни после ТГСК [26, 27]. Последний способ позволяет достичь минимальных цифр развития хрРТПХ – 10–15% [28].

Для оптимального результата в лечении хрРТПХ необходимо как можно более раннее начало терапии, поэтому пациенты из групп риска развития хрРТПХ должны подлежать проактивному наблюдению, начиная с момента 100 дней после ТГСК и не реже 1 раза в 3 мес далее в течение минимум 2 лет, при этом обращают внимание на минимальные изменения со стороны различных органов и систем: кожи и ее придатков, слизистых глаз и полости рта, желудочно-кишечного тракта, легких, гениталий, объема движения в суставах, изменений в анализах крови. Согласно Консенсусу ВОЗ, степень тяжести хрРТПХ зависит от выраженности поражения каждого органа/системы (оценивается в баллах от 0 до 3), различают легкую, умеренную и тяжелую степени [15]. К ранним признакам хрРТПХ могут относиться боли в мышцах, зуд кожи, светобоязнь, эозинофилия в гемограмме, снижение дыхательных объемов при спирометрии.

Задачей лечения хрРТПХ, как и любого хронического заболевания, является достижение улучшения состояния пациента путем уменьшения выраженности симптомов, контроля над активностью заболевания, а

также предупреждение развития необратимых изменений и инвалидизации, минимизирование токсических эффектов терапии. Дальнесрочной задачей является создание иммунологической толерантности, позволяющей отменить ИСТ без риска возврата симптомов. В лечении должна участвовать целая команда: врач-трансплантолог, смежные специалисты, медицинские сестры, пациент и его семья, нутрициологи, психологи, реабилитологи, социальные работники [29].

Критерии для начала системной терапии хронической реакции «трансплантат против хозяина»

Критерии для начала системной терапии хрРТПХ определены Консенсусом ВОЗ и включают в себя оценку поражения > 2 баллов в 1 органе, вовлечение 3 органов и более, любое вовлечение легких, умеренную хрРТПХ с факторами высокого риска (количество тромбоцитов < 100 тыс/мл, гипербилирубинемия, применение иммуносупрессантов на момент развития хрРТПХ) [15, 12]. Минимальная продолжительность лечения должна составлять 1 год. Легкие лимитированные формы хрРТПХ лечатся назначением топических препаратов (ингаляционные кортикостероиды). Топические препараты всегда добавляют к системной терапии [30].

Оценка ответа хрРТПХ на терапию осуществляется согласно критериям ВОЗ 2014 г. с учетом балльной системы (полный ответ, частичный ответ, стабилизация, прогрессирование) [31].

Общим подходом в настоящее время является назначение ингибиторов кальциневрина в комбинации с преднизолоном в инициальной дозе 1 мг/кг/сут [30, 32]. В такой дозе ГКС продолжают применять минимум 2 нед с последующим постепенным

Таблица 3
Профилактика РТПХ [14]

Tables 3
GVHD prophylaxis [14]

Профилактика Prophylaxis	Результат Result
Ингибиторы кальциневрина + метотексат/микофенолата мофетил (стандартная схема) Calcineurin inhibitors + methotrexate/mycophenolate mofetil (a standard regimen)	Снижение риска развития оРТПХ и хрРТПХ Reduced risk for aGVHD and cGVHD
Добавление рапамицина к стандартной схеме The addition of rapamycin to the standard regimen	Снижение риска развития только оРТПХ Reduced risk for aGVHD only
Посттрансплантационный циклофосфамид (дни +3, +4) Post-transplant cyclophosphamide (days +3, +4)	Снижение риска развития оРТПХ и хрРТПХ Reduced risk for aGVHD and cGVHD
Т-клеточная деплеция с помощью антитимоцитарного глобулина T-cell depletion by antithymocyte globulin	Снижение риска развития оРТПХ и хрРТПХ (но увеличение риска инфекций и рецидивов) Reduced risk for aGVHD and cGVHD (but a higher risk for infection and relapse)
Т-клеточная деплеция с помощью алемтузумаба T-cell depletion by alemtuzumab	Снижение риска развития оРТПХ и хрРТПХ (но увеличение риска инфекций и рецидивов) Reduced risk for aGVHD and cGVHD (but a higher risk for infection and relapse)
TCRαβ/CD19-деплеция TCRαβ/CD19 depletion	Снижение риска развития оРТПХ и хрРТПХ Reduced risk for aGVHD and cGVHD
Удаление наивных Т-лимфоцитов Removal of naive T cells	Снижение риска развития только хрРТПХ Reduced risk for cGVHD only
CD34-позитивная селекция с подсадкой T _{per} и обычных лимфоцитов CD34 positive selection with the add-back of T _{regs} and lymphocytes	Снижение риска развития оРТПХ и хрРТПХ Reduced risk for aGVHD and cGVHD

переходом (за 2–3 мес) на альтернирующую схему приема в дозе 0,3–0,5 мг/кг/сут по преднизолону через день. Альтернирующая схема приема ГКС позволяет устранить многие побочные эффекты. Одно из проспективных исследований рекомендует проводить снижение дозы ГКС до 0,2–0,25 мг/кг в день или 0,4–0,5 мг/кг через день и продолжить такую схему на протяжении 3 мес от момента начала терапии [32]. Желательно остановиться на минимальной дозе ГКС, достаточной для контроля над проявлениями РТПХ. После достижения эффекта от лечения (полный ответ или очень хороший частичный ответ) системная терапия сохраняется 3 мес, а далее происходит постепенная отмена препаратов, начинают с того лекарства, токсические эффекты которого наиболее выражены. Самые быстрые схемы предлагают снижение ГКС на 20–30% каждые 2 нед – чем ниже доза ГКС, тем медленнее должно происходить снижение. Каждая ступень снижения дозы ГКС должна осуществляться после тщательного физического осмотра пациента. Прием преднизолона может быть прекращен после минимум 4 нед терапии в дозе 0,1 мг/кг через день. У некоторых пациентов снижение даже таких низких доз может приводить к обострению процесса, в таком случае рекомендуется оставить лечение низкими дозами на протяжении года и более [33]. Таким образом, средняя длительность терапии хрРТПХ составляет от 2 до 3 лет. Главное за время формирования иммунной толерантности – предупреждение иммуноопосредованных реакций и инфекционных осложнений.

Около 50–60% пациентов требуют усиления ИСТ хрРТПХ на протяжении 2 лет от момента начала системного лечения [34, 35].

Показания к терапии второй линии

Показаниями к терапии второй линии являются ухудшение клинического состояния со стороны

пораженного органа, вовлечение в процесс нового органа, отсутствие улучшения после 1 мес терапии, невозможность снизить дозу преднизолона менее 1 мг/кг/сут в течение 2 мес лечения либо выраженная токсичность проводимой ранее терапии [30]. К сожалению, консенсуса по лечению второй линии не достигнуто, в большинстве случаев оно является эмпирическим. Выбор определяется опытом лечащего врача, риском токсических эффектов, учетом коморбидных состояний. Опираясь на существующие рандомизированные исследования, наиболее часто терапия включает в себя экстракорпоральный фотоферез, риксолитиниб, микофенолата мофетил, ритуксимаб, мезенхимальные стволовые клетки, рапамицин или иматиниб [36–39] (таблица 4).

Для преодоления стероид-резистентности и ухода от ГКС, что является основной современной задачей улучшения терапии хрРТПХ, применяют препараты и способы лечения с доказанной эффективностью (таблица 5).

Согласно Консенсусу ВОЗ по клиническим исследованиям, при хрРТПХ к 2020 г. показали эффективность новые агенты, позволяющие осуществлять терапию без использования ГКС или при минимизации их доз. В мультицентровых исследованиях II и III фаз изучали ибрутиниб (частичный ответ достигнут у 67% пациентов), риксолитиниб (отмечены лучшая доступность, минимальные побочные эффекты: миелотоксичность, риск цитомегаловирусной инфекции), итацитиниб, белумосудил (частичный ответ составляет 65%). Одобрены к широкому применению риксолитиниб, ибрутиниб, белумосудил [41].

Основной прогресс в лечении хрРТПХ за последние 30 лет был связан с улучшением сопроводительной терапии [42]. Соответствующими рабочими группами при ВОЗ созданы специальные руководства по ведению данных пациентов, включая лечение симптомов, рекомендации для больных, профи-

Таблица 4
Препараты, используемые в лечении хрРТПХ второй линии (адаптировано из Y. Inamoto и соавт., 2011 [40])

Tables 4
Agents used in secondary treatment for cGVHD (adapted from Y. Inamoto et al., 2011 [40])

Лечение Treatment	Общий ответ, % Overall response, %	Выживаемость, % Survival, %
Экстракорпоральный фотоферез Extracorporeal photopheresis	65–70	70–78 (к 1 году) 70–78/at 1 year
Ритуксимаб Rituximab	66–86	72 (к 1 году) 72/at 1 year
Иматиниб Imatinib	22–79	75–84 (к 1,5 года) 75–84/at 1.5 years
Пентостатин Pentostatin	53–56	34–60 (к 1–3 годам) 34–60/at 1 and 3 years
Мезенхимальные стволовые клетки Mesenchymal stem cells	50–74	78 (к 2 годам) 78/at 2 years
Микофенолата мофетил Mycophenolate mofetil	26–64	67–96 (к 1 году) 67–96/at 1 year
Рапамицин Rapamycin	76	72 (к 3 годам) 72%/at 3 years
IL-2	52	Нет данных No data

Таблица 5

Способы преодоления стероид-резистентности в лечении хрРТПХ [2, 14]

Tables 5

Ways to cope with steroid refractoriness in the treatment of cGVHD [2, 14]

Метод/препарат Treatment modality/agent	Механизм Mechanism	Автор/исследование Author/study
Экстракорпоральный фотоферез Extracorporeal photopheresis	Воспитание иммунной толерантности Immune tolerance development	G. Oarbeascoa, BBMT 2020
Мезенхимальные стволовые клетки Mesenchymal stem cells	Снижение степени выраженности хрРТПХ A decrease in the severity of cGVHD	S. Fisher, 2019
Руксолитиниб Ruxolitinib	Ингибиторы JAK1/2 JAK1/2 inhibitors	REACH3, R. Zeiser, 2020
Ритуксимаб Rituximab	Анти-CD20 Targeting against CD20	S.R. Solomon, BMT 2019
Ибрутиниб Ibrutinib	Ингибиторы тирозинкиназ Tyrosine kinase inhibitors	IINTEGRATE phase 3, D. Miklos, et al., Blood 2017
Белумосудил Belumosudil	Ингибитор ROCK2 ROCK2 inhibitor	Исследование KD025-208 KD025-208 study
Абатацепт Abatacept	Ингибирование Т-клеточной коstimуляции Inhibition of T cell co-stimulation	A. Ngwube, Ther Adv Hematol 2023
Ведолизумаб Vedolizumab	Блокирование миграции лейкоцитов в слизистую оболочку кишки Blockade of leukocyte migration to the intestinal mucosa	Исследование NCT02728895, 2019 NCT02728895 study, 2019

лактические мероприятия и должный мониторинг. Особое внимание уделено топической терапии, что представлено в рекомендациях [43]. Таблицы с рекомендациями по сопроводительной терапии можно найти в нашей предыдущей публикации [29]. Вследствие своей сложности лечение хрРТПХ обязательно требует мультидисциплинарного подхода.

Около 50% пациентов выздоравливают спустя 7 лет от начала проведения системной терапии, что проявляется исчезновением или стабилизацией симптомов и возможностью отмены ИСТ. Приблизительно 10% продолжают системное лечение еще около 7 лет, оставшиеся 40% имеют рецидивы основного заболевания или умирают вследствие хрРТПХ, сопутствующих инфекций и токсичности терапии [44]. Средняя длительность системного лечения хрРТПХ составляет около 2 лет после трансплантации костного мозга и около 3,5 лет после трансплантации стволовых клеток периферической крови. Выживаемость детей с хрРТПХ выше, чем таковая у взрослых, однако исследований долгосрочного прогноза в детской популяции недостаточно.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

хрРТПХ остается ведущим осложнением аллогенной ТГСК, определяющим поражение множе-

ства органов и систем. Для эффективного лечения данного осложнения чрезвычайно важно проведение регулярного мониторинга пациентов после аллогенной ТГСК, раннее выявление симптомов хрРТПХ, тщательный подбор терапии, наблюдение за больными на фоне терапии в целях индивидуализации лечения и минимизации побочных эффектов. Лечение хрРТПХ – многолетний кропотливый процесс, в котором должны участвовать как трансплантологи, так и врачи по месту жительства, смежные специалисты, пациент и его семья. Большую помощь и поддержку способны оказать реабилитационные и социальные структуры. Успеха в лечении хрРТПХ можно достичь лишь при слаженной командной работе всех специалистов, а также при условии терпения и исполнительности со стороны больного и поддерживающих его близких.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Не указан.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

ORCID

Skvortsova Yu.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0566-053X>

Литература / References

1. Zeiser R., Blazar B.R. Acute graft-versus-host disease Biology, Prevention and Therapy. New Engl J Med 2017; 377 (22): 2167–79.
2. Zeiser R., Fatoum H., Hashmi S.K. A personalized, organ-based approach to the treatment of chronic steroid-refractory graft-versus-host disease. Blood Rev 2024; 63: 101142.
3. Bachier C.R., Aggarwal S.K., Heneghan K., Milgroom A., Francis K., Dehipawala S., Rotta M. Epidemiology and treatment of chronic graft-versus-host disease post-allogeneic hematopoietic cell transplantation: a US claims analysis. Transpl Cell Ther 2021; 27 (6): 504.e1–6.

4. Wingard J.R., Majhail N.S., Brazauskas R., Wang Z., Sobocinski K.A., Jacobsohn D., et al. Long-term survival and late deaths after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *J Clin Oncol* 2011; 29 (16): 2230–9.
5. Bhatia S., Francisco L., Carter A., Sun C.-L., Scott Baker K., Gurney J.G., et al. Late mortality after allogeneic hematopoietic cell transplantation and functional status of long-term survivors: report from the bone marrow transplant survivor study. *Blood* 2007; 110 (10): 3784–92.
6. DeFilipp Z., Alousi A.M., Pidala J.A., Carpenter P.A., Onstad L.E., Arai S., et al. Nonrelapse mortality among patients diagnosed with chronic GVHD: an updated analysis from the chronic GVHD consortium. *Blood Adv* 2021; 5 (20): 4278–84.
7. Majhail N.S., Brazauskas R., Rizzo J.D., Sobeck R.M., Wang Z., Horowitz M.M., et al. Secondary solid cancers after allogeneic hematopoietic cell transplantation using busulfan-cyclophosphamide conditioning. *Blood* 2011; 117 (1): 316–22.
8. Armenian S.H., Chemaitilly W., Chen M., Chow E.J., Duncan C.N., Jones L.W., et al. National Institutes of Health hematopoietic cell transplantation late effects initiative: the cardiovascular disease and associated risk factors working group report. *Biology of blood and marrow transplantation. J Am Soc Blood Marrow Transplant* 2017; 23 (2): 201–10.
9. Arai S., Arora M., Wang T., Spellman S.R., He W., Couriel D.R., et al. Increasing incidence of chronic graft-versus-host disease in allogeneic transplantation: a report from the Center for International Blood and Marrow Transplant Research. *Biology of blood and marrow transplantation. J Am Soc Blood Marrow Transplant* 2015; 21 (2): 266–74.
10. Inamoto Y., Storer B.E., Petersdorf E.W., Nelson J.L., Lee S.J., Carpenter P.A., et al. Incidence, risk factors, and outcomes of sclerosis in patients with chronic graft-versus-host disease. *Blood* 2013; 121 (25): 5098–103.
11. Rodriguez-Gil A., Carrillo-Cruz E., Marrero-Cepeda C., Rodriguez G., Perez-Simon J.A. Effect of vitamin D on graft-versus-host disease. *Bio-medicines* 2022; 10 (5): 987.
12. Jagasia M.H., Greinix H.T., Arora M., Williams K.M., Wolff D., Cowen E.W., et al. National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease: I. The 2014 Diagnosis and Staging Working Group report. *Biol Blood Marrow Transplant* 2015; 21 (3): 389–401.
13. Pidala J., Vogelsang G., Martin P., Chai X., Storer B., Pavletic S., et al. Overlap subtype of chronic graft-versus-host disease is associated with an adverse prognosis, functional impairment, and inferior patient-reported outcomes: a Chronic Graft-versus-Host Disease Consortium study. *Haematologica* 2012; 97 (3): 451–8.
14. Schoemans H.M., Lee S.J., Ferrara J.L., Wolff D., Levine J.E., Schult K.R., et al.; EBMT (European Society for Blood and Marrow Transplantation) Transplant Complications Working Party and the “EBMT-NIH (National Institutes of Health) – CIBMTR (Center for International Blood and Marrow Transplant Research) GvHD Task Force. EBMT-NIH-CIBMTR Task Force position statement on standardized terminology & guidance for graft-versus-host disease assessment. *Bone Marrow Transplant* 2018; 53 (11): 1401–15.
15. Filipovich A.H., Weisdorf D., Pavletic S., Socie G., Wingard J.R., Lee S.J., et al. National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. Diagnosis and staging working group report. *Biol Blood Marrow Transplant* 2005; 11 (12): 945–56.
16. MacDonald K.P., Hill G.R., Blazar B.R. Chronic graft-versus-host disease: biological insights from preclinical and clinical studies. *Blood* 2017; 129 (1): 13–21.
17. Yi T., Chen Y., Wang L., Du G., Huang D., Zhao D., et al. Reciprocal differentiation and tissue-specific pathogenesis of Th1, Th2, and Th17 cells in graft-versus-host disease. *Blood* 2009; 114 (14): 3101–12.
18. Carlson M.J., West M.L., Coghill J.M., Panoskaltsis-Mortari A., Blazar B.R., Serody J.S. *In vitro*-differentiated TH17 cells mediate lethal acute graft-versus-host disease with severe cutaneous and pulmonary pathologic manifestations. *Blood* 2009; 113 (6): 1365–74.
19. Serody J.S., Hill G.R. The IL-17 differentiation pathway and its role in transplant outcome. *Biol Blood Marrow Transplant* 2012; 18 (1 Suppl): S56–61.
20. Jin H., Ni X., Deng R., Song Q., Young J., Cassady K., et al. Antibodies from donor B cells perpetuate cutaneous chronic graft-versus-host disease in mice. *Blood* 2016; 127 (18): 2249–60.
21. Alexander K.A., Flynn R., Lineburg K.E., Kuns R.D., Teal B.E., Olver S.D., et al. CSF-1-dependant donor-derived macrophages mediate chronic graft-versus-host disease. *J Clin Invest* 2014; 124 (10): 4266–80.
22. Erbel C., Akhavanpoor M., Okuyucu D., Wangler S., Dietz A., Zhao L., et al. IL-17A influences essential functions of the monocyte/macrophage lineage and is involved in advanced murine and human atherosclerosis. *J Immunol* 2014; 193 (9): 4344–55.
23. Zorn E., Kim H.T., Lee S.J., Floyd B.H., Litsa D., Arumugaraiah S., et al. Reduced frequency of FOXP3+ CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with chronic graft-versus-host disease. *Blood* 2005; 106 (8): 2903–11.
24. Soiffer R.J., Lerademacher J., Ho V., Kan F., Artz A., Champlin R.E., et al. Impact of immune modulation with anti-T-cell antibodies on the outcome of reduced-intensity allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for hematologic malignancies. *Blood* 2011; 117 (25): 6963–70.
25. Devine S.M., Carter S., Soiffer R.J., Pasquini M.C., Hari P.N., Stein A., et al. Low risk of chronic graft-versus-host disease and relapse associated with T cell-depleted peripheral blood stem cell transplantation for acute myelogenous leukemia in first remission: results of the blood and marrow transplant clinical trials network protocol 0303. *Biol Blood Marrow Transplant* 2011; 17 (9): 1343–51.

26. Luznik L., Bolaños-Meade J., Zahurak M., Chen A.R., Smith B.D., Brodsky R., et al. High-dose cyclophosphamide as single-agent, short-course prophylaxis of graft-versus-host disease. *Blood* 2010; 115 (16): 3224–30.
27. Raj K., Pagliuca A., Bradstock K., Noriega V., Potter V., Streetly M., et al. Peripheral blood hematopoietic stem cells for transplantation of hematological diseases from related, haploidentical donors after reduced-intensity conditioning. *Biol Blood Marrow Transplant* 2014; 20 (6): 890–5.
28. Kitko C.L. National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease: IIa. The 2020 Clinical Implementation and Early Diagnosis Working Group Report *Transplant Cell Ther* 2021; 27 (7): 545–57.
29. Скворцова Ю.В., Новичкова Г.А., Масчан А.А. Новое в патогенезе, диагностике и лечении хронической реакции «трансплантат против хозяина» после аллогенной ТГСК. *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии* 2018; 17 (2): 121–35. DOI: 10.24287/1726-1708-2018-17-2-121-135 [Skvortsova Yu.V., Novichkova G.A., Maschan A.A. New advances in pathogenesis, diagnostic and treatment of chronic graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology* 2018; 17 (2): 121–35. (In Russ.)].
30. Wolff D., Schleuning M., von Harsdorf S., Bacher U., Gerbitz A., Stadler M., et al. Consensus Conference on Clinical Practice in Chronic GVHD: Second-Line Treatment of Chronic Graft-versus-Host Disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 2011; 17 (1): 1–17.
31. Carpenter P.A., Kitko C.L., Elad S., Flowers M.E., Gea-Banacloche J.C., Halter J.P., et al. National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease: V. The 2014 Ancillary Therapy and Supportive Care Working Group Report. *Biol Blood Marrow Transplant* 2015; 21 (7): 1167–87.
32. Martin P.J., Inamoto Y., Carpenter P.A., Lee S.J., Flowers M.E. Treatment of chronic graft-versus-host disease: Past, present and future. *Korean J Hematol* 2011; 46 (3): 153–63.
33. Flowers M.E., Martin P.J. How we treat chronic graft-versus-host disease. *Blood* 2015; 125 (4): 606–15.
34. Flowers M.E., Storer B., Carpenter P., Rezvani A.R., Vigorito A.C., Campregher P.V., et al. Treatment change as a predictor of outcome among patients with classic chronic graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 2008; 14 (12): 1380–4.
35. Inamoto Y., Flowers M.E., Sandmaier B.M., Aki S.Z., Carpenter P.A., Lee S.J., et al. Failure-free survival after initial systemic treatment of chronic graft-versus-host disease. *Blood* 2014; 124 (8): 1363–71.
36. Greinix H.T., Worel N., Just U., Knobler R. Extracorporeal photopheresis in acute and chronic graft-versus-host disease. *Transfus Apher Sci* 2014; 50 (3): 349–57.
37. Flowers M.E., Apperley J.F., van Besien K., Elmaagacli A., Grigg A., Reddy V., et al. A multicenter prospective phase 2 randomized study of extracorporeal photopheresis for treatment of chronic graft-versus-host disease. *Blood* 2008; 112 (7): 2667–74.
38. Olivieri A., Cimminiello M., Corradini P., Mordini N., Fedele R., Selleri C., et al. Long-term outcome and prospective validation of NIH response criteria in 39 patients receiving imatinib for steroid-refractory chronic GVHD. *Blood* 2013; 122 (25): 4111–8.
39. de Masson A., Bouaziz J.D., Pefault de Latour R., Wittnebel S., Ribaud P., Rubio M.T., et al. Limited efficacy and tolerance of imatinib mesylate in steroid-refractory sclerodermatous chronic GVHD. *Blood* 2012; 120 (25): 5089–90.
40. Inamoto Y., Flowers M.E. Treatment of chronic graft-versus-host disease in 2011. *Curr Opin Hematol* 2011; 18 (6): 414–20.
41. Penack O., Marchetti M., Ruutu T., Aljurf M., Bacigalupo A., Bonifazi F., et al. Prophylaxis and management of graft versus host disease after stem-cell transplantation for haematological malignancies: updated consensus recommendations of the European Society for Blood and Marrow Transplantation *Lancet Haematol* 2020; 7 (2): e157–67.
42. Couriel D., Carpenter P.A., Cutler C., Bolaños-Meade J., Treister N.S., Gea-Banacloche J., et al. Ancillary therapy and supportive care of chronic graft-versus-host disease: national institutes of health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic Graft-versus-host disease: V. Ancillary Therapy and Supportive Care Working Group Report. *Biol Blood Marrow Transplant* 2006; 12 (4): 375–96.
43. [Electronic resource] URL: <http://asbmt.affiniscape.com/associations/11741/files/DispensaryGuidelines.pdf> (accessed 03.06.2020).
44. Vigorito A.C., Campregher P.V., Storer B.E., Carpenter P.A., Moravec C.K., Kiem H.P., et al. Evaluation of NIH consensus criteria for classification of late acute and chronic GVHD. *Blood* 2009; 114 (3): 702–8.

© 2024 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России
Поступила 13.03.2024
Принята к печати 08.05.2024



EDN: RBBIPC

Контактная информация:

Базаев Александр Альбертович,
врач-педиатр отделения трансплантации
гемопозитических стволовых клеток №2
ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева»
Минздрава России
Адрес: 117997, Москва,
ул. Саморы Машела, 1
E-mail: bzvalxndr@mail.ru

DOI: 10.24287/1726-1708-2024-23-2-168-173

Опыт проведения аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток у пациента с гипер-IgE-синдромом

А.А. Базаев, С.Н. Козловская, А.П. Васильева, Ю.В. Скворцова, Д.Н. Балашов

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, Москва

Классический гипер-IgE-синдром (вследствие мутации гена *STAT3*) – это первичный иммунодефицит, сочетающийся с мультисистемным поражением органов и тканей. К настоящему времени известно лишь о нескольких опубликованных случаях проведения трансплантации гемопоэтических стволовых клеток при данном заболевании, что не позволяет в полной мере судить об основных эффектах трансплантации в этой группе пациентов. В данной работе представлено описание клинического случая проведения трансплантации гемопоэтических стволовых клеток от неродственного донора с TCR $\alpha\beta$ /CD19-деплецией у пациента с гипер-IgE-синдромом, выполненной в ФГБУ НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева. Родители пациента дали согласие на использование информации, в том числе фотографий ребенка, в научных исследованиях и публикациях. Через 5 лет после проведенной терапии у пациента наблюдается хорошая функция трансплантата, отсутствуют признаки иммунодефицита и сохраняется удовлетворительный контроль инфекционных осложнений. Тем не менее, несмотря на сопроводительную терапию бисфосфонатами и отсутствие признаков остеопении по данным денситометрического исследования, у пациента сохраняются нарушения опорно-двигательного аппарата, сопровождающиеся спонтанными переломами трубчатых костей и тяжелыми суставными деформациями.

Ключевые слова: гипер-IgE-синдром, первичный иммунодефицит, мультисистемное поражение, трансплантация гемопоэтических стволовых клеток

Базаев А.А. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2024; 23 (2): 168–73.
DOI: 10.24287/1726-1708-2024-23-2-168-173

A case of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in a patient with hyper-IgE syndrome

A.A. Bazaev, S.N. Kozlovskaya, A.P. Vasilyeva, Yu.V. Skvortsova, D.N. Balashov

The Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology of Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow

Classic hyper-IgE syndrome (due to a mutation in the *STAT3* gene) is a primary immunodeficiency associated with multisystem disorder affecting organs and tissues. To date, there are only few published cases of hematopoietic stem cell transplantation for this disease, which does not allow us to fully assess the main effects of transplantation in this group of patients. This article presents a clinical case of hematopoietic stem cell transplantation from an unrelated donor with TCR $\alpha\beta$ /CD19 depletion in a patient with hyper-IgE syndrome, which was carried out at the Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology. The patient's parents gave consent to the use of their child's data, including photographs, for research purposes and in publications. At 5 years after treatment, the patient has a good graft function and no signs of immunodeficiency, and infectious complications remain controlled. However, despite accompanying bisphosphonate therapy and the absence of osteopenia signs according to densitometry, the patient still has musculoskeletal disorders, associated with spontaneous long bone fractures and severe joint deformities.

Key words: hyper-IgE syndrome, primary immunodeficiency, multisystem disorder, hematopoietic stem cell transplantation

Bazaev A.A., et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology 2024; 23 (2): 168–73.
DOI: 10.24287/1726-1708-2024-23-2-168-173

Аутосомно-доминантный, или классический, гипер-IgE-синдром (или синдром Иова), развивающийся вследствие мутации с потерей функции в гене *STAT3*, представляет собой первичный иммунодефицит (ПИД), для которого характерен симптомокомплекс мультисистемного поражения: частые тяжелые инфекционные процессы, экзема, аномалии развития костной и соединительной тканей, аномалии строения лицевого скелета, а также выраженное повышение концентрации сывороточного иммуноглобулина E (IgE) [1].

Инфекционные осложнения при гипер-IgE-синдроме представлены преимущественно поражением

верхних и нижних дыхательных путей, кожи и подкожно-жировой клетчатки грибковой или бактериальной этиологии и нередко носят затяжной или рецидивирующий характер [2]. Несмотря на сопроводительную терапию, включающую современные подходы к профилактике и лечению инфекционных осложнений, средняя продолжительность жизни пациентов с гипер-IgE-синдромом обычно не превышает 40 лет, а у большинства пациентов и 20 лет [2–5]. Одной из наиболее серьезных жизнеугрожающих инфекционных проблем в этой группе пациентов являются инфекции респираторного тракта, в частности инвазивные микозы.

В основе неинфекционных проблем у пациентов с гипер-IgE-синдромом, часто усложняющим контроль инфекционных осложнений, лежит патология соединительной ткани, что также обуславливает характерный фенотип лицевого скелета, кожную атопию с нарушением ее репаративных свойств, а также интерстициальные изменения легких и склонность к формированию постинфекционных изменений в виде бронхоэктаз и пневматоцеле. Кроме того, характерными проявлениями гипер-IgE-синдрома являются нарушения опорно-двигательного аппарата, такие как остеопения и склонность к переломам трубчатых костей при минимальной травме, сколиоз, дегенеративные изменения суставов и их гипермобильность, недоразвитие или неправильная закладка зубов [6, 7].

Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) сегодня является широко используемой технологией лечения пациентов с тяжелыми формами ПИД [8]. Опыт ТГСК при гипер-IgE-синдроме на сегодняшний день существенно ограничен, а результаты не дают в полной мере оценить куративный эффект данной технологии на все основные проявления клинического фенотипа заболевания. Первый случай аллогенной ТГСК у ребенка с гипер-IgE-синдромом, опубликованный в 2000 г., сопровождался парциальным ответом на проведенное лечение с отсутствием нормализации сывороточного IgE и сохранением иммунных осложнений [9]. В то же время, по данным Т.А. Nester с соавт. [10], представивших результаты терапии взрослого пациента, в результате ТГСК были достигнуты нормализация иммунного статуса и контроль уровня IgE, однако пациент умер позднее на фоне прогрессирования фиброза легких вследствие ранее сформированных изменений на фоне тяжелого течения заболевания.

В недавно опубликованном исследовании S.C. Harrison и соавт. [11] представлены результаты долгосрочного наблюдения и продемонстрирована 100% выживаемость у 8 пациентов с гипер-IgE-синдромом после ТГСК. Важно отметить, что, несмотря на тяжелое течение бронхопневмоний до ТГСК у 6 пациентов, после трансплантации достигнуты хорошая положительная динамика со стороны легких и улучшение толерантности к физическим нагрузкам. Со стороны неиммунных проявлений гипер-IgE-синдрома отмечался разнонаправленный эффект. У 1 пациента сохранялась склонность к патологическим переломам, в 2 случаях отмечена прогрессия сколиоза, 1 больной перенес инфаркт миокарда в результате васкулопатии коронарной артерии.

В данной работе представлено описание клинического случая проведения ТГСК у пациента с гипер-IgE-синдромом в НИИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева и результаты 5-летнего катamnестического наблюдения. Родители пациента дали согласие на исполь-

зование информации, в том числе фотографий ребенка, в научных исследованиях и публикациях.

КЛИНИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ

У пациента К. с рождения отмечались рецидивирующие инфекционные эпизоды: везикулопупулез, «холодные» абсцессы стафилококкового генеза, фурункулез, осложнившийся септическим процессом. В 2 года случился перелом локтевой кости после минимальной травмы. При обследовании выявлено повышение уровня IgE до 1310 МЕ/мл (норма до 100 МЕ/мл) и заподозрен ПИД – гипер-IgE-синдром. Диагноз подтвержден молекулярно-генетическим исследованием, выявлена миссенс-мутация с.1144С>Т в гене *STAT3*. Несмотря на регулярную профилактическую терапию в объеме ципрофлоксацина, ко-тримоксазола, интраконазола и регулярную заместительную терапию внутривенным иммуноглобулином (ВВИГ), у ребенка сохранялись повторные инфекционные эпизоды: отит грибковой этиологии, бронхиты, рецидивирующие паронихии, периостит нижней челюсти. Более подробно клиническая картина заболевания у данного пациента представлена ранее в публикации А.К. Кантулаевой и соавт. [12].

В связи с тяжелым течением заболевания в возрасте 6 лет ребенку выполнена аллогенная ТГСК от неродственного 10/10 HLA-совместимого донора с TCR $\alpha\beta$ /CD19-деплецией трансплантата. Режим кондиционирования включал флударабин 150 мг/м² (с –6-го по –2-й дни), треосульфат 42 г/м² (с –5-го по –3-й дни), тиотепу 10 мг/кг (с –5-го по –4-й дни), тимоглобулин 5 мг/кг (с –5-го по –4-й дни), ритуксимаб 375 мг/м² (в –1-й день). Источником гемопоэтических стволовых клеток являлась периферическая кровь, метод процессинга – TCR $\alpha\beta$ /CD19-деплеция, клеточные характеристики трансплантата: NC 6,32 × 10⁸/кг, CD34⁺ 11,63 × 10⁶/кг, CD3⁺ 3,04 × 10⁸/кг, CD3⁺TCR $\alpha\beta$ ⁺ 0,63 × 10³/кг, CD19⁺ 0,07 × 10³/кг. Посттрансплантационная профилактика реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ) не проводилась. На +7-й день выполнена плановая инфузия донорских лимфоцитов памяти после CD3⁺CD45RA⁺-деплеции продукта в дозе по CD3⁺ 50 × 10³/кг.

Приживление трансплантата по гранулоцитарному и мегакариоцитарному росту зарегистрировано на +10-й день. На +30-й день определялся полный общий донорский химеризм в периферической крови с наличием 47% собственных клеток в CD3⁺-лимфоцитах. Ранний посттрансплантационный период протекал без особенностей, признаков течения РТПХ и тяжелых инфекций не отмечалось. Достижение полного донорского химеризма в

CD3⁺-лимфоцитах было зафиксировано на +180-й день после ТГСК.

По результатам контрольного обследования через 1 год после ТГСК отмечались удовлетворительная функция трансплантата, отсутствие признаков течения РТПХ, определялся полный донорский химеризм и удовлетворительные темпы иммунологической реконституции.

Через 1 год после ТГСК пациент перенес левосторонний отит (разрешился на фоне антибактериальной терапии), далее тяжелых инфекций не было. Через 4,5 года отмечался эпизод гнойного панариция, разрешившийся после хирургического лечения. Со стороны течения кожных поражений через 3,5 года после ТГСК наблюдалось длительное заживление везикуло-пустулезных элементов (вероятно, на фоне энтеровирусной инфекции) (рисунки 1). Помимо этого, у ребенка сохранялись ортодонтические проблемы в виде длительного прорезывания зубов с недоразвитой и поврежденной эмалью.

На протяжении 5 лет после ТГСК сохранялись проблемы опорно-двигательного аппарата. Через 10 мес после ТГСК перенес перелом 5-й плюсневой кости правой стопы, после чего была инициирована терапия золендроновой кислотой в дозе 1,5 мг 1 раз в 3 мес. Однако, несмотря на терапию бисфосфонатами и отсутствие данных за остеопению по результатам денситометрии, на сроке через 4,5 года после ТГСК на фоне минимальной травмы отмечался закрытый перелом костей правого предплечья со смещением (рисунки 2).

Рисунок 1

Везикуло-пустулезные элементы с длительным заживлением в исходе инфекции через 3,5 года после ТГСК

Figure 1

Vesiculopustular lesions with prolonged healing time that developed due to infection 3.5 years after hematopoietic stem cell transplantation (HSCT)



Помимо этого, у пациента отмечалась вальгусная деформация обоих коленных суставов, по поводу чего дважды проводилось хирургическое вмешательство в объеме гемизипифизидеза через 3 и 4 года после ТГСК. К сожалению, на момент последнего наблюдения снова зарегистрирована отрицательная динамика в виде повторной вальгусной деформации, в связи с чем планируется очередное хирургическое лечение (рисунки 3).

На момент последнего наблюдения через 5 лет после аллогенной ТГСК сохраняется удовлетворительная функция трансплантата с полным донорским химеризмом и нормальными лабораторными результатами исследования иммунного статуса (таблица), отсутствуют тяжелые инфекционные эпизоды, потребность в проведении противомикробной терапии и заместительной терапии ВВИГ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Гипер-IgE-синдром с мутацией в гене *STAT3* является тяжелым мультисистемным заболеванием. Мы представили клинический случай проведения ТГСК у ребенка с гипер-IgE-синдромом с мутацией в гене *STAT3*. По результатам 5-летнего наблюдения у пациента отсутствует симптомокомплекс иммунодефицитного состояния, что, безусловно, свидетельствует в пользу эффективности проведенной ТГСК для контроля иммунодефицита и ассоциированных осложнений. В то же время у ребенка сохраняются

Рисунок 2

Закрытый перелом костей правого предплечья со смещением через 4,5 года после ТГСК

Figure 2

Displaced closed fracture of the bones of the right forearm 4.5 years after HSCT



Рисунок 3
Вальгусная деформация нижних конечностей: А – состояние до коррекции через 3 года после ТГСК; Б – состояние после гемизипфизидеоза обоих коленных суставов через 4 года после ТГСК

Figure 3
A valgus deformity of the lower extremities: А – condition before correction 3 years after HSCT; Б – condition after hemiepiphyse-
sis of both knee joints 4 years after HSCT



Таблица
Значения субпопуляций лимфоцитов и сывороточных иммуноглобулинов у пациента до аллогенной ТГСК и
через 5 лет после нее

Tables
Values of lymphocyte and serum immunoglobulin subpopulations of the patient prior to allogeneic HSCT and 5 years after it

Показатель Parameter	До ТГСК Prior to HSCT	Нормальные значения (для возраста 3–4 года) Normal values (3–4 years of age)	5 лет после ТГСК 5 years after HSCT	Нормальные значения (для возраста 9–13 лет) Normal values (9–13 years of age)
CD3 (Т-лимфоциты), × 10 ⁹ /л CD3 (T cells), × 10 ⁹ /L	3,6	1,5–3,87	4,0	1,07–2,27
CD3/4 (Т-хелперы), × 10 ⁹ /л CD3/4 (T helper cells), × 10 ⁹ /L	2,1	0,88–2,36	2,12	0,64–1,29
CD3/8 (Т-цитотоксические клетки), × 10 ⁹ /л CD3/8 (cytotoxic T cells), × 10 ⁹ /L	1,5	0,4–1,28	1,76	0,38–0,88
CD19 (В-клетки), × 10 ⁹ /л CD19 (B cells), × 10 ⁹ /L	1	0,31–1,13	0,64	0,17–0,63
CD16 ⁺ 56 ⁺ (NK-клетки), × 10 ⁹ /л CD16 ⁺ 56 ⁺ (NK cells), × 10 ⁹ /L	0,1	0,15–0,81	0,31	0,17–0,53
IgA, г/л IgA, g/L	2,57	0,3–1,5	0,38	0,9–2,9
IgM, г/л IgM, g/L	2,4	0,8–1,6	0,82	0,6–2
IgG, г/л IgG, g/L	10,6	6,8–15,4	5,8	8,4–16,6
IgE, г/л IgE, g/L	18 800	0–100	354	0–100

тяжелые нарушения опорно-двигательного аппарата, являющиеся причиной инвалидизации со снижением качества жизни и объективной необходимостью в наблюдении травматолога-ортопеда и стоматолога, а также с потребностью в периодической хирургической коррекции патологических нарушений. Следует обратить внимание, что патологические переломы, а также деформации костей и суставов сохраня-

ются, несмотря на использование антирезорбтивной терапии и отсутствие патологических изменений при денситометрическом обследовании. Этот факт может быть аргументом для переосмысления вклада терапии бисфосфонатами в профилактику выше-
представленных нарушений после ТГСК у пациентов с гипер-IgE-синдромом без объективных признаков остеопении.

МНЕНИЕ ЭКСПЕРТА

А.Л. Лаберко, канд. мед. наук, научный сотрудник отдела оптимизации лечения и профилактики осложнений трансплантации гемопоэтических стволовых клеток ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, врач – педиатр, аллерголог-иммунолог отделения трансплантации костного мозга для детей с орфанными заболеваниями НИИ ДОГИТ ФГБОУ ВО «Первый СПБГМУ им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России

На сегодняшний день аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) является рутинным методом терапии тяжелых форм первичных иммунодефицитов (ПИД), при которых сопроводительная терапия не может обеспечить адекватный контроль инфекционных осложнений, а также сохраняется риск развития аутоиммунных и злокачественных осложнений.

При этом, к сожалению, остаются нозологические формы ПИД, при которых ТГСК не может быть предложена в качестве куративной опции ввиду либо отсутствия точки приложения для коррекции имеющихся иммунологических нарушений, либо высоких рисков инвалидизации и летальности, сопряженных с ТГСК, которые превышают потенциальную пользу данной процедуры. К первым можно отнести группу синдромов, в основе которых лежит патология тимуса, например синдром Диджорджи, ко вторым – заболевания с тяжелыми прогрессирующими проявлениями со стороны органов и систем, не имеющих отношения к кроветворению, например синдром Луи–Бар.

При ряде ПИД вопрос о потенциальной пользе ТГСК остается открытым. Так, на протяжении многих лет было и с гипер-IgE-синдромом, особенно учитывая опыт первых 2 случаев ТГСК при данном заболевании [9, 10]. Недавно опубликованные Harrison и соавт. данные о результатах ТГСК у 8 больных с гипер-IgE-синдромом существенно дополнили имеющийся опыт [11], однако надо признать, что он остается крайне ограниченным. Результат ТГСК у описанного в данной публикации пациента схож с продемонстрированным Harrison и соавт. Основным эффектом ТГСК была коррекция проявлений иммунодефицита, в частности частоты и тяжести инфекционных проявлений. Нельзя исключить, что, как и при других врожденных дефектах иммунитета, коррекция иммунодефицита посредством ТГСК предотвратит и риск развития лимфомы, хотя, безусловно, для его оценки требуется более длительное наблюдение. Другие же проявления данного заболевания ожидаемо не разрешились после проведения трансплантации. В связи с этим

пациенты с гипер-IgE-синдромом после ТГСК нуждаются в мультидисциплинарном наблюдении с подключением врачей различных специальностей, от стоматологов до эндокринологов и ортопедов.

Интересно, что хотя у описанного пациента проводилась терапия бисфосфонатами, это не предотвратило развитие перелома костей предплечья на фоне минимальной травмы. В исследовании Sowerwine и соавт. показано, что снижение минеральной плотности костей наблюдается у 79% пациентов с гипер-IgE-синдромом, однако степень остеопении никак не коррелирует с частотой переломов, связанных с минимальными травмами [13]. Таким образом, можно заключить, что пациентам с гипер-IgE-синдромом как до, так и после ТГСК показан динамический контроль костной плотности. В случае выявления остеопении должна быть рекомендована терапия бисфосфонатами для устранения дополнительного фактора риска переломов костей.

Важно, что представленный случай ТГСК у пациента с гипер-IgE-синдромом говорит о возможности частичного улучшения качества жизни и, вероятно, повышения ее продолжительности за счет снижения риска жизнеугрожающих инфекций и злокачественных процессов. Однако, к сожалению, сохраняющиеся риски костных осложнений, васкулопатий и поражения легких не могут обеспечить полного излечения заболевания, ожидаемого на современном этапе после ТГСК при других ПИД. Выбор кандидатов на проведение ТГСК также остается непростой задачей, пока опыт данной терапии является столь ограниченным. Учитывая риски летальности и инвалидизации, ассоциированные с проведением ТГСК, а также неполную коррекцию заболевания после нее, на сегодняшний день данная опция должна рассматриваться у пациентов с гипер-IgE-синдромом только при наличии тяжелых проявлений иммунодефицита. Такими являются инфекции, плохо поддающиеся контролю в условиях проведения регулярной профилактической противомикробной терапии и заместительной терапии ВВИГ и развитие лимфомы. Как и при любом ПИД, предпочтительным должно являться проведение ТГСК в раннем возрасте, до развития необратимых изменений органов, в частности легких, которые могут повлечь дополнительные риски осложнений ТГСК.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Не указан.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

ORCID

Bazaev A.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0967-395X>

Kozlovskaya S.N. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1754-1220>

Vasilyeva A.P. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3949248X>

Skvortsova Yu.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0566-053X>

Balashov D.N. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2689-0569>

Литература / References

1. Minegishi Y., Saito M., Tsuchiya S., Tsuge I., Takada H., Hara T., et al. Dominant-negative mutations in the DNA-binding domain of STAT3 cause hyper-IgE syndrome. *Nature* 2007; 448: 1058–62.
2. Kröner C., Neumann J., Ley-Zaporozhan J., Hagl B., Meixner I., Spielberger B.D., et al. Lung disease in STAT3 hyper-IgE syndrome requires intense therapy. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol* 2019; 74 (9): 1691–702.
3. Chandesris M.-O., Melki I., Natividad A., Puel A., Fieschi C., Yun L., et al. Autosomal dominant STAT3 deficiency and hyper-IgE syndrome: molecular, cellular, and clinical features from a French national survey. *Medicine (Baltimore)* 2012; 91 (4): e1–19.
4. Xiang Q., Zhang L., Liu X., Wang S., Wang T., Xiao M., et al. Autosomal dominant hyper IgE syndrome from a single centre in Chongqing, China (2009–2018). *Scand J Immunol* 2020; 91 (6): 1–11.
5. Woellner C., Michael Gertz E., Schäffer A.A., Lagos M., Perro M., Glocker E.-O., et al. Mutations in the signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) and diagnostic guidelines for the hyper-IgE syndrome. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 125 (2): 424–32.
6. Grimbacher B., Schäffer A.A., Holland S.M., Davis J., Gallin J.L., Malech H.L., et al. Genetic linkage of hyper-IgE syndrome to chromosome 4. *Am J Hum Genet* 1999; 65 (3): 735–44.
7. Grimbacher B., Holland S.M., Gallin J.L., Greenberg F., Hill S.C., Malech H.L., et al. Hyper-IgE syndrome with recurrent infections – an autosomal dominant multisystem disorder. *N Engl J Med* 1999; 340 (9): 692–702.
8. Кузьменко Н.Б., Щербина А.Ю. Классификация первичных иммунодефицитов как отражение современных представлений об их патогенезе и терапевтических подходах. *Российский журнал детской гематологии и онкологии* 2013; 4 (3): 51–7. DOI: 10.17650/2311-1267-2017-4-3-51-57 [Kuzmenko N.B., Shcherbina A.Yu. Classification of primary immunodeficiencies as a reflection of modern ideas about their pathogenesis and therapeutic approaches. *Russian Journal of Pediatric Hematology and Oncology* 2017; 4 (3): 51–7. (In Russ.)].
9. Gennery A.R., Flood T.J., Abinun M., Cant A.J. Bone marrow transplantation does not correct the hyper IgE syndrome. *Bone Marrow Transplant* 2000; 25 (12): 1303–5.
10. Nester T.A., Wagnon A.H., Reilly W.F., Spitzer G., Kjeldsberg C.R., Hill H.R. Effects of allogeneic peripheral stem cell transplantation in a patient with Job syndrome of hyper-immunoglobulinemia E and recurrent infections. *Am J Med* 1998; 105 (2): 162–4.
11. Harrison S.C., Tsilifis C., Slatter M.A., Nademi Z., Worth A., Veys Paul., et al. Hematopoietic Stem Cell Transplantation Resolves the Immune Deficit Associated with STAT3-Dominant-Negative Hyper-IgE Syndrome. *J Clin Immunol* 2021; 41 (5): 934–43.
12. Кантулаева А.К., Кузьменко Н.Б., Дерипапа Е.В., Юхачева Д.В., Викторова Е.А., Бурлаков В.И., Щербина А.Ю. Подходы к лечению аутосомно-доминантного гипер-IgE-синдрома: клинический случай. *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии* 2018; 17 (4): 75–81. DOI: 10.24287/1726-1708-2018-17-4-75-81 [Kantulaeva A.K., Kuzmenko N.B., Deripapa E.V., Yukhacheva D.V., Victorova E.A., Burlakov V.I., Shcherbina A.Yu. Treatment approaches to hyper-IgE syndrome: a clinical case report. *Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology* 2018; 17 (4): 75–81. (In Russ.)].
13. Sowerwine K.J., Shaw P.A., Gu W., Ling J.C., Collins M.T., Darnell D.N., et al. Bone density and fractures in autosomal dominant hyper IgE syndrome. *J Clin Immunol* 2014; 34 (2): 260–4.

Правила оформления статей

1. Статья должна быть представлена в электронном виде (в отдельных файлах: текст статьи со списком литературы, таблицы, графики, рисунки, подписи к рисункам, резюме).

Все страницы пронумерованы.

Шрифт – Times New Roman, 14 пунктов, 1,5 интервала.

2. На 1-й странице: название статьи, инициалы и фамилии всех авторов, полное название учреждений, в которых выполнена работа, их полный адрес с индексом.

В конце статьи: контактные телефоны, рабочий адрес с указанием индекса, факс, адрес электронной почты и фамилия, имя, отчество, занимаемая должность, ученая степень, ученое звание авторов.

3. Объем статей: оригинальная – не более 12 стр.; описание наблюдений, заметки из практики – не более 5 стр.; обзор литературы – до 20 стр.

К статье должно быть приложено резюме на русском и английском языках: название статьи, фамилии и инициалами авторов, название учреждений, содержание работы; для оригинальных статей – структурированное резюме (введение, материалы и методы, результаты и т.д.). Объем резюме – до 1500 знаков с пробелами; количество ключевых слов – до 10.

4. Иллюстративный материал:

● фотографии должны быть контрастными; рисунки, графики и диаграммы – четкими;

● фотографии представляются в оригинале или электронном виде в формате TIFF, JPG, CMYK с разрешением не менее 300 dpi (точек на дюйм);

● графики, схемы и рисунки – в формате EPS. Adobe Illustrator 7.0–10.0.

● Все рисунки должны быть пронумерованы и снабжены подрисуночными подписями на отдельном листе, фрагменты рисунка обозначаются строчными буквами русского алфавита. Все сокращения и обозначения, использованные на рисунке, должны быть расшифрованы в подрисуночной подписи;

● все таблицы пронумерованы, иметь название; все сокращения расшифрованы в примечании к таблице;

● ссылки на таблицы, рисунки и др. иллюстративные материалы приводятся по тексту статьи в круглых скобках.

5. Единицы измерений даются в СИ.

Аббревиатуры в тексте полностью расшифрованы при первом употреблении. Использование необщепринятых сокращений не допускается. Название генов пишется курсивом, название белков – обычным шрифтом.

6. Список цитируемой литературы:

● список ссылок в порядке цитирования; все источники пронумерованы, их нумерация должна строго соответствовать нумерации в тексте статьи;

● для каждого источника необходимо указать: фамилии и инициалы авторов (если авторов более 6, указывают первые 6, далее «и др.» в русском или «et al.» – в английском тексте);

● при ссылке на статьи из журналов указывают название статьи; журнала, год, том, номер выпуска, страницы;

● при ссылке на монографии указывают полное название книги, место издания, название издательства, год издания;

● при ссылке на авторефераты диссертаций – полное название работы, докторская или кандидатская, год и место издания;

● при ссылке на данные, полученные из Интернета, указывают электронный адрес цитируемого источника;

● все ссылки на литературные источники печатают арабскими цифрами в квадратных скобках: например [5];

● количество цитируемых работ: в оригинальных статьях желательно не более 20–25 источников, в обзорах литературы – не более 60.

7. Представление в редакцию ранее опубликованных статей не допускается.

8. Все статьи, в том числе подготовленные аспирантами и соискателями ученой степени кандидата наук по результатам собственных исследований, принимаются к печати бесплатно, в порядке общей очереди.

Статьи, не соответствующие данным требованиям, к рассмотрению не принимаются.

Все поступающие статьи рецензируются.

Присланные материалы обратно не возвращаются.

Редакция оставляет за собой право на редактирование статей, представленных к публикации.

Электронная почта: journal@fnkc.ru

© 2024 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ
им. Дмитрия Рогачева»
Минздрава России
Поступила 06.03.2024
Принята к печати 08.04.2024



EDN: RTHJKL

Контактная информация:

Смирнова Дарья Сергеевна,
врач-детский онколог отделения детской
трансплантации костного мозга
и гемопоэтических стволовых клеток НИИ
детской онкологии и гематологии им. акад.
РАМН Л.А. Дурнова ФГБУ «НМИЦ онкологии
им. Н.Н. Блохина» Минздрава России
Адрес: 115522, Москва,
Каширское шоссе, 23
E-mail: d.smirnova@ronc.ru

© 2024 by «D. Rogachev NMRCPHO»

Received 06.03.2024

Accepted 08.04.2024

Correspondence:

Daria S. Smirnova,
a pediatric oncologist at the Department
of Pediatric Bone Marrow and Hematopoietic
Stem Cell Transplantation of the L.A. Durnov
Research Institute of Pediatric Oncology
and Hematology of the N.N. Blokhin National
Medical Research Center of Oncology, Ministry
of Healthcare of the Russian Federation
Address: 23 Kashirskoe Highway,
Moscow 115522, Russia
E-mail: d.smirnova@ronc.ru

Нейробластома (НБ) является самым часто встречающимся экстракраниальным солидным злокачественным новообразованием (ЗНО) детского возраста, на долю которого приходится 7–8% всех ЗНО у детей, а в группу высокого риска стратифицируются около 45–50% пациентов с НБ [1]. В Российской Федерации ежегодно НБ заболевают до 300 детей [2, 3]. Улучшение результатов лечения детей с НБ группы высокого риска является актуальной задачей современной детской онкологии-гематологии.

На современном этапе стандартом терапии НБ является программное лечение, включающее своевременную инструментальную и лабораторную диагностику, индукционную полихимиотерапию, хирургическое лечение, этап консолидации в виде высокодозной полихимиотерапии (ВДПХТ) с последующей аутологичной трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток (ауто-ТГСК), лучевую терапию и постконсолидирующую иммунотерапию [2, 4].

Данный подход позволил улучшить результаты общей выживаемости (ОВ) – в ведущих исследова-

DOI: 10.24287/1726-1708-2024-23-2-174-181

Высокодозная полихимиотерапия с последующей аутологичной трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток в tandemном режиме у детей с нейробластомой группы высокого риска

Д.С. Смирнова

Научно-исследовательский институт детской онкологии и гематологии им. акад. РАМН Л.А. Дурнова
ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава
России, Москва

Улучшение результатов лечения детей с нейробластомой группы высокого риска является одной из самых актуальных задач детской онкологии-гематологии на современном этапе. Результаты лечения у данных пациентов требуют улучшения как с точки зрения эффективности достижения ремиссии, так и с точки зрения оптимизации профиля токсичности. На современном этапе принят ряд концепций достижения приемлемых результатов, в том числе интенсификация лечения с использованием высокодозной полихимиотерапии с последующей аутологичной трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток в tandemном режиме как один из этапов программной терапии. Применение tandemной высокодозной полихимиотерапии с последующей аутологичной трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток показало в ряде исследований эффективность и безопасность. Целью данного обзора литературы является представление данных исследований, показывающих возможность применения данного метода на практике и его безопасность.

Ключевые слова: аутологичная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток, нейробластома, группа высокого риска, дети

Смирнова Д.С. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2024; 23 (2): 174–81.
DOI: 10.24287/1726-1708-2024-23-2-174-181

Tandem high-dose multiagent chemotherapy followed by autologous stem cell transplantation in children with high-risk neuroblastoma

D.S. Smirnova

The L.A. Durnov Research Institute of Pediatric Oncology and Hematology, the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology
of Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow

The improvement of treatment outcomes for children with high-risk neuroblastoma is one of the most significant challenges in current pediatric oncology/hematology practice. Treatment outcomes in these patients need to be improved, both in terms of achieving remission and in terms of toxicity profile. At the present time, a number of approaches have been adopted to achieve better outcomes, including the intensification of treatment by using tandem high-dose multiagent chemotherapy followed by autologous hematopoietic stem cell transplantation as a part of treatment. Tandem high-dose chemotherapy with autologous hematopoietic stem cell transplantation has been shown to be effective and safe in several studies. The purpose of this literature review is to present research data showing the feasibility and safety of this treatment strategy in practice.

Key words: autologous hematopoietic stem cell transplantation, neuroblastoma, high-risk group, children

Smirnova D.S. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology 2024; 23 (2): 174–81.
DOI: 10.24287/1726-1708-2024-23-2-174-181

ниях 5-летняя ОВ составляет $51,2 \pm 1,4\%$, а бессобытийная выживаемость (БСВ) – $62,5 \pm 1,3\%$ [5]. Однако эти результаты требуют дальнейшего улучшения.

Рост числа ВДПХТ с ауто-ТГСК для пациентов с НБ [6] позволил улучшить результаты терапии. Сбор и хранение гемопоэтических стволовых клеток для последующего осуществления клеточной поддержки в целях полного восстановления гемопоэза позволили интенсифицировать дозы и режимы полихимиотерапии и улучшить исход у пациентов с НБ группы высокого риска [7]. Приемлемый профиль токсичности проводимых сегодня ауто-ТГСК позволяет вовремя начинать иммунотерапию анти-GD2-антителами [8].

По данным Европейской группы по трансплантации крови и костного мозга (European Society for Blood and Marrow Transplantation, EBMT), включение в лечение ВДПХТ с ауто-ТГСК при ЗНО оправдано при выполнении следующих критериев:

- 1) высокая химиочувствительность опухоли при низком уровне 3- или 5-летней выживаемости;
- 2) возможность использования схемы ВДПХТ, дозу которой можно безопасно повышать сверх уровня толерантности костного мозга;
- 3) возможность применения такого режима ВДПХТ, в состав которого входят активные против данного ЗНО цитотоксические агенты, но отличные от тех, которые применяются на этапе индукции;
- 4) использование оптимальной поддерживающей терапии.

НБ группы высокого риска соответствует данным критериям и является тем заболеванием, для которого применение в программе терапии ауто-ТГСК позволяет улучшить исходы [9, 10]. Кроме того, в современных исследованиях сформулированы предпосылки по возможности интенсификации терапии.

На современном этапе обсуждается вопрос изменения стратегии лечения пациентов с НБ группы высокого риска с исключением этапа ВДПХТ с ауто-ТГСК. Так, в Мемориальном онкологическом центре Слоан-Кеттеринг (США) с 2003 г. стандарт терапии пациентов с НБ группы высокого риска включал индукционную полихимиотерапию с последующей иммунотерапией анти-GD2-антителами с введением гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора, локальную лучевую терапию [11, 12]. Подход был основан на ретроспективных данных об отсутствии преимущества в выживаемости после применения ВДПХТ с ауто-ТГСК по сравнению с поддерживающей химиоиммунотерапией [13, 14]. В нерандомизированном исследовании не было выявлено значимой разницы в 5-летней БСВ и 5-летней ОВ между пациентами, получившими ВДПХТ с ауто-ТГСК, и теми, кому проведена индукционная полихимиотерапия с последующим использованием антител

к GD2 [11]. Позднее целесообразность применения ВДПХТ с ауто-ТГСК, эффективность и безопасность данного метода лечения были оспорены в работах В. Kushner [15] и J. Mora [16]. В 2020 г. J. Mora и соавт. представлены результаты 2 разных клинических исследований с использованием антител против GD2 (динутуксимаб и накситамаб), в которые были включены пациенты, получавшие терапию первой линии, у которых либо был получен полный ответ, либо констатирована рефрактерность заболевания. Не было выявлено существенной разницы в 2-летней БСВ ($64,1\%$ против $54,2\%$; $p = 0,28$) и ОВ ($66,7\%$ против $84,1\%$; $p = 0,81$) для обеих групп пациентов: с включением в программу терапии этапа ВДПХТ с ауто-ТГСК и без него соответственно. В рамках исследования пациентам проводилось до 10 курсов иммунотерапии, хотя разница в результатах не была статистически значимой у пациентов, получивших больше или меньше 5 курсов [17]. Однако данные исследования не позволили сделать достоверные выводы об эффективности ВДПХТ с ауто-ТГСК, поскольку число пациентов в исследовании было относительно небольшим, а группы гетерогенны.

С учетом того, что современные стратегии сопроводительной терапии, например с активной профилактикой и лечением синдрома синусоидальной обструкции (ССО) [18], являются эффективными, на текущем этапе определены необходимость и возможность интенсификации терапии НБ группы высокого риска.

Целью данного обзора литературы является изучение возможности улучшения результатов лечения НБ с использованием ВДПХ с ауто-ТГСК в тандемном режиме.

Высокодозная полихимиотерапия с аутологичной трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток: современное состояние проблемы

На современном этапе данные систематических обзоров демонстрируют эффективность и безопасность ВДПХТ с ауто-ТГСК у детей с НБ группы высокого риска. Так, В. Yalçın и соавт. была установлена статистически значимая разница в показателях БСВ в пользу ВДПХТ с использованием миелоаблативного режима с ауто-ТГСК по сравнению с полихимиотерапией или отсутствием дальнейшего лечения (на основании 3 рандомизированных контролируемых исследований с включением 739 детей). С учетом дополнительных данных последующих наблюдений статистически значимой разницы в показателях ОВ не выявлено [19]. Важно отметить, что данные исследования не включали пациентов, получавших иммунотерапию анти-GD2-антителами на этапе постконсолидации.

В систематическом обзоре U. Żebrowska и соавт. (2024 г.) представлен анализ 34 исследований (в том числе 4 многоцентровых рандомизированных контролируемых исследования), среди которых 22 посвящены одноэтапной ВДПХТ с ауто-ТГСК без последующей иммунотерапии анти-GD2-агентами, 4 нерандомизированных исследования – одноэтапной ауто-ТГСК с последующей иммунотерапией анти-GD2, 7 – сравнению одноэтапной и tandemной ВДПХТ с ауто-ТГСК, 1 нерандомизированное клиническое исследование – популяции с рецидивами. Данные метаанализа подтверждают опубликованные ранее результаты B. Yalçın и соавт. Что касается tandemной ВДПХТ с ауто-ТГСК, преимущества данного метода консолидирующей терапии статистически значимы в подгруппе пациентов, получавших иммунотерапию анти-GD2 в постконсолидации, в которой отмечается улучшение показателей БСВ, но без значимой разницы в показателях ОВ [20].

Внедрению ВДПХТ с миелоаблативным режимом с последующей ауто-ТГСК в стандарт терапии пациентов с НБ группы высокого риска способствовали результаты крупного рандомизированного исследования CCG-3891, опубликованные в 1999 г. [21]. В данном исследовании пациенты с полным ответом после этапа индукционной терапии были рандомизированы на 2 группы: 189 пациентам был проведен этап консолидации с кондиционированием в составе карбоплатина, этопозид, мелфалана и тотального облучения тела (TOT) с последующей реинфузией аутологичных стволовых клеток, остальным 190 пациентам было проведено 3 цикла полихимиотерапии в режиме цисплатин, этопозид, доксорубин, ифосфамид. Результаты 3-летней БСВ составили $34 \pm 4\%$ и $22 \pm 4\%$ соответственно. Долгосрочное наблюдение пациентов, включенных в рандомизированное исследование CCG-3891, показало значительно лучший результат 5-летней БСВ у пациентов, получивших миелоаблативное кондиционирование с ауто-ТГСК по сравнению с пациентами, получившими 3 курса немиелоаблативной полихимиотерапии, однако статистически значимого различия в ОВ выявлено не было [22].

Преимущества tandemного режима высокодозной полихимиотерапии с последующей аутологичной трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток

Ранние исследования с применением tandemного режима консолидирующей терапии показали переносимость данного метода лечения у пациентов с НБ высокого риска без ухудшения исходов терапии, однако продемонстрировали различный профиль токсичности в зависимости от схемы кондиционирования, не всегда сопоста-

вимый с токсичностью одноэтапной ауто-ТГСК (таблица) [23].

Одними из первых результаты исследования эффективности и безопасности tandemной ВДПХТ с ауто-ТГСК представили S. Grupp и соавт. в 2000 г. В рамках исследования 39 пациентам с НБ группы высокого риска проведена tandemная ВДПХТ с ауто-ТГСК. У 19 пациентов была 4-я стадия заболевания по Международной системе стадирования НБ (International Neuroblastoma Staging System, INSS) с амплификацией *NMYC*, у 14 пациентов – 4-я стадия без амплификации, у 4 пациентов – 3-я стадия с амплификацией *NMYC*, у 2 пациентов статус *NMYC* неизвестен. Индукционная терапия включала 5 курсов полихимиотерапии, хирургическое лечение и локальную лучевую терапию. На этапе консолидации 3 пациента умерли вследствие развития токсичности (в одном случае на этапе кондиционирования развился сепсис, приведший к полиорганной недостаточности и смерти, в другом – на 14-й день после второй трансплантации отмечалось развитие ССО с последующим развитием дыхательной недостаточности и смерти, у третьего пациента к летальному исходу привело течение генерализованной аденовирусной инфекции). Трехлетняя БСВ составила 58% [24].

В еще 1 исследование, результаты которого были опубликованы M. Qayed и соавт. в 2012 г., были включены 84 пациента с НБ группы высокого риска: 28 пациентов получили одноэтапную ВДПХТ с ауто-ТГСК, 56 – проведена tandemная ВДПХТ с ауто-ТГСК. Получена значимая разница результатов терапии между 2 исследуемыми группами: 4-летняя БСВ в группе tandemной трансплантации составила $59,3 \pm 6,7\%$ против $26,8 \pm 9,2\%$ – в группе одноэтапной ($p = 0,01$). ОВ пациентов, получивших tandemную ауто-ТГСК, также превосходила группу одноэтапной трансплантации, однако разница не достигла статистической значимости ($70,6 \pm 9,2\%$ против $44,7 \pm 11,2\%$; $p = 0,06$). Что касается токсичности данного метода лечения, в группе tandemной трансплантации ССО от легкой до тяжелой степени развилась у 17% пациентов ($n = 9$), в то время как развитие данного осложнения не наблюдалось в группе одноэтапной трансплантации. Частота других токсических осложнений была сходной в обеих группах [25].

В ряде исследований в качестве компонента кондиционирования использовалась лучевая терапия в формате TOT или таргетной лучевой терапии с метилдбензилгуанидином (МИБГ). Так, в публикации K. Sung и соавт. представлены результаты лечения 50 пациентов с НБ группы высокого риска, которым на этапе консолидации была проведена tandemная ауто-ТГСК с применением в рамках кондиционирования карбоплатина/этопозид/цикло-

фосфамида перед первой ауто-ТГСК и тиотепы/мелфалана + TOT перед второй. В группу высокого риска включены пациенты с 4-й стадией заболевания по INSS ($n = 45$; 90%), с 3-й стадией НБ при наличии амплификации *NMYC* ($n = 5$; 10%). Среди всех пациентов амплификация *NMYC* обнаружена в 22 (44%) случаях. Перед этапом консолидации пациентам проведена индукционная терапия в объеме 9 курсов полихимиотерапии и хирургического лечения. К этапу консолидации у 24 пациентов зафиксирован полный ответ, у 13 – очень хороший частичный ответ, у 11 – частичный ответ, у 1 – смешанный ответ. Медиана наблюдения составила 37,5 (4–129) мес. Получены высокие показатели выживаемости – 5-летняя ОВ составила 58,3%, однако данный режим был ассоциирован с высоким уровнем острой и отдаленной токсичности. Среди наиболее частых поздних осложнений отмечались аномалии зубов, потеря слуха, нефропатия и низкорослость [26].

В настоящее время не существует рандомизированных исследований, оценивающих результаты терапии с применением TOT как компонента режима кондиционирования при НБ. Проблема отдаленных последствий TOT у детей ставит под вопрос оправданность данного метода в рамках кондиционирования на этапе консолидации [27–29].

Применение МЙБГ-терапии в режиме кондиционирования в рамках тандемной ауто-ТГСК у детей с НБ группы высокого риска продемонстрировано в публикации J. Lee [30]. Клетки НБ в 90% случаев экспрессируют переносчик норадреналина, который обеспечивает захват радиоактивно меченного МЙБГ. На этом свойстве основано применение МЙБГ-терапии. Данное исследование II фазы включило 54 пациентов с НБ группы высокого риска: 49 (90,7%) – с 4-й стадией заболевания по INSS, 2 (3,7%) – с 3-й стадией, 3 (5,6%) – со стадией 4S. У 25 (48,1%) пациентов были *NMYC*-позитивные опухоли. Все пациенты получили 9 курсов индукционной полихимиотерапии. Полного ответа на индукционную терапию достигли 29 (53,7%) пациентов, очень хорошего частичного ответа – 10 (18,5%), частичного ответа – 11 (20,4%), смешанного ответа – 1 (1,9%), у 1 (1,9%) пациента зафиксирована стабилизация заболевания. После первой ауто-ТГСК умерли 5 пациентов: 3 вследствие развития миокардита, в 1 случае отмечалось развитие ССО, еще у 1 пациента к летальному исходу привело внутричерепное кровоизлияние. Из оставшихся 47 пациентов 43 проведен второй этап трансплантации с МЙБГ-терапией, 4 – без МЙБГ-терапии (2 пациента с локализованными опухолями, 2 – с МЙБГ-негативными опухолями). Внедрение МЙБГ-терапии на этапе консолидации позволило снизить частоту токсических проявлений и отдаленных последствий

тандемной ауто-ТГСК с сохранением показателей выживаемости (5-летняя БСВ $67,5 \pm 6,7\%$) [30].

Тандемная высокодозная полихимиотерапия с аутологичной трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток: режимы кондиционирования

В настоящее время используются 2 основные стратегии тандемной ВДПХТ с ауто-ТГСК. Согласно подходу детской онкологической группы (Children Oncology Group, COG), кондиционирование перед первой ауто-ТГСК включает циклофосфамид и тиотепу, перед второй ауто-ТГСК – карбоплатин, этопозид, мелфалан [8, 31]. Стратегия Международного общества детской онкологии (International Society of Paediatric Oncology, SIOP) предполагает применение перед первой ауто-ТГСК высокодозной тиотепы, на втором этапе – ВДПХТ по схеме бусульфана/мелфалана.

Мультицентровое рандомизированное исследование COG ANBL0532 под руководством J. Park обобщает опыт проведения ВДПХТ с ауто-ТГСК у детей с НБ [8]. В исследование были включены 652 пациента, у которых была диагностирована НБ группы высокого риска в период с ноября 2007 г. по февраль 2012 г. Группа высокого риска была установлена согласно критериям COG и включала пациентов с НБ 3-й стадии по INSS старше 18 месяцев с неблагоприятной гистологией по Международной гистологической классификации НБ (International Neuroblastoma Pathology Classification, INPC); с НБ стадий 2, 3, 4 или 4S по INSS с амплификацией *NMYC*; с НБ 4-й стадии по INSS, диагностированной в возрасте от 12 до 18 месяцев, при наличии неблагоприятных факторов (амплификация *NMYC*, неблагоприятная гистология, диплоидия). Этап индукции включал 6 курсов полихимиотерапии и хирургическое лечение. Из рандомизации были исключены 270 пациентов, 355 – были рандомизированы на 2 группы: 179 детям проведена одноэтапная ВДПХТ с ауто-ТГСК, 176 пациентов получили на этапе консолидации тандемную ВДПХТ с ауто-ТГСК. Пациенты в группе одноэтапной ауто-ТГСК получали ВДПХТ в составе карбоплатина, этопозид, мелфалана. В группе тандемной ауто-ТГСК на первом этапе проводилась ВДПХТ в составе циклофосфамида, тиотепы, на втором этапе – карбоплатина, этопозид, мелфалана. Трехлетняя ОВ существенно не отличалась в группе тандемной трансплантации (74,1% (95% доверительный интервал (ДИ) 67,5–80,7)) по сравнению с группой с одноэтапной трансплантацией (69,1% (95% ДИ 62,3–75,9%); $p = 0,25$). Трехлетняя БСВ в группе пациентов, получивших тандемную ВДПХТ с ауто-ТГСК, составила 61,6% по сравнению с 48,4% в группе пациентов, получивших одноэтапную ВДПХТ с ауто-ТГСК. После завершения консолидации

250 из 355 рандомизированных пациентов (121 – в группе тандемной трансплантации, 129 – в группе одноэтапной трансплантации) получили постконсолидационную терапию в объеме изотретиноина, препаратов анти-GD2 и цитокинов. Трехлетняя БСВ и ОВ с момента начала иммунотерапии были выше в группе тандемной трансплантации по сравнению с группой одноэтапной трансплантации и составили: БСВ 73,3% (95% ДИ 65,2–81,3) против 54,7% (95% ДИ 46,1–63,3%) соответственно; $p = 0,004$, ОВ 84,0% (95% ДИ 77,3–90,7) против 73,5% (95% ДИ 65,8–81,1) соответственно; $p = 0,04$ [4]. Всего зарегистрировано 17 смертей, связанных с токсич-

ностью: 7 на этапе индукционной терапии, 10 на этапе консолидации. На этапе индукционной терапии 3 случая смерти связаны с развитием инфекционных осложнений, 2 – с развитием осложнений хирургического лечения, 1 – с развитием ССО, 1 – с развитием сердечной недостаточности. В группе одноэтапной трансплантации зафиксировано 7 случаев смерти: 4 в связи с развитием ССО, 2 в результате сепсиса, 1 в исходе синдрома полиорганной недостаточности, 1 из-за развития тромботической микроангиопатии. В группе тандемной ауто-ТГСК зарегистрировано 2 случая смерти: 1 в результате развития тромботической микроангиопатии, 1 из-за развития дыха-

Таблица
Результаты применения тандемной ауто-ТГСК в различных клинических исследованиях
Tables
The results of tandem auto-HSCT in different clinical trials

Автор, год Author, year	Тип исследования Clinical trial type	Число пациентов Number of patients	Клеточность продукта Cell count	Режимы кондиционирования Conditioning regimens	Результаты Results
S. Grupp, 2000 [24]	Исследование II фазы Phase II trial	39	Средняя клеточность на 2 трансплантации – $7,2 \times 10^6$ CD34 ⁺ /кг The mean number of CD34 ⁺ cells for 2 transplantations: 7.2×10^6 CD34 ⁺ cells/kg	1. Карбоплатин 667 мг/м ² + этопозид 2400 мг/м ² + циклофосфамид 1800 мг/м ² 2. Мелфалан 60 мг/м ² + TOT 12 Гр 1. Carboplatin 667 mg/m ² + etoposide 2400 mg/m ² + cyclophosphamide 1800 mg/m ² 2. Melphalan 60 mg/m ² + TBI 12 Gy	3-летняя БСВ – 58% The 3-year EFS rate: 58%
K. Sung, 2012 [26]	Исследование II фазы Phase II trial	50	Средняя клеточность: $2,1 \times 10^6$ CD34 ⁺ /кг и $1,9 \times 10^6$ CD34 ⁺ /кг для первой и второй трансплантаций соответственно The mean number of CD34 ⁺ cells infused: 2.1×10^6 CD34 ⁺ cells/kg and 1.9×10^6 CD34 ⁺ cells/kg for the first and second transplantation, respectively	1. Карбоплатин 1950 мг/м ² + этопозид 1950 мг/м ² + циклофосфамид 5200 мг/м ² 2. Тиотепа 600–900 мг/м ² + мелфалан 120 мг/м ² ± TOT 10 Гр 1. Carboplatin 1950 mg/m ² + etoposide 1950 mg/m ² + cyclophosphamide 5200 mg/m ² 2. Thiotepa 600–900 mg/m ² + melphalan 120 mg/m ² ± TBI 10 Gy	5-летняя ОВ – 58,3% The 5-year OS rate: 58.3%
M. Qayed, 2012 [25]	Ретроспективное исследование Retrospective study	56	Медиана клеточности: $5,18 \times 10^6$ CD34 ⁺ /кг и $5,29 \times 10^6$ CD34 ⁺ /кг для первой и второй трансплантаций соответственно The median number of CD34 ⁺ cells infused: 5.18×10^6 CD34 ⁺ cells/kg and 5.29×10^6 CD34 ⁺ cells/kg for the first and second transplantation, respectively	1. Карбоплатин, этопозид, циклофосфамид/тиотепа, циклофосфамид 2. Мелфалан/мелфалан, TOT/тиотепа, мелфалан 1. Carboplatin, etoposide, cyclophosphamide/thiotepa, cyclophosphamide 2. Melphalan/melphalan, TBI/thiotepa, melphalan	4-летняя ОВ – $70,6 \pm 9,2\%$ 4-летняя БСВ – $59,3 \pm 6,7\%$ The 4-year OS: $70.6 \pm 9.2\%$ The 4-year EFS: $59.3 \pm 6.7\%$
J. Lee, 2018 [30]	Исследование II фазы Phase II trial	54	Не менее 1×10^6 CD34 ⁺ /кг At least 1×10^6 CD34 ⁺ cells/kg	1. Карбоплатин 1950 мг/м ² + этопозид 1950 мг/м ² + циклофосфамид 5400 мг/м ² 2. Тиотепа 600–900 мг/м ² + мелфалан 120 мг/м ² + ¹³¹ I-МИБГ 12 или 18 мКи/кг 1. Carboplatin 1950 mg/m ² + etoposide 1950 mg/m ² + cyclophosphamide 5400 mg/m ² 2. Thiotepa 600–900 mg/m ² + melphalan 120 mg/m ² + ¹³¹ I-MIBG 12 or 18 mCi/kg	5-летняя БСВ $67,5 \pm 6,7\%$ The 5-year EFS: $67.5 \pm 6.7\%$
J. Park, 2019 [8]	Проспективное исследование Prospective study	176	Не менее 1×10^6 CD34 ⁺ /кг At least 1×10^6 CD34 ⁺ cells/kg	1. Тиотепа 900 мг/м ² + циклофосфамид 6000 мг/м ² 2. Мелфалан 180 мг/м ² + этопозид 1200 мг/м ² + карбоплатин 1500 мг/м ² 1. Thiotepa 900 mg/m ² + cyclophosphamide 6000 mg/m ² 2. Melphalan 180 mg/m ² + etoposide 1200 mg/m ² + carboplatin 1500 mg/m ²	3-летняя ОВ – 74,1% 3-летняя БСВ – 61,6% The 3-year OS: 74.1% The 3-year EFS: 61.6%

Notes. MIBG – meta-iodobenzylguanidine; TBI – total body irradiation; OS – overall survival; EFS – event-free survival.

тельной недостаточности после первой ауто-ТГСК. Тандемная ауто-ТГСК привела к статистически значимому улучшению БСВ по сравнению с одноэтапной ауто-ТГСК у пациентов с НБ группы высокого риска. Использование антител к анти-CD2 в сочетании с цитокинами и изотретиноином на этапе постконсолидации направлено на устранение минимальной остаточной болезни [32]. Учитывая, что тандемная трансплантация связана с улучшением как БСВ, так и ОВ, можно предположить, что вторая ауто-ТГСК обеспечивает дальнейшее снижение уровня минимальной остаточной болезни к началу иммунотерапии.

В международном рандомизированном многогрупповом исследовании SIOPEN HR-NBL1 с включением 1347 пациентов с медианой наблюдения 7,2 (5,3–9,2) года выявлено преимущество в показателях 3-летней БСВ (50% против 38%) в группе пациентов, получивших кондиционирование в режиме бусульфана/мелфалан против режима карбоплатин/этопозид/мелфалан [33, 34].

A.V. Desai и соавт. представлен крупный сравнительный анализ эффективности и токсичности 2 схем кондиционирования: бусульфана/мелфалан и циклофосфамид/этопозид/мелфалан перед одноэтапной ауто-ТГСК. По данным исследования, пациентам, получавшим ВДПХТ в режиме циклофосфамид/этопозид/мелфалан, требовалось более продолжительное использование анальгетических, противомикробных и антигипертензивных лекарственных препаратов. ССО чаще развивалась у пациентов, получавших ВДПХТ в объеме бусульфана/мелфалан, в этой же группе общая продолжительность госпитализации была дольше [35].

Опыт применения тандемной ВДПХТ с ауто-ТГСК отдельных исследовательских центров показывает возможность проведения и переносимость данного режима у пациентов с НБ группы высокого риска. M. Kato и соавт. представили свой опыт проведения тандемной ВДПХТ с ауто-ТГСК 4 пациентам с НБ группы высокого риска. Перед первой ауто-ТГСК была проведена полихимиотерапия в режиме карбоплатин/этопозид/мелфалан, перед второй – в режиме бусульфана/мелфалан. Проявления органной токсичности выше III степени отмечены у всех пациентов после первой ауто-ТГСК, в 1 случае после второй трансплантации наблюдалось развитие мукозита желудочно-кишечного тракта, у 1 пациента после первого этапа – развитие почечной дисфункции. Все осложнения были полностью разрешены на фоне стандартной сопроводительной терапии. У 2 пациентов сохранялся статус ремиссии, у 2 – стабилизация заболевания. Медиана наблюдения составила 3,8 (2,1–5,6) года. Данный режим ВДПХТ оказался переносим и потенциально эффективен [36].

Специалисты ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России представили результаты ВДПХТ с ауто-ТГСК в тандемном режиме у 4 пациентов. На этапе консолидации в рамках кондиционирования перед первой ауто-ТГСК проводилась ВДПХТ по схеме тиотепа/циклофосфамид, перед второй – по схеме карбоплатин/этопозид/мелфалан. Все пациенты прошли оба курса ВДПХТ без необходимости модификации режима и доз цитостатических агентов, медиана наблюдения составила 41 (13–62) мес. Явления токсичности выше III степени отмечались у всех пациентов, наиболее частыми из которых являлись мукозиты желудочно-кишечного тракта. У 1 пациента отмечалось развитие нефротоксичности. Все явления острой токсичности были разрешены на фоне стандартной сопроводительной терапии. У 2 пациентов в отдаленном периоде развилась тугоухость [37]. В свою очередь, в НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина были определены возможности применения треосульфана у детей с НБ в рамках ВДПХТ с ауто-ТГСК [38].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Современный стандарт терапии детей с НБ группы высокого риска предусматривает обязательный этап консолидации – ВДПХТ с ауто-ТГСК. Вопрос выбора оптимального режима кондиционирования (одноэтапный или тандемный), при котором возможно улучшение результатов лечения без значимого усиления токсичности, остается дискуссионным. Данные обзора показывают возможность и ряд преимуществ реализации тандемного режима ВДПХТ с ауто-ТГСК у детей с НБ без значимого увеличения токсичности, о чем свидетельствуют опубликованные результаты крупных рандомизированных исследований. Дальнейшее проведение проспективных рандомизированных исследований с широким охватом пациентов позволит оптимизировать схемы ВДПХТ с ауто-ТГСК, в том числе с использованием тандемного режима. Выбор препаратов для проведения тандемной ВДПХТ с ауто-ТГСК является дискуссионным, однако комбинация тиотепа, бусульфана (треосульфана) и мелфалана представляется наиболее оптимальной, по данным литературы.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Не указан.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

ORCID

Smirnova D.S. ORCID: <https://orcid.org/0009-0007-2171-1951>

Литература / References

- Colon N.C., Chung D.H. Neuroblastoma. *Adv Pediatr* 2011; 58 (1): 297–311. DOI: 10.1016/j.yapd.2011.03.011
- Шаманская Т.В., Варфоломеева С.Р., Качанов Д.Ю., Моисеенко Р.А., Телешова М.В., Коновалов Д.М. и др. Результаты терапии пациентов с нейробластомой группы высокого риска: опыт НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева. *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии* 2023; 22 (2): 65–91. DOI 10.24287/1726-1708-2023-22-2-65-91 [Shaman-skaya T.V., Varfolomeeva S.R., Kachanov D.Yu., Moiseenko R.A., Teleshova M.V., Konovalov D.M., et al. The results of therapy in patients with high-risk neuroblastoma: the experience of the Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology. *Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology* 2023; 22 (2): 65–91. (In Russ.)].
- Агульник А., Киргизов К.И., Янгутова Я.А., Муфтахова Г.М., Коган С.А., Серик Г.И. и др. Ситуационный анализ проблем и перспектив в области детской гематологии-онкологии на территории стран СНГ: опыт совместной рабочей группы. *Российский журнал детской гематологии и онкологии* 2018; 5 (3): 36–42. DOI 10.17650/2311-1267-2018-5-3-36-42 [Agulnik A., Kirgizov K.I., Yangutova Ya.A., Muf-takhova G.M., Kogan S.A., Serik G.I., et al. Situation analysis of problems and prospects of the pediatric hematology-oncology in the CIS countries: the experience of a joint working group. *Russian Journal of Pediatric Hematology and Oncology* 2018; 5 (3): 36–42. (In Russ.)].
- Bagatell R., DuBois S.G., Naranjo A., Belle J., Goldsmith K.C., Park J.R., Irwin M.S.; COG Neuroblastoma Committee. Children's Oncology Group's 2023 blueprint for research: Neuroblastoma. *Pediatric Blood Cancer* 2023; 70 Suppl 6 (Suppl 6): e30572. DOI: 10.1002/pbc.30572
- Irwin M.S., Naranjo A., Zhang F.F., Cohn S.L., London W.B., Gastier-Foster J.M., et al. Revised Neuroblastoma Risk Classification System: A Report From the Children's Oncology Group. *J Clin Oncol* 2021; 39 (29): 3229–41. DOI: 10.1200/JCO.21.00278
- Passweg J.R., Baldomero H., Ciceri F., Corbacioglu S., de la Cámara R., Dolstra H., et al. Hematopoietic cell transplantation and cellular therapies in Europe 2021. The second year of the SARS-CoV-2 pandemic. A Report from the EBMT Activity Survey. *Bone Marrow Transplant* 2023; 58 (6): 647–58. DOI: 10.1038/s41409-023-01943-3
- Carreras E., Dufour C., Mohty M., Kröger N. (eds.). *The EBMT Handbook: Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Cellular Therapies*. 7th ed. Cham (CH): Springer; 2019.
- Park J.R., Kreissman S.G., London W.B., Naranjo A., Cohn S.L., Hogarty M.D., et al. Effect of Tandem Autologous Stem Cell Transplant vs Single Transplant on Event-Free Survival in Patients With High-Risk Neuroblastoma: A Randomized Clinical Trial. *JAMA* 2019; 322 (8): 746–55. DOI: 10.1001/jama.2019.11642
- Fish J.D., Grupp S.A. Stem cell transplantation for neuroblastoma. *Bone Marrow Transplant* 2008; 41 (2): 159–65. DOI: 10.1038/sj.bmt.1705929
- Bagatell R., Irwin M.S. Tandem Transplant for High-Risk Neuroblastoma: Next Steps in the Era of Precision Medicine. *JAMA* 2019; 322 (8): 729–31. DOI: 10.1001/jama.2019.11641. PMID: 31454025
- Kushner B.H., Ostrovnaya I., Cheung I.Y., Kuk D., Modak S., Kramer K., et al. Lack of survival advantage with autologous stem-cell transplantation in high-risk neuroblastoma consolidated by anti-GD2 immunotherapy and isotretinoin. *Oncotarget* 2016; 7 (4): 4155–66. DOI: 10.18632/oncotarget.6393
- Kushner B.H., Modak S., Kramer K., Basu E.M., Iglesias-Cardenas F., Roberts S.S., et al. Immunotherapy with anti-G(D2) monoclonal antibody in infants with high-risk neuroblastoma. *Int J Cancer* 2023; 152: 259–66. DOI: 10.1002/ijc.34233
- Castel V., Canete A., Navarro S., Garcia-Miguel P., Melero C., Acha T., et al. Outcome of high-risk neuroblastoma using a dose intensity approach: improvement in initial but not in long-term results. *Med Pediatr Oncol* 2001; 37: 537–42. DOI: 10.1002/mpo.1248
- De Bernardi B., Nicolas B., Boni L., Indolfi P., Carli M., Cordero Di Montezemolo L., et al. Disseminated neuroblastoma in children older than one year at diagnosis: comparable results with three consecutive high-dose protocols adopted by the Italian Co-Operative Group for Neuroblastoma. *J Clin Oncol* 2003; 21: 1592–601. DOI: 10.1200/JCO.2003.05.191
- Kushner B.H. Re-thinking transplant for neuroblastoma. *Pediatr Blood Cancer* 2021; 68: e28961. DOI: 10.1002/pbc.28961
- Mora J. Autologous stem-cell transplantation for high-risk neuroblastoma: historical and critical review. *Cancers (Basel)* 2022; 14 (11): 2572. DOI: 10.3390/cancers14112572
- Mora J., Castañeda A., Flores M.A., Santa-María V., Garraus M., Gorostegui M., et al. The role of autologous stem-cell transplantation in high-risk neuroblastoma consolidated by anti-GD2 immunotherapy. Results of two consecutive studies. *Front Pharmacol* 2020; 11: 575009. DOI: 10.3389/fphar.2020.575009
- Dhir A., Wadhwa A., Haines H., Chewning J., Murthy S., Kim J., et al. Retrospective Application of Sinusoidal Obstruction Syndrome/Veno-occlusive Disease Diagnostic Criteria in a Pediatric Hematopoietic Stem Cell Transplant Cohort. *J Pediatr Hematol Oncol* 2022; 44 (2): e343–8. DOI: 10.1097/MPH.0000000000002267
- Yalçın B., Kremer L.C., van Dalen E.C. High-dose chemotherapy and autologous haematopoietic stem cell rescue for children with high-risk neuroblastoma. *Cochrane Database Syst Rev* 2015; 2015 (10): CD006301. DOI: 10.1002/14651858.CD006301.pub4
- Żebrowska U., Balwierz W., Wechowski J., Wiecek A. Survival Benefit of Myeloablative Therapy with Autologous Stem Cell Transplantation in High-Risk Neuroblastoma: A Systematic Literature Review. *Targ Oncol* 2024; 19 (2): 143–59. DOI: 10.1007/s11523-024-01033-4
- Matthay K.K., Villablanca J.G., Seeger R.C., Stram D.O., Harris R.E., Ramsay N.K., et al. Treatment of high-risk neuroblastoma with intensive chemotherapy, radiotherapy, autologous bone marrow trans-

- plantation, and 13-cis-retinoic acid. Children's Cancer Group. *N Engl J Med* 1999; 341 (16): 1165–73. DOI: 10.1056/NEJM199910143411601
22. Matthay K.K., Reynolds C.P., See-ger R.C., Shimada H., Adkins E.S., Haas-Kogan D., et al. Long-term results for children with high-risk neuroblastoma treated on a randomized trial of myeloablative therapy followed by 13-cis-retinoic acid: a children's oncology group study. *J Clin Oncol* 2009; 27 (7): 1007–13. DOI: 10.1200/JCO.2007.13.8925. Erratum in: *J Clin Oncol* 2014; 32 (17): 1862–3.
 23. Granger M., Grupp S.A., Kletzel M., Kretschmar C., Naranjo A., London W.B., Diller L. Feasibility of a tandem autologous peripheral blood stem cell transplant regimen for high risk neuroblastoma in a cooperative group setting: a Pediatric Oncology Group study: a report from the Children's Oncology Group. *Pediatr Blood Cancer* 2012; 59 (5): 902–7. DOI: 10.1002/pbc.24207
 24. Grupp S.A., Stern J.W., Bunin N., Nancarrow C., Ross A.A., Mogul M., et al. Tandem high-dose therapy in rapid sequence for children with high-risk neuroblastoma. *J Clin Oncol* 2000; 18 (13): 2567–75. DOI: 10.1200/JCO.2000.18.13.2567
 25. Qayed M., Chiang K.Y., Ricketts R., Alazraki A., Tahvildari A., Haight A., et al. Tandem stem cell rescue as consolidation therapy for high-risk neuroblastoma. *Pediatr Blood Cancer* 2012; 58 (3): 448–52. DOI: 10.1002/pbc.23155
 26. Sung K.W., Son M.H., Lee S.H., Yoo K.H., Koo H.H., Kim J.Y., et al. Tandem high-dose chemotherapy and autologous stem cell transplantation in patients with high-risk neuroblastoma: results of SMC NB-2004 study. *Bone Marrow Transplant* 2013; 48 (1): 68–73. DOI: 10.1038/bmt.2012.86
 27. Hobbie W.L., Moshang T., Carlson C.A., Goldmuntz E., Sacks N., Goldfarb S.B., et al. Late effects in survivors of tandem peripheral blood stem cell transplant for high-risk neuroblastoma. *Pediatr Blood Cancer* 2008; 51 (5): 679–83. DOI: 10.1002/pbc.21683
 28. George R.E., Li S., Medeiros-Nancarrow C., Neuberg D., Marcus K., Shamberger R.C., et al. High-Risk Neuroblastoma Treated With Tandem Autologous Peripheral-Blood Stem Cell-Supported Transplantation: Long-Term Survival Update. *JCO* 2006; 24: 2891–6. DOI: 10.1200/JCO.2006.05.6986
 29. George R.E., Li S., Medeiros-Nancarrow C., Neuberg D., Marcus K., Shamberger R.C., et al. High-risk neuroblastoma treated with tandem autologous peripheral-blood stem cell-supported transplantation: Long-term survival update. *J Clin Oncol* 2006; 24: 2891–6. DOI: 10.1200/JCO.2006.05.6986
 30. Lee J.W., Lee S., Cho H.W., Ma Y., Yoo K.H., Sung K.W., et al. Incorporation of high-dose 131I-metaiodobenzylguanidine treatment into tandem high-dose chemotherapy and autologous stem cell transplantation for high-risk neuroblastoma: results of the SMC NB-2009 study. *J Hematol Oncol* 2017; 10 (1): 108. DOI: 10.1186/s13045-017-0477-0
 31. Kitko C.L., Bollard C.M., Cairo M.S., Chewning J., Fry T.J., Pulsipher M.A., et al. Children's Oncology Group's 2023 blueprint for research: Cellular therapy and stem cell transplantation. *Pediatr Blood Cancer* 2023; 70 Suppl 6 (Suppl 6): e30577. DOI: 10.1002/pbc.30577
 32. Yu A.L., Gilman A.L., Ozkaynak M.F., London W.B., Kreissman S.G., Chen H.X., et al. Children's Oncology Group. Anti-GD2 antibody with GM-CSF, interleukin-2, and isotretinoin for neuroblastoma. *N Engl J Med* 2010; 363 (14): 1324–34. DOI: 10.1056/NEJMoa0911123
 33. Philip T., Ladenstein R., Zucker J.M., Pinkerton R., Bouffet E., Louis D., et al. Double megatherapy and autologous bone marrow transplantation for advanced neuroblastoma: The LMCE2 study. *Br J Cancer* 1993; 67: 119–27. DOI: 10.1038/bjc.1993.21
 34. Ladenstein R., Pötschger U., Pearson A.D.J., Brock P., Luksch R., Castel V., et al. SIOP Europe Neuroblastoma Group (SIOPEN). Busulfan and melphalan versus carboplatin, etoposide, and melphalan as high-dose chemotherapy for high-risk neuroblastoma (HR-NBL1/SIOPEN): an international, randomised, multi-arm, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2017; 18 (4): 500–14. DOI: 10.1016/S1473-2045(17)30070-0
 35. Desai A.V., Seif A.E., Li Y., Getz K., Fisher B.T., Huang V., et al. Resource Utilization and Toxicities After Carboplatin/Etoposide/Melphalan and Busulfan/Melphalan for Autologous Stem Cell Rescue in High-Risk Neuroblastoma Using a National Administrative Database. *Pediatr Blood Cancer* 2016; 63 (5): 901–7. DOI: 10.1002/pbc.25893
 36. Kato S., Kubota Y., Watanabe K., Hogetsu K., Arakawa Y., Koh K., et al. Tandem high-dose chemotherapy with autologous stem cell rescue for stage M high-risk neuroblastoma: Experience using melphalan/etoposide/carboplatin and busulfan/melphalan regimens. *Pediatr Transplant* 2020; 24 (7): e13772. DOI: 10.1111/ptr.13772
 37. Кулева С.А., Абаджева А.А., Михайлова Е.А., Кулев М.А., Федюкова Ю.Г., Хабарова Р.И. ТанDEMная высокодозная полихимиотерапия с трансплантацией аутологичных гемопоэтических стволовых клеток у детей с нейробластомой группы высокого риска рецидива: опыт одного Центра. *Российский журнал детской гематологии и онкологии* 2023; 10 (1): 25–32. DOI: 10.21682/2311-1267-2023-10-1-25-32 [Kulyova S.A., Abadjeva A.A., Mikhailova E.A., Kulyov M.A., Fedukova Yu.G., Khabarova R.I. Tandem high-dose chemotherapy and autologous hematopoietic stem cell transplantation in pediatric patients with high-risk neuroblastoma: single-center experience. *Russian Journal of Pediatric Hematology and Oncology* 2023; 10 (1): 25–32. (In Russ.)].
 38. Алиев Т.З., Мачнева Е.Б., Костарева И.О., Сергеев К.А., Бурлака Н.А., Кудаева Л.М. и др. Токсические осложнения высоких доз треоосульфана у детей: опыт ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. *Российский журнал детской гематологии и онкологии* 2023; 10 (3): 55–62. DOI: 10.21682/2311-1267-2023-10-3-55-62 [Aliev T.Z., Machneva E.B., Kostareva I.O., Sergeenkov K.A., Burlaka N.A., Kudaeva L.M., et al. Toxic complications of high doses of treosulfan in children: experience of the N.N. Blokhin National Medical Research Centre of Oncology, Ministry of Health of Russia. *Russian Journal of Pediatric Hematology and Oncology* 2023; 10 (3): 55–62. (In Russ.)].

© 2024 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России
Поступила 02.04.2024
Принята к печати 23.04.2024



EDN: SKLAAL

Контактная информация:

Кумукова Ирина Борисовна,
канд. мед. наук, научный сотрудник отдела
оптимизации лечения и профилактики
осложнений трансплантации гемопоэтических
стволовых клеток ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им.
Дмитрия Рогачева» Минздрава России;
заведующая трансфузиологическим
отделением – врач-трансфузиолог ГБУЗ
«ММЦК "Коммунарка" ДЗМ»
Адрес: 117997, Москва,
ул. Саморы Машела, 1
E-mail: irina_kumukova@mail.ru

© 2024 by «D. Rogachev NMRCPH01»

Received 02.04.2024

Accepted 23.04.2024

Correspondence:

Irina B. Kumukova,
Cand. Med. Sci., a researcher at the
Department of Treatment and Prophylaxis
Optimization for HSCT complications
of the Dmitry Rogachev National Medical
Research Center of Pediatric Hematology,
Oncology and Immunology of Ministry
of Healthcare of the Russian Federation;
Head of the Department of Transfusion
Medicine, a transfusion medicine physician
at Kommunarka Moscow Multidisciplinary
Clinical Center of the Department of Health
of Moscow
Address: 1 Samory Mashela St.,
Moscow 117997, Russia
E-mail: irina_kumukova@mail.ru

DOI: 10.24287/1726-1708-2024-23-2-182-191

Экстракорпоральный фотоферез для лечения реакции «трансплантат против хозяина» после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток

И.Б. Кумукова^{1,2}, Е.Е. Курникова¹, П.Е. Трахтман¹

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, Москва

²ГБУЗ г. Москвы «Московский многопрофильный клинический центр "Коммунарка" Департамента здравоохранения г. Москвы», Москва

Реакция «трансплантат против хозяина» (РТПХ) является одним из основных осложнений аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток. Значительная часть пациентов не отвечают на терапию глюкокортикостероидами и нуждаются в альтернативных методах лечения. Экстракорпоральный фотоферез (ЭКФ) является эмпирически разработанным методом клеточной терапии, который продемонстрировал свою эффективность в лечении как острой, так и хронической РТПХ. Поскольку ЭКФ безопасен в применении и имеет мало существенных побочных эффектов, его использование в лечении РТПХ является крайне привлекательным. Целью настоящего обзора является представление литературных данных о применении ЭКФ для лечения РТПХ.

Ключевые слова: экстракорпоральный фотоферез, реакция «трансплантат против хозяина»

Кумукова И.Б. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2024; 23 (2): 182–91. DOI: 10.24287/1726-1708-2024-23-2-182-191

Extracorporeal photopheresis for the treatment of graft-versus-host disease after hematopoietic stem cell transplantation

I.B. Kumukova^{1,2}, E.E. Kurnikova¹, P.E. Trakhtman¹

¹Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology of Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow

²Kommunarka Moscow Multidisciplinary Clinical Center of the Department of Health of Moscow, Moscow

Graft-versus-host disease (GVHD) is one of the main complications of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. A large number of patients do not respond to corticosteroid therapy and require alternative treatment options. Extracorporeal photopheresis (ECP) is an empirically developed cell therapy that has proven effective in the treatment of both acute and chronic GVHD. Because ECP is safe to use and has few serious side effects, its application in the management of GVHD is very attractive. The purpose of this paper is to present a literature review on the use of ECP for the treatment of GVHD.

Key words: extracorporeal photopheresis, graft-versus-host disease

Kumukova I.B., et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology 2024; 23 (2): 182–91.
DOI: 10.24287/1726-1708-2024-23-2-182-191

Аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) является потенциально эффективным методом лечения различных гематологических и негематологических заболеваний. Наиболее клинически значимым осложнением ТГСК является реакция «трансплантат против хозяина» (РТПХ) [1, 2].

Острая РТПХ (ОРТПХ) возникает у 30–50% реципиентов аллогенной ТГСК, у 14% из которых наблюдается тяжелая форма [3]. Применение глюкокортикостероидов (ГКС) является стандартной терапией первой линии, но не существует стандартного

лечения второй линии для пациентов, которые либо невосприимчивы к ГКС, либо имеют стероид-зависимую РТПХ [4, 5].

Хроническая РТПХ (хрРТПХ) встречается примерно у 30–70% пациентов и остается ведущей причиной ухудшения качества жизни и безрецидивной смертности у пациентов на поздних сроках после ТГСК [2, 6]. Клиническое ведение пациентов с распространенной хрРТПХ является сложной задачей из-за широкой вариабельности проявлений заболевания, клинического течения, инфекционных осложнений и токсичности, связанной с лечением [7]. В

настоящее время терапия первой линии хрРТПХ основана на применении ГКС и ингибиторов кальциневрина. ГКС остаются лучшим методом лечения хрРТПХ первой линии, и не было обнаружено, что сочетанная иммуносупрессивная терапия лучше, чем монотерапия стероидами [8]. Недостаточная эффективность, выраженная иммуносупрессия и значительные побочные эффекты ГКС создают необходимость в новых альтернативных методах лечения. Около 50% пациентов с установленной хрРТПХ отвечают на терапию ГКС, но только 20% живут без инвалидности через 4 года [8]. В случае неэффективности терапии ГКС, которая встречается примерно у 50% пациентов, непереносимости или зависимости от ГКС применяются другие методы лечения: препараты иммуносупрессивного действия или иммуномодулирующая терапия, в том числе экстракорпоральный фотоферез (ЭКФ) [8].

ЭКФ – вид иммуномодулирующей терапии, который используется при кожной Т-клеточной лимфоме, некоторых воспалительных и аутоиммунных состояниях в дополнение к традиционной иммуносупрессии или вместо нее. Преимуществом иммуномодулирующей терапии является манипуляция иммунной системой, приводящая к разрешению процесса основного заболевания, но с сохранением в ходе лечения полезных аспектов иммунитета, таких как противоинфекционная и противоопухолевая активность. Однако молекулярные механизмы, обеспечивающие уникальное иммуномодулирующее действие ЭКФ при сохранении иммунной функции, до конца не изучены. Механизм действия ЭКФ на клеточном и молекулярном уровне для обеспечения противоопухолевого и иммуномодулирующего эффекта, вероятно, является одинаковым, поскольку процесс ЭКФ не различает, какое заболевание лечится, однако результат может быть разным в зависимости от заболевания и его статуса.

ЭКФ является ценным методом терапии второй линии для пациентов с резистентной к ГКС оРТПХ и хрРТПХ, особенно с тяжелым поражением кожи. Ряд исследований доказали эффективность и безопасность ЭКФ при лечении РТПХ а также его стероидсберегающий эффект [9–12].

Подробное описание процедуры ЭКФ представлено в нашей ранней публикации [13].

Механизм эффективности экстракорпорального фотофереза при реакции «трансплантат против хозяина»

Несмотря на то, что ЭКФ существует уже более 30 лет, точный механизм, обеспечивающий клиническую эффективность данного метода, до сих пор неизвестен. Современные научные знания позволяют предположить, что иммуномодулирующий эффект ЭКФ

обусловлен эффектами генерируемых антигенпрезентирующих клеток, а именно – дендритных клеток [14, 15]. Фактически последние достижения демонстрируют, что ЭКФ запускает *ex vivo* дифференцировку моноцитов в дендритные клетки аналогично тому, как это происходит в организме в физиологических условиях [16–18]. Фибриноген, присутствующий в плазме, покрывает пластиковую поверхность системы ЭКФ аналогично тому, как он прикрепляется к коллагену в ранах. Затем тромбоциты через $\alpha\text{IIb}\beta 3$ -рецепторы прикрепляются к фибриногену, что приводит к их активации и экспрессии Р-селектина. Моноциты, взаимодействуя с Р-селектином активированных тромбоцитов с помощью PSGL-1 (гликопротеиновый лиганд Р-селектина), получают сигналы для созревания. Далее моноциты вторично связываются с дополнительными лигандами тромбоцитов, в частности с RGD-доменами, что приводит к вступлению на путь созревания дендритных клеток [14, 19, 20]. Это объясняет, как ЭКФ успешно генерирует функциональные дендритные клетки – редкую популяцию клеток в периферической крови [20, 21].

При обработке клеточного продукта, содержащего мононуклеарные лейкоциты, ультрафиолетом спектра А (УФА) в присутствии фотосенсибилизатора 8-метоксипсоралена (8-МОП) лимфоциты, более чувствительные к обработке, подвергаются апоптозу, в то время как моноциты выживают и дифференцируются в дендритные клетки [14, 18]. Фагоцитоз собственных аутореактивных лимфоцитов приводит к индукции иммунной толерантности за счет толерогенной дифференцировки дендритных клеток [22, 23].

Предполагаемый механизм индукции иммунной толерантности при ЭКФ заключается в том, что клетки, подверженные апоптозу под влиянием 8-МОП + УФА, не выделяют DAMP (молекулярные паттерны, ассоциированные с повреждением) либо модифицируют их. После фагоцитоза сгенерированными дендритными клетками антигены этих апоптотических клеток представляются в составе молекул МНС I (основной комплекс гистосовместимости I) CD8⁺ Т-клеткам для последующей дифференцировки в цитотоксические Т-лимфоциты, но не представляются CD4⁺ Т-клеткам, т. е. костимуляционных взаимодействий, обусловленных CD40 – CD40L, не происходит [24]. Без этого дополнительного сигнала активированные цитотоксические Т-лимфоциты становятся «беспомощными» эффекторными клетками с коротким периодом жизни [25]. При повторном взаимодействии с представленным антигеном эти цитотоксические «беспомощные» Т-лимфоциты подвергаются гибели опосредованной экспрессией TRAIL-лиганда смерти, который вызывает апоптоз [26, 27]. Толерогенный эффект ЭКФ также поддержи-

вается синтезом противовоспалительных цитокинов, индукцией Т- и В-регуляторных клеток, а также снижением синтеза провоспалительных цитокинов [14]. Дендритные клетки, полученные посредством ЭКФ, подавляют пролиферацию аллогенных Т-клеток *in vitro* и продуцируют интерлейкин (ИЛ)-10 – толерогенный цитокин [28]. Поскольку обычно количество дендритных клеток из общего числа лейкоцитов крови крайне мало, возвращение пациенту индуцированных ЭКФ дендритных клеток должно в значительной степени усиливать антигенпрезентирующую способность, особенно тех антигенов, которые в составе лимфоцитов крови обрабатываются в ходе ЭКФ [29].

Было показано, что дендритные клетки в процессе фагоцитоза апоптотических клеток подавляют экспрессию костимулирующих молекул, таких как CD40, CD80 и CD86 [30–32] и синтезируют повышенные уровни противовоспалительных цитокинов ИЛ-10 [30] и трансформирующего фактора роста- β [33], которые обуславливают толерогенный эффект и дифференцировку адаптивных регуляторных Т-клеток на периферии [34]. Трансформирующий фактор роста- β , секретируемый антигенпрезентирующими клетками [33], является важным цитокином для дифференцировки адаптивных CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ регуляторных Т-клеток из популяции наивных CD4⁺ Т-клеток [34]. Регуляторные Т-клетки играют фундаментальную роль в аутоиммунитете, хронических воспалительных заболеваниях и трансплантации. Несколько исследований показали, что в условиях ТГСК возникновение и тяжесть РТПХ могут быть связаны со снижением уровня Foxp3⁺CD4⁺CD25⁺ регуляторных Т-клеток [35–38]. S. Kim и соавт. сообщили, что подверженные апоптозу клетки подавляют продукцию провоспалительных факторов, а именно ИЛ-12, макрофагами [39]. В контексте лечения РТПХ посредством ЭКФ было продемонстрировано, что применение этого метода увеличивает частоту и активность регуляторных Т-клеток у пациентов, что указывает на их критическую роль в эффекте ЭКФ [40–42].

Таким образом, иммуномодулирующий эффект ЭКФ при РТПХ обусловлен генерацией дендритных клеток с толерогенным фенотипом, стимулирующих выработку противовоспалительных цитокинов, направляющих дифференцировку Т- и В-регуляторных клеток и обрывающих цитотоксическую функцию Т-лимфоцитов. ЭКФ повышает специфическую иммунную толерантность, но при этом не вызывает системную иммуносупрессию и не влияет на эффект «трансплантат против опухоли» [43].

Режимы терапии

Терапия ЭКФ традиционно проводится циклами, которые повторяются с разными интервалами в зави-

симости от тяжести симптомов заболевания [44]. Каждый цикл состоит из 2 сеансов ЭКФ в неделю, которые выполняются, как правило, в 2 последовательных дня [45], хотя не обнаружено исследований, доказывающих необходимость выполнения процедур именно 2 дня подряд. Терапия циклами – исторически принятый график лечения, который наиболее часто описывается в литературе и рекомендуется для стандартизации метода [44]. Согласно рекомендациям ASFA, при оРТПХ 1 цикл выполняется еженедельно до достижения ответа, а затем частота циклов постепенно снижается до 1 цикла 1 раз/2 нед перед прекращением. При тяжелом течении оРТПХ в первые недели указывают возможность проведения до 3 процедур в неделю. В исследовании H.T. Greinix и соавт. продемонстрирована возможность одномоментного прекращения терапии ЭКФ после достижения максимального ответа у пациентов с оРТПХ [46]. M. Nygaard и соавт. рекомендуют пациентам с оРТПХ постепенный и длительный период снижения частоты циклов ЭКФ и сопутствующей иммуносупрессивной терапии, включая ГКС [44].

При хрРТПХ 1 цикл выполняется еженедельно в течение 4 нед, а затем 1 цикл каждые 2 нед в течение 8–12 нед, продолжая до максимального ответа с последующим постепенным снижением частоты циклов. При хрРТПХ, особенно при изолированной слизисто-кожной форме, возможно применение режима терапии в виде 1 цикла 1 раз/2 нед [45]. У пациентов с хрРТПХ с поражением легких или склеродермией ожидаемый ответ на ЭКФ является медленным, рекомендовано продолжать ЭКФ в течение как минимум 6 мес [44].

Не рекомендуется проводить одновременно снижение частоты процедур ЭКФ и интенсивности иммуносупрессивной терапии [44].

Клиническая оценка ответа проводится еженедельно при оРТПХ и каждые 8–12 нед при хрРТПХ. Циклы сокращаются и адаптируются в соответствии с показаниями, учреждением и клиническим ответом [44]. Судя по небольшому количеству проспективных исследований, ответ на ЭКФ при хрРТПХ в идеале следует оценивать через 6 мес [10, 47].

При оценке ответа на ЭКФ рекомендовано учитывать возможность отмены иммуносупрессивной терапии, в частности стероидсберегающий эффект [44].

Качественные данные о количестве цельной крови, которая должна быть обработана, или о том, необходим ли сбор определенного количества клеток для ответа, отсутствуют [44]. Как правило, при «онлайн» ЭКФ (ЭКФ в закрытой системе) выполняется обработка 1,5 л цельной крови, а при «офлайн» ЭКФ (открытая система) по умолчанию обрабатываются 2 объема циркулирующей крови [13, 45]. В

литературе описаны методы выполнения ЭКФ без применения лейкофереза [48–51].

Требования к проведению процедуры

Для выполнения ЭКФ необходимо осуществить сбор клеток с использованием техники афереза, что требует хорошего венозного доступа. Сосудистый доступ для ЭКФ должен быть безопасным и эффективным, чтобы обеспечить успешную процедуру в течение длительного периода и минимизировать риск инфекций и других осложнений, включая минимальное вмешательство в повседневную жизнь пациентов [52]. Периферический венозный доступ всегда должен быть первым выбором [53], но детям и пациентам с проблемными периферическими венами рекомендуются устройства постоянного венозного доступа, обеспечивающие надлежащий кровоток. Варианты сосудистого доступа для ЭКФ включают канюляцию периферических вен, центральные венозные катетеры, в том числе туннелируемые [54] и даже подкожные порты [55–57].

Рекомендованы периферические внутривенные доступы: стальная диализная игла $\geq 16G$ или периферический венозный катетер ($\geq 18G$ для сбора и $\geq 20G$ для возврата). Из центральных венозных устройств предпочтительны диализные катетеры с 2 просветами (10–13,5 Fr). Детям младшего возраста может потребоваться установка 2 однопросветных центральных венозных катетеров для достижения достаточного диаметра просвета. Также возможно использовать туннелируемые венозные катетеры и венозные порты, подходящие для афереза: с большим диаметром просвета, из жесткого материала, не спадающего при сборе крови [44, 54].

У пациентов с малым объемом циркулирующей крови (в частности дети младшего возраста), а также пациентам, чувствительным к изменениям внутрисосудистого объема жидкости (например, при хронической сердечной недостаточности), для проведения процедуры может потребоваться предварительное заполнение экстракорпорального контура донорской эритроцитной взвесью [44].

Разрабатываемые методы ЭКФ без применения лейкофереза менее требовательны к сосудистому доступу и сопряжены с вовлечением в процесс значительно меньших объемов крови пациента [48–51].

Клинические параметры, которые необходимо оценивать перед каждой процедурой ЭКФ, включают общее состояние пациента, показатели гемодинамики, общий анализ крови и уровень электролитов: кальция, магния и калия в случае, если используется цитратная антикоагуляция [44]. Другие анализы крови перед процедурами ЭКФ могут быть необходимы в индивидуальном порядке для общей оценки состояния пациента и/или статуса РТПХ [58]. Что

касается количества лейкоцитов, большинство центров считают, что перед началом сеанса ЭКФ необходимо наличие как минимум $1 \times 10^9/\text{л}$ клеток в периферической крови [52]. Хотя до сих пор нет данных, определяющих адекватную лечебную дозу лейкоцитов и в частности мононуклеаров в клеточном продукте и то, как ответ на терапию связан с количеством лейкоцитов, этот порог является разумным, основанным на экстраполяции данных пациентов из литературы, посвященной ЭКФ, относительно кинетики эффективности сбора и клинических результатов [52, 59].

Не было никаких указаний на то, что выбор антикоагулянта (обычно гепарин или раствор цитрата и декстрозы (состав А)) влияет на результат терапии ЭКФ, и у большинства пациентов, по-видимому, нет причин рекомендовать тот или иной препарат. Однако у пациентов с риском кровотечения цитратная антикоагуляция может быть предпочтительнее гепарина [52]. Также рекомендовано отказаться от гепарина при наличии в анамнезе у пациента гепарин-индуцированной тромбоцитопении.

ЭКФ требует долгосрочной приверженности пациента, и перед началом терапии следует учитывать множество практических и клинических факторов. Практические факторы включают близость пациента к лечебному центру для возможности частого визита на процедуры, а также пригодность периферического венозного доступа или риски установки центрального венозного катетера [44].

Оценка качества клеточного продукта

Хотя оценка качества продукта ЭКФ не является обязательной, исследование подкомитета ASFA ECP показало, что 34% ответивших центров регулярно проводят тестирование контроля качества клеточного продукта перед повторной инфузией, используя различные лабораторные параметры [52]. Логичным является определение содержания лейкоцитов и мононуклеаров в собранном клеточном продукте, а также исследование гематокрита как фактора, влияющего на эффективность фотообработки. L. Pierelli и соавт. рекомендуют проводить оценку качества при «офлайн» ЭКФ в течение первых 2 сеансов, а также при замене УФА-облучателя или сепаратора клеток. Эффективность фотообработки можно оценить путем измерения количества апоптотических 7-аминоактиномицин-положительных CD3⁺-клеток в течение 72–96 ч после ЭКФ [60]. В настоящее время ингибирование пролиферации Т-клеток после ЭКФ анализируется с использованием трудоемких методов, включая оценку с радиоактивным тимидином или окрашивание сукцинимидиловым эфиром карбоксифлуоресцеина [61]. Поверхностный анализ CD71 представляет собой простую альтернативу контроля

качества для обнаружения ЭКФ-опосредованного ингибирования пролиферации Т-клеток [62].

Противопоказания к экстракорпоральному фотоферезу и нежелательные эффекты

Абсолютные противопоказания к лечению ЭКФ включают любую известную чувствительность к соединениям псоралена, афакию из-за значительно повышенного риска повреждения сетчатки, беременность, неконтролируемую инфекцию и нестабильность гемодинамики при использовании лейкофереза как составной части ЭКФ [52, 63]. Гемодинамическая нестабильность из-за сепсиса или сердечной недостаточности или положительные результаты посева крови могут привести к отмене процедур ЭКФ [52].

Другими состояниями, которые могут представлять собой, по крайней мере, относительные противопоказания, являются декомпенсированное поражение печени, почек, дыхательная недостаточность, цитопения и низкая масса тела [44].

У пациентов с гепарин-индуцированной тромбоцитопенией в анамнезе следует использовать цитратную антикоагуляцию. Следует соблюдать меры предосторожности у пациентов с низким гематокритом, низким количеством тромбоцитов, высоким риском кровотечений, а также следует рассмотреть возможность адекватной трансфузионной поддержки.

ЭКФ представляет собой метод лечения с низкой токсичностью, не сообщается об общем иммуносупрессивном эффекте и, следовательно, о повышении риска инфекций или рецидивов основного заболевания. Таким образом, по сравнению с другими вариантами лечения ЭКФ особенно хорошо подходит для пациентов с повышенным риском инфекций [44].

Наиболее частые осложнения ЭКФ связаны с сосудистым доступом и процедурой афереза.

Осложнения сосудистого доступа во время терапии ЭКФ нередки и варьируют в зависимости от того, является ли доступ периферическим или центральным. Осложнения периферического доступа включают флебиты, боль в местах пункции вены, тромбоз или склероз вен, инфекцию и потерю венозного доступа из-за рубцевания [64]. Осложнения, возникающие во время или сразу после установки центральных венозных катетеров и портов, как правило, более серьезные и включают пневмоторакс, пневмоперикард, гемоторакс, пункцию артерии, сердечную аритмию и гематомы [65].

Побочные реакции могут быть связаны с лейкоферезом, например, проходящая гипотензия, вызванная изменением объема крови в экстракорпоральном контуре, цитратная токсичность из-за применения антикоагулянтов, легкая анемия и тромбоцитопения после многократных частых процедур или кровотечение из участков сосудистого доступа.

При реинфузии продуктов ЭКФ некоторые пациенты жалуются на легкую лихорадку через 2–12 ч после инфузии, усталость и гематурию из-за реинфузии эритроцитов после воздействия 8-МОП [66]. Осложнения, связанные с проведением лейкофереза в обзоре M. Blaha и соавт., были зарегистрированы в 5,4% первых процедур и в 1,2% последующих процедур. Тяжелые нежелательные явления присутствовали в 0,04% всех процедур. Ни один пациент не умер из-за ЭКФ. Парестезии, связанные с действием цитрата, были наиболее частыми нежелательными явлениями [67].

В более ранней работе J. Kanold и соавт. нежелательные явления ЭКФ описывались как крайне редкие (< 0,003%), проходящие и легкие (тошнота, гипотония, головокружение, цитопения, кожные инфекции в месте венозного доступа и изменения в коагулограмме после гепарина) [68]. Нежелательные эффекты ЭКФ, такие как тошнота, рвота и проблемы с гемодинамикой, в настоящее время редки из-за усовершенствованных аппаратов и отсутствия применения перорального псоралена [69].

Результаты применения экстракорпорального фотофереза для лечения реакции «трансплантат против хозяина»

Было опубликовано множество руководств по клинической практике и консенсусных заявлений, касающихся использования ЭКФ при РТПХ, и в совокупности они рассматривают ЭКФ как признанный вариант терапии второй линии при стероид-резистентной и стероид-зависимой РТПХ. Важно отметить, что стероидсберегающий эффект возникает даже при отсутствии органоулучшения и, следовательно, улучшает качество жизни [45]. О стероидсберегающем эффекте ЭКФ, возможности значительно снизить или даже полностью отменить иммуносупрессивную терапию сообщили несколько исследователей [10, 47, 70, 71].

В исследовании A. Padmanabhan и соавт. сообщается, что частота общего ответа стероид-резистентной оРТПХ колеблется от 52 до 100% и зависит в том числе от пораженного органа. Частота ответа при поражении кожи – 66–100%, при поражении желудочно-кишечного тракта – 40–83%, при поражении печени – 27–71% [45].

E. Das-Gupta и соавт. в мультицентровом исследовании проанализировали конечную точку отсутствия рецидива РТПХ в течение 6 мес после лечения посредством ЭКФ 128 пациентов со стероид-резистентной оРТПХ. Частота общего ответа составила 77% (99 из 128 пациентов), частота отсутствия рецидива РТПХ через 6 мес после начала ЭКФ – 77,3%, а 2-летняя выживаемость – 56%. Доза ГКС или статус ответа в начале терапии второй линии не влияли на

результат лечения. Более высокая степень оРТПХ (степень II по сравнению со степенью III–IV) в начале терапии ЭКФ предсказывает плохой исход, измеряемый выживаемостью, безрецидивной смертностью и 6-месячным безрецидивным периодом. Для 91 пациента, которые достигли 6-месячного отсутствия неэффективности лечения, показатели 1-, 2- и 3-летней выживаемости составили 78,9%, 70,8% и 69,5% соответственно [72].

N. Worel и соавт. проанализировали результаты лечения 99 пациентов с оРТПХ. Частота общего ответа составила 75%, в том числе 53% полных ответов. Одномерный анализ показал корреляцию общего ответа с количеством лимфоцитов и мононуклеаров на 1 кг массы тела в клеточном продукте за 1 процедуру. В логистическом регрессионном анализе ни одна тестируемая переменная не оказала влияния на ответ [73].

Многоцентровой сравнительный анализ эффективности ЭКФ ($n = 57$) в сравнении с антицитокиновой терапией инолиумабом или этанерцептом ($n = 41$) в качестве терапии второй линии при стероид-резистентной оРТПХ показал более высокую частоту общего ответа в группе ЭКФ (66% против 32%; $p = 0,001$) и значительно более высокую выживаемость пациентов, получающих ЭКФ [71].

Сообщается, что эффективность ЭКФ в лечении оРТПХ улучшается при раннем начале терапии ЭКФ [74]. Частота ответа при применении ЭКФ повышается, если процедуры были инициированы в течение 35 дней после появления симптомов оРТПХ [75].

В опубликованных результатах одноцентрового исследования A. Cantó и соавт. частота общего ответа РТПХ составила 78% (оРТПХ – 61%, хрРТПХ – 87%). Общая выживаемость была статистически выше у пациентов с оРТПХ, которые ответили на ЭКФ, по сравнению с теми, кто не ответил (67,5% против 26% через 1 год; $p = 0,037$). Тяжесть РТПХ была независимым предиктором ответа при оРТПХ, тогда как отсутствие поражения ротовой полости и более низкое количество лимфоцитов в продукте афереза коррелировали с более высоким ответом при хрРТПХ [76]. Ретроспективная многоцентровая оценка ЭКФ в качестве терапии второй линии при оРТПХ и хрРТПХ показала ответ минимум в 80% случаев с долгосрочной выживаемостью по меньшей мере в 50% случаев [77].

В рандомизированном исследовании M.E. Flowers и соавт. при еженедельном режиме ЭКФ по сравнению со стандартной терапией эффективность лечения определялась по общему баллу поражения кожи в 10 участках тела через 12 нед. Снижение поражения кожи по крайней мере на 25% по сравнению с исходным уровнем наблюдалось у 8,3% пациентов группы ЭКФ и 0% в группе без него, а частота полных

и частичных ответов была значительно выше в пользу группы, получавшей ЭКФ [10]. В данном исследовании не было выявлено статистически значимой разницы в общем балле поражения кожи через 12 нед применения ЭКФ в сочетании с «терапией спасения» по сравнению с только «терапией спасения». Тем не менее неслепые оценки зафиксировали 40% полного и частичного ответа в группе ЭКФ по сравнению с 10% в группе без ЭКФ, а снижение дозы ГКС в группе ЭКФ было более значительным [10]. Последующее перекрестное рандомизированное исследование показало объективное улучшение ответов при поражении кожи (33%) и слизистых оболочек (до 70%) после 24-недельного курса ЭКФ, это позволяет предположить, что для достижения оптимального терапевтического эффекта необходима длительная терапия ЭКФ. Пациенты, включенные в это исследование, служили в качестве контрольной группы предыдущего исследования как не получавшие ЭКФ [47]. Считается, что для достижения максимального ответа хрРТПХ на ЭКФ требуется терапия продолжительностью 2–6 мес [45].

В проспективном исследовании F.M. Foss и соавт. у 20 (80%) из 25 пациентов достигнут регресс кожной хрРТПХ, а в 6 (24%) случаях отмечено заживление язв в полости рта [78]. В 2019 г. M. Jagasia и соавт. опубликовали результаты рандомизированного проспективного исследования по изучению добавления ЭКФ к стандартной первой линии терапии хрРТПХ на основе консенсусных критериев NIH 2015 г. для диагностики и оценки ответа. Общая частота ответа составила 74,1% против 60,9% в группе стандартной терапии + ЭКФ по сравнению с группой стандартной терапии соответственно без снижения качества жизни в группе, получавшей ЭКФ [79].

Было опубликовано несколько ретроспективных исследований, в которых авторы оценивали органоспецифический ответ на ЭКФ. Систематический обзор, посвященный хрРТПХ, показал, что совокупная частота ответа стероид-резистентной хрРТПХ кожи, печени, глаз, полости рта, легких, желудочно-кишечного тракта и скелетно-мышечной системы составляет 74%, 68%, 60%, 72%, 48%, 53% и 64% соответственно [80]. В 2017 г. Британское общество фотофереза опубликовало консенсусное заявление, основанное на обновленном обзоре литературы. Авторы выявили 27 исследований с участием 725 взрослых пациентов с хрРТПХ со средней частотой ответа 74% при поражении кожи (23 исследования), 62% при поражении печени (15 исследований), 62% при поражении слизистых оболочек (12 исследований), 60% при поражении глаз (4 исследования), 46% при поражении желудочно-кишечного тракта (5 исследований) и 46% при поражении легких

(9 исследований) [81]. Тем не менее роль ЭКФ при хрРТПХ с поражением легких противоречива. В исследовании С. Del Fante и соавт. при поражении легких ответа не наблюдалось [82]. I. Abu-Dalle и соавт. в своем систематическом обзоре, оценивающем эффективность ЭКФ при стероид-рефрактерной или стероид-зависимой хрРТПХ, предполагают, что органоспецифический ответ выше при поражении кожи, желудочно-кишечного тракта, печени и слизистой оболочки полости рта, при этом при легочном поражении отмечен очень ограниченный эффект [9].

Комбинированное лечение, включающее ЭКФ с руксолитинибом, значительно увеличивало частоту общего ответа у пациентов с полиорганной хрРТПХ и резистентностью к стероидам [83].

По данным базы Cochrane, имеющихся литературных данных недостаточно, чтобы говорить о частоте эффективности ЭКФ при лечении хрРТПХ у детей и подростков, поскольку отсутствуют рандомизированные клинические исследования в этой области. Текущие рекомендации основаны только на ретроспективных или обсервационных исследованиях. При этом авторы обзора указывают, что проведение рандомизированных исследований в этой группе пациентов будет затруднено из-за ограниченного числа участников, отвечающих критериям, варибельной картины заболевания и отсутствия четко определенных критериев ответа [84].

В проспективном исследовании, оценивающем влияние ЭКФ на клинический ответ и качество жизни при хрРТПХ с использованием 2 утвержденных опросников, наблюдалось значительное улучшение как по шкале симптомов хрРТПХ, так и по шкале DLQI у пациентов, завершивших терапию ЭКФ [85].

Поскольку ЭКФ не вызывает общей иммуносупрессии, риск инфекций по сравнению с иной иммуносупрессивной терапией не увеличивается [86]. В исследовании M.E. Flowers и соавт. инфекции наблюдались у 18% пациентов в группе ЭКФ и у 16% – в контрольной группе [10].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

ЭКФ является эффективным и безопасным методом лечения РТПХ. Данный обзор литературы позволит врачам применять ЭКФ в клинической практике, а также разрабатывать протоколы исследований, нацеленные на оценку эффективности данного метода. Целесообразными являются оценка применения ЭКФ в первой линии терапии и разработка наиболее эффективных комбинированных методов терапии РТПХ, в состав которых входит ЭКФ. Также важно определить переменные, влияющие на эффективность ЭКФ. Необходимы дальнейшие исследования для выявления прогностических факторов, специфичных для ЭКФ, учитывая, что результаты различных исследований неоднородны. Важным также является определение параметров для улучшения эффективности РТПХ [14, 15].

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Не указан.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

ORCID

Kumukova I.B. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9881-1041>

Kurnikova E.E. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4767-5382>

Trakhtman P.E. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0231-1617>

Литература / References

- Greinix H.T., Eikema D.J., Koster L., Penack O., Yakoub-Agha I., Montoto S., et al. Improved outcome of patients with graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic cell transplantation for hematologic malignancies over time: An EBMT mega-file study. *Haematologica* 2022; 107 (5): 1054–63. DOI: 10.3324/haematol.2020.265769
- Zeiser R., Blazar B.R. Pathophysiology of chronic graft-versus-host disease and therapeutic targets. *N Engl J Med* 2017; 377 (26): 2565–79. DOI: 10.1056/NEJMr1703472
- Zeiser R., Blazar B.R. Acute graft-versus-host disease – biologic process, prevention, and therapy. *N Engl J Med* 2017; 377 (22): 2167–79. DOI: 10.1056/NEJMr1609337
- Rashidi A., DeFor T.E., Holtan S.G., Blazar B.R., Weisdorf D.J., MacMillan M.L. Outcomes and predictors of response in steroid-refractory acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 2019; 25 (11): 2297–302. DOI: 10.1016/j.bbmt.2019.07.017
- Martin P.J., Rizzo J.D., Wingard J.R., Ballen K., Curtin P.T., Cutler C., et al. First- and second-line systemic treatment of acute graft-versus-host disease: recommendations of the American Society of Blood and Marrow Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2012; 18 (8): 1150–63. DOI: 10.1016/j.bbmt.2012.04.005
- Pidala J., Kurland B.F., Chai X., Vogelsang G., Weisdorf D.J., Pavletic S., et al. Sensitivity of changes in chronic graft-versus-host disease activity to changes in patient-reported quality of life: results from the Chronic Graft-versus-Host Disease Consortium. *Haematologica* 2011; 96 (10): 1528–35. DOI: 10.3324/haematol.2011.046367
- Flowers M.E., Parker P.M., Johnston L.J., Matos A.V.B., Storer B., Bensinger W.I., et al. Comparison of chronic graft-versus-host disease after transplantation of peripheral blood stem cells versus bone marrow in allogeneic recipients: long-term follow-up of a randomized trial. *Blood* 2002; 100 (2): 415–9. DOI: 10.1182/blood-2002-01-0011
- Flowers M.E., Martin P.J. How we treat chronic graft-versus-host disease. *Blood* 2015; 125 (4): 606–15. DOI: 10.1182/blood-2014-08-551994
- Abu-Dalle I., Reljic T., Nishihori T., Antar A., Bazarbachi A., Djulbegovic B., et al. Extracorporeal pho-

- tophoresis in steroid-refractory acute or chronic graft-versus-host disease: results of a systematic review of prospective studies. *Biol Blood Marrow Transplant* 2014; 20 (11): 1677–86. DOI: 10.1016/j.bbmt.2014.05.017
10. Flowers M.E., Apperley J.F., van Besien K., Elmaagacli A., Grigg A., Reddy V., et al. A multicenter prospective phase 2 randomized study of extracorporeal photopheresis for treatment of chronic graft-versus-host disease. *Blood* 2008; 112 (7): 2667–74. DOI: 10.1182/blood-2008-03-141481
 11. Malagola M., Cancelli V., Skert C., Leali P.F., Ferrari E., Tiburzi A., et al. Extracorporeal photopheresis for treatment of acute and chronic graft versus host disease: An Italian multicentric retrospective analysis on 94 patients on behalf of the gruppo italiano trapianto di midollo osseo. *Transplantation* 2016; 100 (12): e147–55. DOI: 10.1097/TP.0000000000001466
 12. Sakellari I., Gavrilaki E., Batsis I., Mallouri D., Panteliadou A.-K., Lazaridou A., et al. Favorable impact of extracorporeal photopheresis in acute and chronic graft versus host disease: Prospective single-center study. *J Clin Apher* 2018; 33 (6): 654–60. DOI: 10.1002/jca.21660
 13. Кумукова И.Б., Трахтман П.Е., Курникова Е.Е. Экстракорпоральный фотоферез: как, зачем и для кого? Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2023; 22 (2): 159–65. DOI: 10.24287/1726-1708-2023-22-2-159-165 [Kumukova I.B., Trakhtman P.E., Kurnikova E.E. Extracorporeal photopheresis: how, why and for whom? *Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology* 2023; 22 (2): 159–65. (In Russ.)].
 14. Edelson R.L. Mechanistic insights into extracorporeal photochemotherapy: efficient induction of monocyte-to-dendritic cell maturation. *Transfus Apheresis Sci* 2014; 50 (3): 322–9. DOI: 10.1016/j.transci.2013.07.031
 15. Ventura A., Vassall A., Yurter A., Robinson E., Filler R., Hanlon D., et al. Novel Protocol for Generating Physiologic Immunogenic Dendritic Cells. *J Vis Exp* 2019; (147). DOI: 10.3791/59370
 16. Ventura A., Vassall A., Robinson E., Filler R., Hanlon D., Meeth K., et al. Extracorporeal Photochemotherapy Drives Monocyte-to-Dendritic Cell Maturation to Induce Anticancer Immunity. *Cancer Res* 2018; 78: 4045–58. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-18-0171
 17. Durazzo T.S., Tigelaar R.E., Filler R., Hayday A., Girardi M., Edelson R.L. Induction of monocyte-to-dendritic cell maturation by extracorporeal photochemotherapy: initiation via direct platelet signaling. *Transfus Apheresis Sci* 2014; 50 (3): 370–8. DOI: 10.1016/j.transci.2013.11.008
 18. Wei B.M., Hanlon D., Khalil D., Han P., Tatsuno K., Sobolev O., Edelson R.L. Extracorporeal Photochemotherapy: Mechanistic Insights Driving Recent Advances and Future Directions. *Yale J Biol Med* 2020; 93 (1): 145–59.
 19. Hannani D., Gabert F., Laurin D., Sall M., Molens J.-P., Hequet O., et al. Photochemotherapy induces the apoptosis of monocytes without impairing their function. *Transplantation* 2010; 89 (5): 492–9. DOI: 10.1097/TP.0b013e3181c6ffdf3
 20. Berger C., Hoffmann K., Vasquez J.G., Mane S., Lewis J., Filler R., et al. Rapid generation of maturationally synchronized human dendritic cells: contribution to the clinical efficacy of extracorporeal photochemotherapy. *Blood* 2010; 116: 4838–47. DOI: 10.1182/blood-2009-11-256040
 21. Fearnley D.B., Whyte L.F., Carnoutos S.A., Cook A.H., Hart D.N. Monitoring human blood dendritic cell numbers in normal individuals and in stem cell transplantation. *Blood* 1999; 93 (2): 728–36.
 22. Laroche L., Edelson R., Perez M., Berger C.L. Antigen-specific tolerance induced by autoimmunization with photoinactivated syngeneic effector cells. *Ann NY Acad Sci* 1991; 636: 113–23. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1991.tb33442.x
 23. Perez M., Lobo F.M., Yamane Y., John L., Berger C.L., Edelson R.L., et al. Inhibition of antiskin allograft immunity induced by infusions with photoinactivated effector T lymphocytes (PET cells). Is in vivo cell transferrable? *Ann N Y Acad Sci* 1991; 636: 95–112. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1991.tb33441.x
 24. Schoenberger SP, Toes RE, van der Voort EI, Offringa R., Melief C.J. T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature* 1998; 393 (6684): 480–3. DOI: 10.1038/31002
 25. Sun J.C., Bevan M.J. Defective CD8 T cell memory following acute infection without CD4 T cell help. *Science* 2003; 300 (5617): 339–42. DOI: 10.1126/science.1083317
 26. Griffith T.S., Kazama H., VanOosten R.L., Earle J.K. Jr, Herndon J.M., Green D.R., Ferguson T.A. Apoptotic cells induce tolerance by generating helpless CD8+ T cells that produce TRAIL. *J Immunol* 2007; 178 (5): 2679–87. DOI: 10.4049/jimmunol.178.5.2679
 27. Janssen E.M., Droin N.M., Lemmens E.E., Pinkoski M.J., Bensing S.J., Eht B.D., et al. CD4+ T-cell help controls CD8+ T-cell memory via TRAIL-mediated activation-induced cell death. *Nature* 2005; 434 (7029): 88–93. DOI: 10.1038/nature03337
 28. Spisek R., Gasova Z., Bartunkova J. Maturation state of dendritic cells during the extracorporeal photopheresis and its relevance for the treatment of chronic graft-versus-host disease. *Transfusion* 2006; 46 (1): 55–65. DOI: 10.1111/j.1537-2995.2005.00670.x
 29. Girardi M., Berger C., Wilson L., Christensen I.R., Thompson K.R., Glusac E.J., Edelson R.L. Transimmunization for cutaneous T cell lymphoma: a Phase I study. *Leuk Lymphoma* 2006; 47 (8): 1495–503. DOI: 10.1080/10428190600581419
 30. Di Renzo M., Sbrano P., De Aloe G., Pasqui A.L., Rubegni P., Ghezzi A., et al. Extracorporeal photopheresis affects co-stimulatory molecule expression and interleukin-10 production by dendritic cells in graft-versus-host disease patients. *Clin Exp Immunol* 2008; 151 (3): 407–13. DOI: 10.1111/j.1365-2249.2007.03577.x
 31. Legitimo A., Consolini R., Failli A., Fabiano S., Bencivelli W., Scatena F., Mosca F. *In vitro* treatment of monocytes with 8-methoxypsoralen and ultraviolet A light induces dendritic cells with a tolerogenic phenotype. *Clin Exp Immunol* 2007; 148 (3): 564–72. DOI: 10.1111/j.1365-2249.2007.03372.x
 32. Clayton A.R., Prue R.L., Harper L., Drayson M.T., Savage C.O.S. Dendritic cell uptake of human apoptotic and necrotic neutrophils inhibits CD40, CD80, and CD86 expression and reduces allogeneic T cell responses: relevance to systemic vasculitis. *Arthritis Rheum* 2003; 48 (8): 2362–74. DOI: 10.1002/art.11130
 33. Fadok V.A., Bratton D.L., Henson P.M. Phagocyte receptors for apoptotic cells: recognition, uptake, and consequences. *J Clin Invest* 2001; 108 (7): 957–62. DOI: 10.1172/JCI14122
 34. Sakaguchi S., Yamaguchi T., Nomura T., Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* 2008; 133 (5): 775–87. DOI: 10.1016/j.cell.2008.05.009
 35. Soares M.V., Azevedo R.I., Ferreira I.A., Bucar S., Ribeiro A.C., Vieira A., et al. Naive and stem cell memory T cell subset recovery reveals opposing reconstitution patterns in CD4 and CD8 T cells in chronic graft vs. host disease. *Front Immunol* 2019; 10: 334. DOI: 10.3389/fimmu.2019.0033
 36. Alho A.C., Kim H.T., Chammas M.J., Reynolds C.G., Matos T.R., Forcade E., et al. Unbalanced recovery of regulatory and effector T cells after allogeneic stem cell transplan-

- tation contributes to chronic GVHD. *Blood* 2016; 127 (5): 646–57. DOI: 10.1182/blood-2015-10-672345
37. Zorn E., Kim H.T., Lee S.J., Floyd B.H., Litsa D., Arumugaraiah S., et al. Reduced frequency of FOXP3+ CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with chronic graft-versus-host disease. *Blood* 2005; 106 (8): 2903–11. DOI: 10.1182/blood-2005-03-1257
 38. Zhai Z., Sun Z., Li Q., Zhang A., Liu H., Xu J., et al. Correlation of the CD4+CD25high T-regulatory cells in recipients and their corresponding donors to acute GVHD. *Transpl Int* 2007; 20 (5): 440–6. DOI: 10.1111/j.1432-2277.2007.00462.x
 39. Kim S., Elkon K.B., Ma X. Transcriptional suppression of interleukin-12 gene expression following phagocytosis of apoptotic cells. *Immunity* 2004; 21 (5): 643–53. DOI: 10.1016/j.immuni.2004.09.009
 40. Rubegni P., Sbrano P., Cevenini G., Perari M.G., Marotta G., Risulo M., et al. CD4+CD25+ lymphocyte subsets in chronic graft versus host disease patients undergoing extracorporeal photochemotherapy. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2007; 20 (4): 801–7. DOI: 10.1177/039463200702000416
 41. Biagi E., Di Biaso I., Leoni V., Gaipa G., Rossi V., Bugarin C., et al. Extracorporeal photochemotherapy is accompanied by increasing levels of circulating CD4+CD25+GITR+Foxp3+CD62L+ functional regulatory T-cells in patients with graft-versus-host disease. *Transplantation* 2007; 84 (1): 31–9. DOI: 10.1097/01.tp.0000267785.52567.9c
 42. Di Biaso I., Di Maio L., Bugarin C., Gaipa G., Dander E., Balduzzi A., et al. Regulatory T cells and extracorporeal photochemotherapy: correlation with clinical response and decreased frequency of proinflammatory T cells. *Transplantation* 2009; 87 (9): 1422–5. DOI: 10.1097/TP.0b013e3181a27a5d
 43. Knobler R., Barr M.L., Couriel D.R., Ferrara J.L.M., French L.E., Jaksch P., et al. Extracorporeal photopheresis: past, present, and future. *J Am Acad Dermatol* 2009; 61 (4): 652–65. doi: 10.1016/j.jaad.2009.02.039
 44. Nygaard M., Wichert S., Berlin G., Toss F. Extracorporeal photopheresis for graft-vs-host disease: A literature review and treatment guidelines proposed by the Nordic ECP quality group. *Eur J Haematol* 2020; 104 (5): 361–75. DOI: 10.1111/ejh.13381
 45. Padmanabhan A., Connelly-Smith L., Aquil N., Balogun R.A., Klingel R., Meyer E., et al. Guidelines on the Use of Therapeutic Apheresis in Clinical Practice – Evidence-Based Approach from the Writing Committee of the American Society for Apheresis: The Eighth Special Issue. *J Clin Apher* 2019; 34 (3): 171–354. DOI: 10.1002/jca.21705
 46. Greinix H.T., Knobler R.M., Worel N., Schneider B., Schneeberger A., Hoecker P., et al. The effect of intensified extracorporeal photochemotherapy on long-term survival in patients with severe acute graft-versus-host disease. *Haematologica* 2006; 91 (3): 405–8.
 47. Greinix H.T., van Besien K., Elmaagachi A.H., Hillen U., Grigg A., Knobler R., et al. Progressive improvement in cutaneous and extracutaneous chronic graft-versus-host disease after a 24-week course of extracorporeal photopheresis—results of a crossover randomized study. *Biol Blood Marrow Transplant* 2011; 17 (12): 1775–82. DOI: 10.1016/j.bbmt.2011.05.004
 48. Hackstein H., Amoros J.J., Bein G., Woessmann W. Successful use of miniphotopheresis for the treatment of graft-versus-host disease. *Transfusion* 2014; 54 (8): 2022–7. DOI: 10.1111/trf.12596
 49. Matic T., Bojanic I., Mazic S., Golubic Cepulic B., Bilic E., et al. An automated mini buffy coat preparation method for use in mini extracorporeal photopheresis treatment of graft-vs-host-disease in a low body weight pediatric patient. *J Clin Apher* 2019; 34 (4): 468–73. DOI: 10.1002/jca.21700
 50. Кумукова И.Б., Курникова Е.Е., Илюшина М.А., Трахтман П.Е. Мини-фотоферез – экстракорпоральный фотоферез, не требующий лейкофереза: опыт клинического использования. *Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского* 2021; 100 (3): 69–76. DOI: 10.24110/0031-403X-2021-100-3-69-76 [Kumukova I.B., Kurnikova E.E., Ilyushina M.A., Trakhtman P.E. Mini photopheresis – a non leukapheresis based extracorporeal photopheresis: clinical experience. *Pediatrics. Journal named after G.N. Speransky* 2021; 100 (3): 69–76. (In Russ.)].
 51. Kumukova I., Kurnikova E., Trakhtman P. Extracorporeal photopheresis: Is one ounce of blood enough? Case reports. *Pediatr Blood Cancer* 2024; 71 (3): e30800. DOI: 10.1002/pbc.30800
 52. Dunbar N.M., Raval J.S., Johnson A., Abikoff C.M., Adamski J., Cooling L.L., et al. Extracorporeal photopheresis practice patterns: An international survey by the ASFA ECP subcommittee. *J Clin Apher* 2017; 32 (4): 215–23. DOI: 10.1002/jca.21486
 53. Hamsch J., Büttner S., Heck M., Nicolay J.P., Felcht M., Booken N., Klemke C.-D. [Single-center retrospective analysis of extracorporeal photopheresis in clinical practice: Peripheral venous compared to central venous access]. *Hautarzt* 2019; 70 (3): 193–203. (In German). DOI: 10.1007/s00105-018-4327-y
 54. Adamski J. Vascular access considerations for extracorporeal photopheresis. *Transfusion* 2018; 58 Suppl 1: 590–7. DOI: 10.1111/trf.14500
 55. Schwede K., Nagel S., Simon J.C., Ziemer M. How to perform extracorporeal photopheresis via port catheter. *Transfusion* 2017; 57 (11): 2567–70. DOI: 10.1111/trf.14265
 56. Candler K.S., Anderson J., Edmiston W., Roberts C.H., Lamberta J., Roseff S., et al. Retrospective, single center study of Smart Port™ CT implanted catheters (Vortex port) for post transplant extracorporeal photopheresis for treatment of steroid refractory graft-vs-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 2011; 17: S346.
 57. Ryan M.J. Approval letter: PowerFlow™ implantable apheresis IV port. Silver Spring (MD): Food and Drug Administration; 2017 Apr 17. [Electronic resource]. URL: https://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf16/K163 (accessed 2017 Sep 21).
 58. Kaufman R.M., Djulbegovic B., Gernsheimer T., Kleinman S., Tinmouth A.T., Capocelli K.E., et al. Platelet transfusion: a clinical practice guideline from the AABB. *Ann Intern Med* 2015; 162 (3): 205–13. DOI: 10.7326/M14-1589
 59. Liu C., Shah K., Dynis M., Eby C.S., Grossman B.J. Linear relationship between lymphocyte counts in peripheral blood and buffy coat collected during extracorporeal photopheresis. *Transfusion* 2013; 53 (11): 2635–43. DOI: 10.1111/trf.12114
 60. Pierelli L., Perseghin P., Marchetti L., Messina C., Perotti C., Mazzoni A., et al. Extracorporeal photopheresis for the treatment of acute and chronic graft-versus-host disease in adults and children: best practice recommendations from an Italian society of hemapheresis and cell manipulation (SIdEM) and Italian group for bone marrow transplantation (GITMO) consensus process. *Transfusion* 2013; 53 (10): 2340–52. DOI: 10.1111/trf.12059
 61. Faivre L., Lecouflet L., Liu W.Q., Khadher I., Lahaie C., Vidal M., et al. Quality control of extracorporeal photochemotherapy: Proliferation assay using CFSE validated according to ISO 15189:2007 standards. *Cytometry B Clin Cytom* 2015; 88 (1): 30–9. DOI: 10.1002/cytob.21188
 62. Schwab L., Michel G., Bein G., Hackstein H. CD71 surface analysis of T

- cells: a simple alternative for extracorporeal photopheresis quality control. *Vox Sang* 2020; 115 (1): 81–93. DOI: 10.1111/vox.12850
63. Edelson R., Berger C., Gasparro F., Jegasothy B., Heald P., Wintroub B., et al. Treatment of cutaneous T-cell lymphoma by extracorporeal photochemotherapy. preliminary results. *N Engl J Med* 1987; 316 (6): 297–303. DOI: 10.1056/NEJM198702053160603. Quality group. *Eur J Haematol* 2020; 104 (5): 361–75. DOI: 10.1111/ejh.13381
 64. Golestaneh L., Mokrzycki M.H. Vascular access in therapeutic apheresis: update 2013. *J Clin Apher* 2013; 28: 64–72.
 65. Bhutta S.T., Culp W.C. Evaluation and management of central venous access complications. *Tech Vasc Interv Radiol* 2011; 14 (4): 217–24. DOI: 10.1053/j.tvir.2011.05.003
 66. Vieyra-Garcia P.A., Wolf P. Extracorporeal photopheresis: A case of immunotherapy ahead of its time. *Transfus Med Hemother* 2020; 47 (3): 226–35. DOI: 10.1159/000508479
 67. Blaha M., Gasova Z., Berlin G., Audzjoniene J., Griskevicius A., Dykes J., et al. Analysis of extracorporeal photopheresis within the frame of the WAA register. *Transfus Apher Sci* 2021; 60 (5): 103172. DOI: 10.1016/j.transci.2021.103172
 68. Kanold J., Paillard C., Halle P., D'Incan M., Bordigoni P., Deméocq F. Extracorporeal photochemotherapy for graft versus host disease in pediatric patients. *Transfus Apher Sci* 2003; 28 (1): 71–80. DOI: 10.1016/S1473-0502(02)00102-7
 69. Cho A., Paulitschke V., Knobler R. Mode of action, indications and recommendations on extracorporeal photopheresis (ECP). *J Dtsch Dermatol Ges* 2023; 21 (11): 1369–80. DOI: 10.1111/ddg.15167
 70. Gandelman J.S., Song D.J., Chen H., Engelhardt B.G., Chen Y.-B., Clark W.B., et al. A prospective trial of extracorporeal photopheresis for chronic graft-versus-host disease reveals significant disease response and no association with frequency of regulatory T cells. *Biol Blood Marrow Transplant* 2018; 24 (12): 2373–80. DOI: 10.1016/j.bbmt.2018.06.035
 71. Jagasia M., Greinix H., Robin M., Das-Gupta E., Jacobs R., Savani B.N., et al. Extracorporeal photopheresis versus anticytokine therapy as a second-line treatment for steroid-refractory acute GVHD: a multicenter comparative analysis. *Biol Blood Marrow Transplant* 2013; 19 (7): 1129–33. DOI: 10.1016/j.bbmt.2013.04.018
 72. Das-Gupta E., Greinix H., Jacobs R., Zhou L., Savani B.N., Engelhardt B.G., et al. Extracorporeal photopheresis as second-line treatment for acute graft-versus-host disease: impact on six-month freedom from treatment failure. *Haematologica* 2014; 99 (11): 1746–52. DOI: 10.3324/haematol.2014.108217
 73. Worel N., Lehner E., Führer H., Kalhs P., Rabitsch W., Mitterbauer M., et al. Extracorporeal photopheresis as second-line therapy for patients with acute graft-versus-host disease: does the number of cells treated matter? *Transfusion* 2018; 58 (4): 1045–53. DOI: 10.1111/trf.14506
 74. Garban F., Drillat P., Makowski C., Jacob M.-C., Richard M.-J., Favrot M., et al. Extracorporeal chemophototherapy for the treatment of graft-versus-host disease: hematologic consequences of short-term, intensive courses. *Haematologica* 2005; 90 (8): 1096–101.
 75. Perfetti P., Carlier P., Strada P., Gualandi F., Occhini D., Van Lint M.T., et al. Extracorporeal photopheresis for the treatment of steroid refractory acute GVHD. *Bone Marrow Transplant* 2008; 42 (9): 609–17. DOI: 10.1038/bmt.2008.221
 76. Asensi Cantó P., Sanz Caballer J., Sopena Pell-Ilderton C., Solís Ruiz J., Lloret Madrid P., Villalba Montaner M., et al. Real-World Experience in Extracorporeal Photopheresis for Adults with Graft-versus-Host Disease. *Transplant Cell Ther* 2023; 29 (12): 765.e1–8. DOI: 10.1016/j.jctc.2023.09.001
 77. Malagola M., Cancelli V., Skert C., Leali P.F., Ferrari E., Tiburzi A., et al. Extracorporeal Photopheresis for Treatment of Acute and Chronic Graft Versus Host Disease: An Italian Multicentric Retrospective Analysis on 94 Patients on Behalf of the Gruppo Italiano Trapianto di Midollo Osseo. *Transplantation* 2016; 100 (12): e147–55. DOI: 10.1097/TP.0000000000001466
 78. Foss F.M., DiVenuti G.M., Chin K., Sprague K., Grodman H., Klein A., et al. Prospective study of extracorporeal photopheresis in steroid-refractory or steroid-resistant extensive chronic graft-versus-host disease: analysis of response and survival incorporating prognostic factors. *Bone Marrow Transplant* 2005; 35 (12): 1187–93. DOI: 10.1038/sj.bmt.1704984
 79. Jagasia M., Scheid C., Socié G., Ayuk F.A., Tischer J., Donato M.L., et al. Randomized controlled study of ECP with methoxsalen as first-line treatment of patients with moderate to severe cGVHD. *Blood Adv* 2019; 3 (14): 2218–29. DOI: 10.1182/bloodadvances.2019000145
 80. Malik M.I., Litzow M., Hogan W., Patnaik M., Murad M.H., Prokop L.J., et al. Extracorporeal photopheresis for chronic graft-versus-host disease: a systematic review and meta-analysis. *Blood Res* 2014; 49 (2): 100–6. DOI: 10.5045/br.2014.49.2.100
 81. Alfred A., Taylor P.C., Dignan F., El-Ghariani K., Griffin J., Genery A.R., et al. The role of extracorporeal photopheresis in the management of cutaneous T-cell lymphoma, graft-versus-host disease and organ transplant rejection: a consensus statement update from the UK photopheresis society. *Br J Haematol* 2017; 177 (2): 287–310. DOI: 10.1111/bjh.14537
 82. Del Fante C., Scudeller L., Viarengo G., Bernasconi P., Perotti C. Response and survival of patients with chronic graft-versus-host disease treated by extracorporeal photopheresis: a retrospective study according to classical and national institutes of health classifications. *Transfusion* 2012; 52 (9): 2007–15. DOI: 10.1111/j.1537-2995.2011.03542.x
 83. Maas-Bauer K., Kiote-Schmidt C., Bertz H., Apostolova P., Wäsch R., Ihorst G., et al. Ruxolitinib-ECP combination treatment for refractory severe chronic graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant* 2021; 56 (4): 909–16. DOI: 10.1038/s41409-020-01122-8
 84. Buder K., Zirngibl M., Bapistella S., Meerpohl J.J., Strahm B., Basler D., Weitz M. Extracorporeal photopheresis versus alternative treatment for chronic graft-versus-host disease after haematopoietic stem cell transplantation in children and adolescents. *Cochrane Database Syst Rev* 2022; 6 (6): CD009898. DOI: 10.1002/14651858.CD009898.pub4
 85. Dignan F.L., Aguilar S., Scarisbrick J.J., Shaw B.E., Potter M.N., Cavenagh J., et al. Impact of extracorporeal photopheresis on skin scores and quality of life in patients with steroid-refractory chronic GVHD. *Bone Marrow Transplant* 2014; 49 (5): 704–8. DOI: 10.1038/bmt.2014.21
 86. Suchin K.R., Cassin M., Washko R., Nahass G., Berkson M., Stouch B., et al. Extracorporeal photochemotherapy does not suppress T- or b-cell responses to novel or recall antigens. *J Am Acad Dermatol* 1999; 41 (6): 980–6. DOI: 10.1016/S0190-9622(99)70257-4

© 2024 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ
им. Дмитрия Рогачева»
Минздрава России
Поступила 03.03.2023
Принята к печати 28.04.2023



EDN: TJLMVF

Контактная информация:

Пантелеев Михаил Александрович,
член-корр. РАН, д-р физ.-мат. наук,
профессор, заведующий лабораторией
клеточного гемостаза и тромбоза
ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева»
Минздрава России
Адрес: 117997, Москва,
ул. Саморы Машела, 1
E-mail: mapanteleev@yandex.ru

© 2024 by «D. Rogachev NMRCPhOI»

Received 03.03.2023
Accepted 28.04.2023

Correspondence:

Mikhail A. Panteleev,
Corresponding Member of the RAS, Dr. Sci.
in Physics and Mathematics, Professor,
Head of the Laboratory of Cell Hemostasis
and Thrombosis of the Dmitry Rogachev
National Medical Research Center of Pediatric
Hematology, Oncology and Immunology
of Ministry of Healthcare
of the Russian Federation
Address: 1 Samory Mashela St.,
Moscow 117997, Russia
E-mail: mapanteleev@yandex.ru

Характеризация функциональной активности тромбоцита представляет собой актуальную проблему для современной лабораторной диагностики и фундаментальных исследований. Традиционные методы, такие как агрегация, давно перестали отвечать современным потребностям в оценке риска кровотечений, выявлении заболеваний, постановке диагноза, контроле и персонализации антитромботической и прогемостатической терапии. Однако эффективной альтернативы им в широкой клинической практике пока не появилось [1, 2].

Одним из наиболее многообещающих подходов к диагностике нарушений тромбоцитов является

DOI: 10.24287/1726-1708-2024-23-2-192-197

Структура гемостатического агрегата и оценка функциональной активности тромбоцитов методом проточной цитометрии

А.Н. Баландина^{1,2}, А.Д. Купраш^{1,2}, Н.С. Никитин^{2,3}, Т.А. Коваленко^{1,2}, А.А. Игнатова^{1,2},
Ф.И. Атауллаханов¹⁻⁴, М.А. Пантелеев¹⁻⁴

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, Москва

²ФГБУН «Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии» РАН, Москва

³ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, Москва

⁴ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», Москва

Тромб представляет собой гетерогенную структуру, состоящую из тромбоцитов в разных функциональных состояниях. Проточная цитометрия является одним из наиболее многообещающих инструментов для диагностики состояния тромбоцитов. Однако вопрос ее оптимизации и стандартизации является предметом бурных дискуссий. Как правильно активировать и пометить тромбоциты для того, чтобы оценить их функциональный статус? В данной работе мы хотели бы коротко осветить этот вопрос и предложить гипотезу, что несколько уровней/типов активации тромбоцита соответствуют различному положению в тромбе и различному физиологическому смыслу. Чтобы сделать вывод о том, как себя «чувствуют» тромбоциты пациента, следует использовать весь этот необходимый и достаточный набор уровней активации.

Ключевые слова: проточная цитометрия, тромбоцит, тромб, свертывание крови

Баландина А.Н. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2024; 23 (2): 192–7. DOI: 10.24287/1726-1708-2024-23-2-192-197

The structure of hemostatic aggregate and the assessment of platelet functional activity using flow cytometry

A.N. Balandina^{1,2}, A.D. Kuprash^{1,2}, N.S. Nikitin^{2,3}, T.A. Kovalenko^{1,2}, A.A. Ignatova^{1,2}, F.I. Ataullakhanov¹⁻⁴,
M.A. Panteleev¹⁻⁴

¹Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology of Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow

²Center for Theoretical Problems of Physical and Chemical Pharmacology, Russian Academy of Sciences, Moscow

³N.I. Pirogov Russian National Research Medical University of Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow

⁴M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow

A thrombus is a heterogeneous structure consisting of platelets in different functional states. Flow cytometry is one of the most promising tools for the diagnosis of platelet state. However, its optimization and standardization are the subjects of heated debate. How to properly activate and label platelets in order to assess their functional status? In this work, we would like to briefly highlight this issue and propose the hypothesis that several levels/types of platelet activation correspond to various positions in the thrombus and various physiological meanings. One should use this entire necessary and sufficient set of activation levels in order to draw a conclusion about how the patient's platelets "feel".

Key words: flow cytometry, platelet, thrombus, blood coagulation

Balandina A.N., et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology 2024; 23 (2): 192–7.
DOI: 10.24287/1726-1708-2024-23-2-192-197

проточная цитометрия [3, 4]. Возможность выявлять широкий спектр функциональных дефектов с помощью специфических маркеров (начиная от поверхностных антигенов и вплоть до изменений кальциевой сигнализации [5] и потенциала на митохондриях), использовать любые комбинации активаторов, оценивать десятки тысяч клеток в секунду, работать с цельной кровью с минимализацией подготовки пробы дает широкие возможности для использования цитометрии в практике. Подходы на основе проточной цитометрии доказали свою успешность для многих клинически значимых ситуаций [6–24].

Однако уже многие годы его внедрение в практику буксует. Отдельные группы используют различные протоколы, а эксперты не могут договориться о том, как следует проводить эксперименты [2]: как активировать, на что смотреть, чем метить и т. д.

С одной стороны, проблема, безусловно, решается масштабными клиническими испытаниями. С другой стороны, спектр путей активации тромбоцита [25] и его функциональных ответов [26], изменений настолько велик, что количество вариантов метода делает клинические испытания абсолютно неподъемными. Чтобы преодолеть эту нерешаемую проблему, в данной работе мы хотели бы предложить гипотезу, что несколько уровней/типов активации тромбоцита соответствуют различному положению в тромбе и различному физиологическому смыслу.

Рисунок 1

Пространственная архитектура гемостатического сгустка и тканей при травматическом повреждении почки мыши. Используемые антитела указаны на рисунке

Figure 1

Spatial architecture of the hemostatic clot and tissues in traumatic injury of the mouse kidney. The antibodies used are indicated in the figure

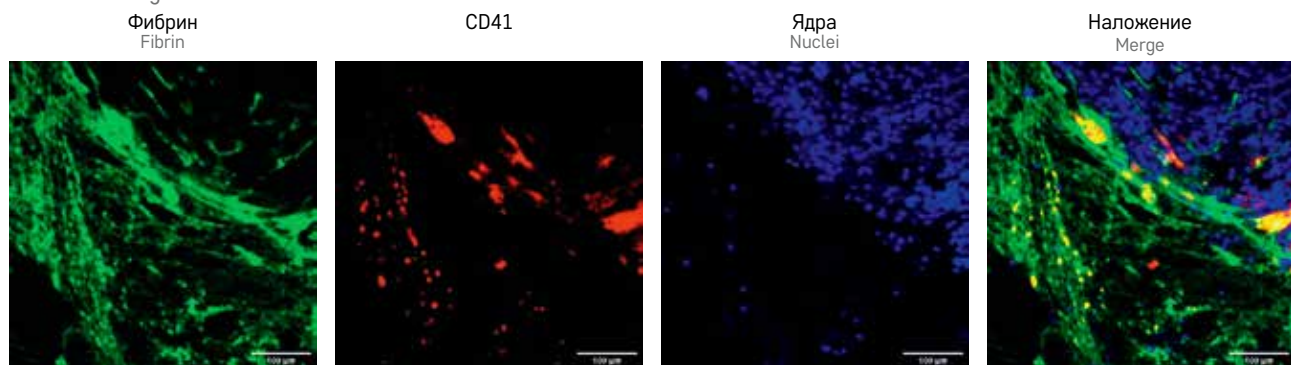


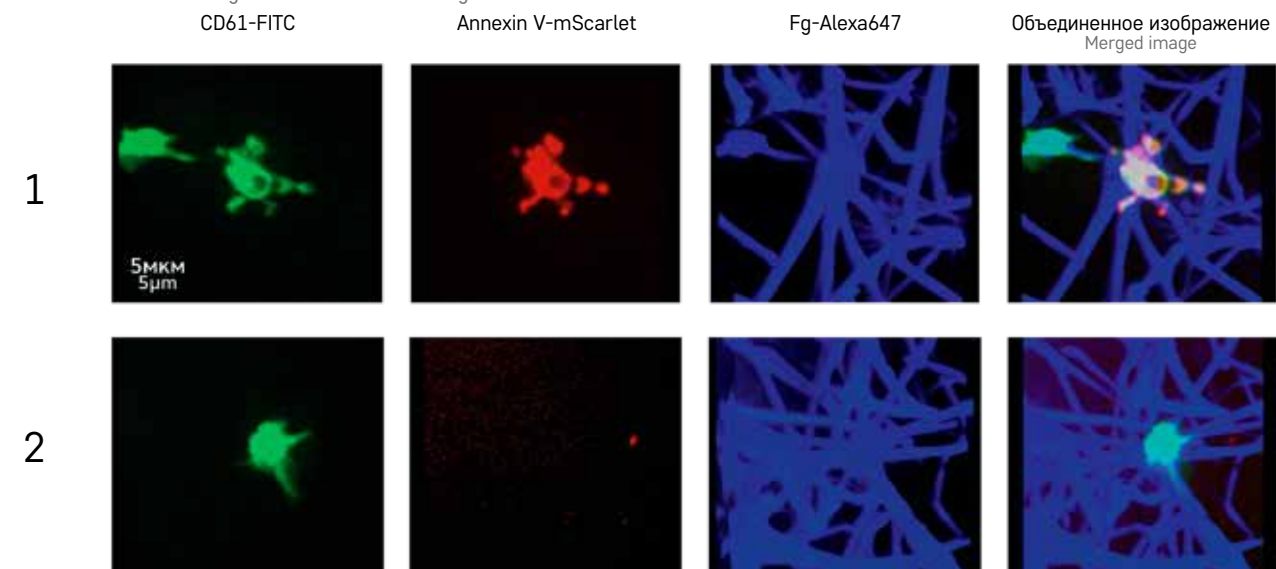
Рисунок 2

Фотографии фосфатидилсерин-положительного (1) и фосфатидилсерин-отрицательного (2) тромбоцитов в фибриновом сгустке, полученные с помощью конфокальной микроскопии. Свертывание в богатой тромбоцитами плазме активировалось 5 пМ тканевого фактора. Для окраски использовались FITC-меченные антитела к CD61, mScarlet-меченный аннексин V и Alexa647-меченный фибриноген

Figure 2

The images obtained using confocal microscopy show a phosphatidylserine-positive (1) and a phosphatidylserine-negative (2) platelet in a fibrin clot

Coagulation in platelet-rich plasma was activated by 5 pM tissue factor. FITC-labeled anti-CD61 antibodies, mScarlet-labeled Annexin V and Alexa647-labeled fibrinogen were used for staining



могут выталкиваться на периферию тромбоцитарного тромба благодаря сокращения [34]. Интересно, что в относительно бедных тромбоцитами частях гемостатического сгустка сокращения уплотняют [35] тромбоциты и связанный с ними фибрин на периферии (рисунки 3).

Контракция является не просто одним из механизмов перестройки тромба, но также одной из функций тромбоцитов с потенциальной клинической значимостью [36]. Однако физиологическая и патологическая роль сокращения или изменения формы тромбоцита в настоящий момент является предметом исследований и дискуссий. Те функции тромбоцитов, которые однозначно важны для гемостаза и тромбоза, включают в себя способность к адгезии, активацию интегринов, выход плотных и альфа-гранул, синтез тромбоксана A₂, прокоагулянтную активность [26]. Эти функции реализуются на разных этапах тромбообразования в разных частях тромба. В частности, работы последних лет, инициированные наблюдением ядра и оболочки гемостатического агрегата в работах Тимоти Сталкера и Лоренса Брасса [37, 38], предполагают существование сильно активированных тромбоцитов близко к поврежденным тканям (с вышедшими альфа-гранулами). Это ядро окружено динамической оболочкой слабоактивированных и обратимо прикрепленных тромбоцитов [39], статус которых управляется секрецией аденозиндифосфата (АДФ) из плотных гранул тромбоцитов ядра тромба [40].

Рисунок 3

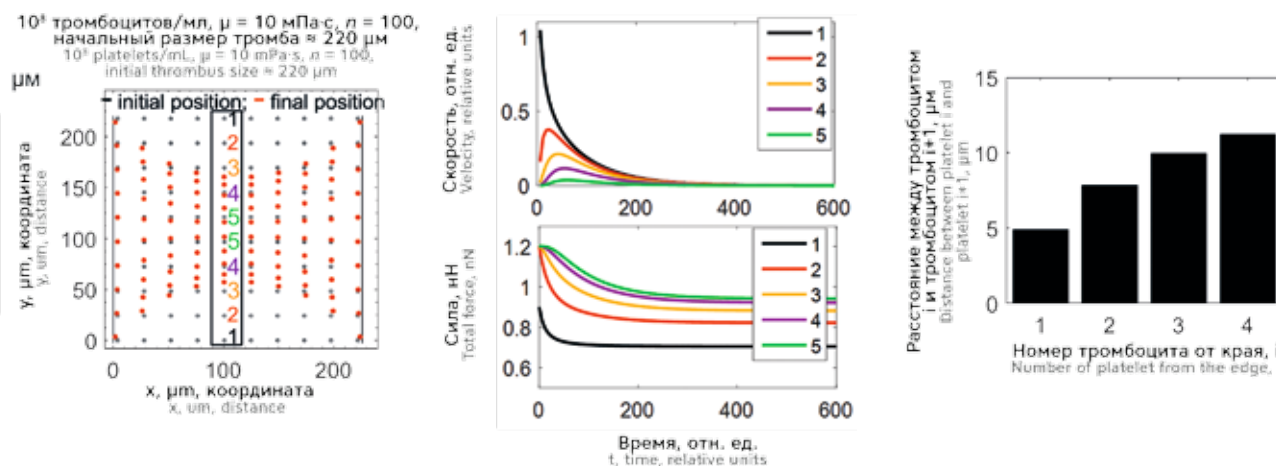
Двумерная модель сокращения тромба

Левая панель: круги – тромбоциты; черный цвет – начальное положение; красный цвет – конечное положение после сокращения тромба; вертикальные линии – положение холдеров, к которым присоединен тромб; μ – вязкость среды. Числа – номер тромбоцита от края тромба к центру. Центральная панель: верх – скорость тромбоцитов при ретракции выше на периферии; низ – сила, приложенная к тромбоцитам, выше в центре тромба, чем на периферии. Числа на легенде графика соответствуют номерам тромбоцитов на левой панели. Правая панель: расстояние между тромбоцитами меньше на периферии тромба. Простая модель ретракции предсказывает, что в присутствии двух холдеров, к которым прикреплен тромб, тромбоциты будут сконцентрированы на периферии тромба после ретракции

Figure 3

A two-dimensional model of thrombus contraction

Left panel: circles – platelets; black color – initial position; red color – final position after contraction of the thrombus; vertical lines – the position of the holders to which the thrombus is attached; μ – medium viscosity. Numbers – the number of platelet from the edge of the thrombus to the center. Central panel: upper graph – platelet velocity during the retraction is higher at the periphery; lower graph – force applied to the platelets is higher at the center of the thrombus than at the periphery. The numbers on the plot legend correspond to the numbers of platelets on the left panel. Right panel: the distance between the platelets is smaller at the periphery of the thrombus. A simple model of thrombus retraction predicts that in the presence of two holders, to which the thrombus is attached, platelets will be concentrated at the periphery of the thrombus after the retraction



Активация тромбоцитов в проточной цитометрии

В каких-то протоколах используется максимальная активация тромбоцитов коктейлем активаторов, воздействующих на все рецепторы и вызывающих максимальный ответ. В других, наоборот, используется избирательная активация отдельными активаторами или даже исследование зависимости от их концентрации для определения чувствительности тромбоцитов. Точно так же набор вариантов детекции ответов тромбоцитов почти бесконечен.

Можно предположить, что для полноценной характеристики тромбоцитов пациента в проточной цитометрии (или иных методах) их необходимо и достаточно поместить в те варианты условий, которые наблюдаются в организме, а также детектировать набор актуальных для этих условий функций. Действительно, если какие-то функции в ответ на какую-то стимуляцию нужны для физиологической или патологической роли тромбоцитов, то они в этих условиях проявят себя адекватным образом. Из описанных выше представлений о структуре тромба и данных по ответам тромбоцитов на разную стимуляцию [22] можно сформулировать такой набор условий (таблица).

Во-первых, нам, безусловно, нужны тромбоциты без активации. Это позволяет оценить их статус в покое, загруженность гранул, наличие преактивации в циркуляции и способность к базовой адгезии.

Таблица
Основные типы/уровни активации тромбоцита
Tables
Main types/levels of platelet activation

Вид активации Type of activation	FSC, %	CD42b, %	CD61, %	Активация интегринов, % Activation of integrins, %	Выход альфа- гранул, % Alpha-granule release, %	Выход плотных гранул, % Dense granule release, %	Фосфатидилсерин, % Phosphatidylserine, %	Физиологический смысл Physiological meaning
Без активации No activation	100	100	100	~ 0	~ 0	~ 0	~ 0	В покое в циркуляции Circulating in a resting state
Аналоги тромбина + коллаген Thrombin analogues + collagen	~ 60	~ 70	~ 250	~ 100	~ 100	~ 100	20–50	Ядро тромба Thrombus core
Аналоги тромбина + АДФ Thrombin analogues + ADP	~ 60	~ 50	~ 250	~ 100	~ 100	~ 100	5–20	Граница ядра и оболочки Boundary between the core and the shell
АДФ ADP	100	~ 70	~ 150	< 10	10–30	~ 0	~ 0	Оболочка тромба Thrombus shell

Note. ADP – adenosine diphosphate.

В ряде случаев эти показатели тромбоцитов коррелируют с рисками кровотечений [14], даже когда мы плохо понимаем механизмы этой корреляции.

Во-вторых, этот набор вариантов должен включать в себя сильную коллаген-зависимую активацию для области повреждения (возможно, коллаген с тромбином, а также с АДФ). Этот вариант покажет пределы возможностей тромбоцита (что полезно для калибровки), а также охарактеризует его способность стартовать тромбообразование и сформировать ядро. Можно предположить, что это важнейший путь для проявления прокоагулянтной активности. Но сам по себе он слабо коррелирует с некоторыми видами дефектов, так как переоценивает важность активации через гликопротеин VI [24].

Основу ядра формируют тромбоциты, активированные тромбином, возможно, последовательно в комбинации с АДФ [41]. Этот вариант активации также хорошо подходит для калибровки, так как вызывает максимальные или близкие к максимальным ответы. Его главное различие в том, что он подчеркивает тромбин-зависимые пути активации. Можно обсуждать, насколько этот вариант активации можно комбинировать с предыдущим.

Наконец, необходимо учитывать слабую АДФ- и тромбоксан-зависимую активацию для имитации условий оболочки. Эта стимуляция ведет к ограниченному выходу гранул и небольшой активации

интегринов даже при высоких концентрациях активаторов. Можно осторожно предположить, что она физиологически соответствует внешнему слою ядра, а также оболочке. В любом случае, если тромбоциты не будут нормально отвечать на АДФ, то формирование тромба будет нарушено. А ответы на АДФ на фоне сильных активаторов сложно исследовать.

Несмотря на то, что наше понимание структуры тромба и функций тромбоцита на разных этапах тромбообразования ограничено, подобные рассуждения в перспективе могут привести к формированию физиологически обоснованной схемы тестирования тромбоцитов, для которой может быть оправдано проведение клинических испытаний.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование проведено при поддержке гранта Российского научного фонда, проект №21-45-0012.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

ORCID

Balandina A.N. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7032-695X>
Kuprash A.D. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1210-9156>
Nikitin N.S. ORCID: <https://orcid.org/0009-0001-4799-5565>
Kovalenko T.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8455-1808>
Ignatova A.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5217-3937>
Panteleev M.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8128-7757>

Литература / References

1. Ушакова О.Е., Нечипуренко Д.Ю., Бутылин А.А., Пантелеев М.А. Применение проточных систем в лабораторной диагностике для интегральной оценки системы гемостаза. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2018; 17 (1): 117–32. DOI: 10.24287/1726-1708-2018-17-1-117-132 [Ushakova O.E., Nechipurenko D.Yu., Butylin A.A., Panteleev M.A. Application of flow systems in laboratory diagnostics for the integral evaluation of the hemostatic system. *Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology* 2018; 17 (1): 117–32. (In Russ.)].
2. Mezzano D., Harrison P., Frelinger A.L., 3rd, Mumford A.D., Noris P., Lordkipanidze M., et al. Expert Opinion on the Use of Platelet Secretion Assay for the Diagnosis of Inherited Platelet Function Disorders: Communication from the Isth Ssc Subcommittee on Platelet Physiology. *J Thromb Haemost* 2022; 20 (9): 2127–35. DOI: 10.1111/jth.15781
3. Жарков П.А., Дёмина И.А., Пантелеев М.А. Использование Метода функциональной активности тромбоцитов для диагностики тромбоцитопатий у детей. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2016; 15 (2): 40–6. DOI: 10.24287/1726-1708-2016-15-2-40-46 [Zharkov P.A., Demina I.A., Panteleev M.A. Use of a platelet functional activity technique for diagnosing paediatric thrombocytopathies. *Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology* 2016; 15 (2): 40–6. (In Russ.)].
4. Пономаренко Е.А., Игнатова А.А., Федорова Д.В., Жарков П.А., Пантелеев М.А. Функциональная активность тромбоцитов: физиология и методы лабораторной диагностики. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2019; 18 (3): 112–9. DOI: 10.24287/1726-1708-2019-18-3-112-119 [Ponomarenko E.A., Ignatova A.A., Fedorova D.V., Zharkov P.A., Panteleev M.A. Platelet functional activity: physiology and laboratory diagnostic methods. *Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology* 2019; 18 (3): 112–9. (In Russ.)].
5. Мартыанов А.А., Морозова Д.С., Хорева А.Л., Пантелеев М.А., Щербина А.Ю., Свешникова А.Н. Особенности внутриклеточной кальциевой сигнализации тромбоцитов при синдроме Вискотта-Олдрича. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2020; 19 (1): 100–7. DOI: 10.24287/1726-1708-2020-19-1-100-107 [Martyanov A.A., Morozova D.S., Khoreva A.L., Panteleev M.A., Shcherbina A.Yu., Svashnikova A.N. Specific features of intracellular calcium signalling, distinctive for Wiskott–Aldrich syndrome patients. *Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology* 2020; 19 (1): 100–7. (In Russ.)].
6. Кольцова Е.М., Балашова Е.Н., Пантелеев М.А., Баландина А.Н. Лабораторные аспекты гемостаза новорожденных. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2018; 17 (4): 100–13. DOI: 10.24287/1726-1708-2018-17-4-100-113 [Koltsova E.M., Balashova E.N., Panteleev M.A., Balandina A.N. Laboratory aspects of hemostasis in neonates. *Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology* 2018; 17 (4): 100–13. (In Russ.)].
7. Кумскова М.А., Дёмина И.А., Подоплелова Н.А., Баландина А.Н., Серёгина Е.А., Бондар Е.В. и др. Диагностика тромбастении Гланцмана с помощью исследования показателей плазменного и тромбоцитарного звеньев гемостаза. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2015; 14 (4): 17–24. DOI: 10.24287/1726-1708-2015-14-4-17-24 [Kumskova M.A., Demina I.A., Podoplelova N.A., Balandina A.N., Seregina E.A., Bondar E.V., et al. Diagnosis of Glanzmann's thrombasthenia by assessment of plasma and platelet hemostatic parameters. *Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology* 2015; 14 (4): 17–24. (In Russ.)].
8. Кольцова Е.М., Баландина А.Н., Демина И.А., Радыгина С.А., Атауллаханов Ф.И., Балашов Д.Н., Пантелеев М.А. Использование метода пространственной генерации тромбина для оценки прокоагулянтной активности тромбоцитов после трансфузии тромбоконцентрата у детей. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2016; 15 (2): 32–9. DOI: 10.24287/1726-1708-2016-15-2-32-39 [Koltsova E.M., Balandina J.A., Demina I.A., Radygina S.A., Ataulakhonov F.I., Balashov D.N., Panteleev M.A. The use of a spatial thrombin generation method for assessment of platelet procoagulant activity after platelet concentrate transfusion in children. *Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology* 2016; 15 (2): 32–9. (In Russ.)].
9. Глуханюк Е.В., Дёмина И.А., Игнатова А.А., Орехова Е.В., Хачатрян Л.А., Пантелеев М.А. Первый опыт оценки функциональной активности тромбоцитов у больных с синдромом Казабаха–Мерритт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2016; 15 (4): 21–7. DOI: 10.24287/1726-1708-2016-15-4-21-27 [Glukhanyuk E.V., Demina I.A., Ignatova A.A., Orekhova E.V., Khachatryan L.A., Panteleev M.A. A first experience of assessing the functional activity of platelets in patients with Kasabach–Merritt syndrome. *Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology* 2016; 15 (4): 21–7. (In Russ.)].
10. Полохов Д.М., Васильев С.А., Зозуля Н.И., Кумскова М.А., Моисеева Т.Н., Аль-Ради Л.С., Пантелеев М.А. Редкая форма тромбоцитопатии с нарушением прокоагулянтной активности и секреции тромбоцитов. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2018; 17 (1): 9–6. DOI: 10.24287/1726-1708-2018-17-1-93-96 [Polokhov D.M., Vasiliev S.A., Zozulya N.I., Kumskova M.A., Moiseeva T.N., Al-Radi L.S., Panteleev M.A. Combined disorder of procoagulant activity and platelet secretion with normal aggregation in a patient with a bleeding tendency. *Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology* 2018; 17 (1): 93–6. (In Russ.)].
11. Морозова Д.С., Мартыанов А.А., Пантелеев М.А., Жарков П.А., Федорова Д.В., Свешникова А.Н. Наблюдение функционирования гранулоцитов при тромбообразовании *ex vivo* у пациентов с ANKRD26-ассоциированной тромбоцитопенией. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2020; 19 (1): 27–34. DOI: 10.24287/1726-1708-2020-19-1-27-34 [Morozova D.S., Martyanov A.A., Panteleev M.A., Zharkov P.A., Fedorova D.V., Svashnikova A.N. Observation of granulocyte function during *ex vivo* thrombus formation for patients with ANKRD26-associated thrombocytopenia. *Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology* 2020; 19 (1): 27–34. (In Russ.)].
12. Сунцова Е.В., Игнатова А.А., Пшонкин А.В., Серкова И.В., Масчан А.А., Новичкова Г.А., Пантелеев М.А. Динамика функциональной активности тромбоцитов и гемостатического статуса у ребенка с хронической иммунной тромбоцитопенией на терапии ромиплостимом. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2017; 16 (3): 69–72. DOI: 10.24287/1726-1708-2017-16-3-69-72 [Suntsova E.V., Ignatova A.A., Pshonkin A.V., Serkova I.V., Maschan A.A., Novichkova G.A., Panteleev M.A. Dynamics of platelet functional activity and hemostatic status in a child with chronic immune thrombocytopenia on romiplostim treatment. *Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology* 2017; 16 (3): 69–72. (In Russ.)].
13. Balashova E., Koltsova E., Ignatova A., Polokhov D., Kuprash A., Kirt-

- baya A., et al. Laboratory Parameters of Blood Coagulation and Platelet Functional Activity in Premature Neonates. *Am J Perinatol* 2016; 33 (S 01): A015.
14. Ignatova A.A., Demina I.A., Ptushkin V.V., Khaspekova S.G., Shustova O.N., Pankrashkina M.M., et al. Evolution of Platelet Function in Adult Patients with Chronic Immune Thrombocytopenia on Romiplostim Treatment. *Br J Haematol* 2019; 187 (2): e38–42. DOI: 10.1111/bjh.16164
 15. Ignatova A.A., Karpova O.V., Trakhtman P.E., Rumiantsev S.A., Panteleev M.A. Functional Characteristics and Clinical Effectiveness of Platelet Concentrates Treated with Riboflavin and Ultraviolet Light in Plasma and in Platelet Additive Solution. *Vox Sang* 2016; 110 (3): 244–52. DOI: 10.1111/vox.12364
 16. Ignatova A.A., Ponomarenko E.A., Polokhov D.M., Suntsova E.V., Zharkov P.A., Fedorova D.V., et al. Flow Cytometry for Pediatric Platelets. *Platelets* 2019; 30 (4): 428–37. DOI: 10.1080/09537104.2018.1513473
 17. Koltsova E.M., Balashova E.N., Ignatova A.A., Poletaev A.V., Polokhov D.M., Kuprash A.D., et al. Impaired Platelet Activity and Hypercoagulation in Healthy Term and Moderately Preterm Newborns During the Early Neonatal Period. *Pediatr Res* 2019; 85 (1): 63–71. DOI: 10.1038/s41390-018-0184-8
 18. Obyednyy S.I., Artemenko E.O., Sveshnikova A.N., Ignatova A.A., Varlamova T.V., Gambaryan S., et al. Mechanisms of Increased Mitochondria-Dependent Necrosis in Wiskott-Aldrich Syndrome Platelets. *Haematologica* 2020; 105 (4): 1095–106. DOI: 10.3324/haematol.2018.214460
 19. Poletaev A.V., Koltsova E.M., Ignatova A.A., Kuprash A.D., Gitelson P.G., Sepoyan A.M., et al. Alterations in the Parameters of Classic, Global, and Innovative Assays of Hemostasis Caused by Sample Transportation Via Pneumatic Tube System. *Thromb Res* 2018; 170: 156–64. DOI: 10.1016/j.thromres.2018.08.024
 20. Suntsova E.V., Demina I.M., Ignatova A.A., Ershov N.M., Trubina N.M., Dobrynina J., et al. Bleeding Tendency and Platelet Function During Treatment with Romiplostim in Children with Severe Immune Thrombocytopenic Purpura. *Int J Hematol* 2017; 105 (6): 841–8. DOI: 10.1007/s12185-017-2207-3
 21. Koltsova E.M., Sorokina M.A., Pisyaryuk A.S., Povalyayev N.M., Ignatova A.A., Polokhov D.M., et al. Hypercoagulation Detected by Routine and Global Laboratory Hemostasis Assays in Patients with Infective Endocarditis. *PLoS One* 2021; 16 (12): e0261429. DOI: 10.1371/journal.pone.0261429
 22. Ponomarenko E.A., Ignatova A.A., Polokhov D.M., Khismatullina R.D., Kurilo D.S., Shcherbina A., et al. Healthy Pediatric Platelets Are Moderately Hyporeactive in Comparison with Adults' Platelets. *Platelets* 2022; 33 (5): 727–34. DOI: 10.1080/09537104.2021.1981848
 23. Polokhov D.M., Ershov N.M., Ignatova A.A., Ponomarenko E.A., Gaskova M.V., Zharkov P.A., et al. Platelet Function and Blood Coagulation System Status in Childhood Essential Thrombocythemia. *Platelets* 2020; 31 (8): 1001–11. DOI: 10.1080/09537104.2019.1704710
 24. Dmitrieva E.A., Nikitin E.A., Ignatova A.A., Vorobyev V.I., Poletaev A.V., Seregina E.A., et al. Platelet Function and Bleeding in Chronic Lymphocytic Leukemia and Mantle Cell Lymphoma Patients on Ibrutinib. *J Thromb Haemost* 2020; 18 (10): 2672–84. DOI: 10.1111/jth.14943
 25. Martyanov A., Panteleev M. Platelet Functional Responses and Signalling: The Molecular Relationship. Part 2: Receptors. *Systems Biology and Physiology Reports* 2021; 1 (3): 13.
 26. Sveshnikova A., Stepanyan M., Panteleev M. Platelet Functional Responses and Signalling: The Molecular Relationship. Part 1: Responses. *Systems Biology and Physiology Reports* 2021; 1 (1): 20.
 27. Podoplelova N.A., Nechipurenko D.Y., Ignatova A.A., Sveshnikova A.N., Panteleev M.A. Procoagulant Platelets: Mechanisms of Generation and Action. *Hamostaseologie* 2021; 41 (2): 146–53. DOI: 10.1055/a-1401-2706
 28. Podoplelova N., Soloveva P., Garzon Dasgupta A., Filkova A., Panteleev M. Analyzing the Interaction of Fluorescent-Labeled Proteins with Artificial Phospholipid Microvesicles Using Quantitative Flow Cytometry. *J Vis Exp* 2022; (182). DOI: 10.3791/63459
 29. Podoplelova N.A., Sveshnikova A.N., Kotova Y.N., Eckly A., Receveur N., Nechipurenko D.Y., et al. Coagulation Factors Bound to Procoagulant Platelets Concentrate in Cap Structures to Promote Clotting. *Blood* 2016; 128 (13): 1745–55. DOI: 10.1182/blood-2016-02-696898
 30. Yakimenko A.O., Verholomova F.Y., Kotova Y.N., Ataullakhanov F.I., Panteleev M.A. Identification of Different Proaggregatory Abilities of Activated Platelet Subpopulations. *Biophys J* 2012; 102 (10): 2261–9. DOI: 10.1016/j.bpj.2012.04.004
 31. Abaeva A.A., Canault M., Kotova Y.N., Obyednyy S.I., Yakimenko A.O., Podoplelova N.A., et al. Procoagulant Platelets Form an Alpha-Granule Protein-Covered "Cap" on Their Surface That Promotes Their Attachment to Aggregates. *J Biol Chem* 2013; 288 (41): 29621–32. DOI: 10.1074/jbc.M113.474163
 32. Kotova Y.N., Ataullakhanov F.I., Panteleev M.A. Formation of Coated Platelets Is Regulated by the Dense Granule Secretion of Adenosine 5'diphosphate Acting Via the P2y12 Receptor. *J Thromb Haemost* 2008; 6 (9): 1603–5. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2008.03052.x
 33. Panteleev M.A., Ananyeva N.M., Greco N.J., Ataullakhanov F.I., Saenko E.L. Two Subpopulations of Thrombin-Activated Platelets Differ in Their Binding of the Components of the Intrinsic Factor X-Activating Complex. *J Thromb Haemost* 2005; 3 (11): 2545–53. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2005.01616.x
 34. Nechipurenko D.Y., Receveur N., Yakimenko A.O., Shepelyuk T.O., Yakusheva A.A., Kerimov R.R., et al. Clot Contraction Drives the Translocation of Procoagulant Platelets to Thrombus Surface. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2019; 39 (1): 37–47. DOI: 10.3390/cells10030584
 35. Kovalenko T.A., Giraud M.N., Eckly A., Ribba A.S., Proamer F., Fraboulet S., et al. Asymmetrical Forces Dictate the Distribution and Morphology of Platelets in Blood Clots. *Cells* 2021; 10 (3): 584. DOI: 10.3390/cells10030584
 36. Andrianova I.A., Khabirova A.I., Ponomareva A.A., Peshkova A.D., Evtugina N.G., Le Minh G., et al. Chronic Immune Platelet Activation Is Followed by Platelet Refractoriness and Impaired Contractility. *Int J Mol Sci* 2022; 23 (13): 7336. DOI: 10.3390/ijms23137336
 37. Stalker T.J., Traxler E.A., Wu J., Wannenmacher K.M., Cermignano S.L., Voronov R., et al. Hierarchical Organization in the Hemostatic Response and Its Relationship to the Platelet-Signaling Network. *Blood* 2013; 121 (10): 1875–85. DOI: 10.1182/blood-2012-09-457739
 38. Welsh J.D., Poventud-Fuentes I., Sampietro S., Diamond S.L., Stalker T.J., Brass L.F. Hierarchical Organization of the Hemostatic Response to Penetrating Injuries in the Mouse Macrovasculature. *J Thromb Haemost* 2017; 15 (3): 526–37. DOI: 10.1111/jth.13600
 39. Kaneva V.N., Dunster J.L., Volpert V., Ataullakhanov F., Panteleev M.A., Nechipurenko D.Y. Modeling Thrombus Shell: Linking Adhesion Receptor Properties and Macroscopic Dynamics. *Biophys J* 2021; 120 (2): 334–51. DOI: 10.1016/j.bpj.2020.10.049
 40. Masalceva A.A., Kaneva V.N., Panteleev M.A., Ataullakhanov F., Volpert V., Afanasyev I., et al. Analysis of Microvascular Thrombus Mechanobiology with a Novel Particle-Based Model. *J Biomech* 2022; 130: 110801. DOI: 10.1016/j.jbiomech.2021.110801
 41. Shakhidzhanov S.S., Shaturny V.I., Panteleev M.A., Sveshnikova A.N. Modulation and Pre-Amplification of Par1 Signaling by Adp Acting Via the P2y12 Receptor During Platelet Subpopulation Formation. *Biochim Biophys Acta* 2015; 1850 (12): 2518–29. DOI: 10.1016/j.bbagen.2015.09.013

© 2024 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ
им. Дмитрия Рогачева»
Минздрава России
Поступила 13.10.2023
Принята к печати 16.01.2024



EDN: UWIRCT

Контактная информация:

Блескин Дмитрий Алексеевич,
младший научный сотрудник лаборатории
биореологии и биомеханики
Центра теоретических проблем физико-
химической фармакологии РАН
Адрес: 109029, Москва,
ул. Средняя Калитниковская, 30
E-mail: dmitriybleskin@gmail.com

© 2024 by «D. Rogachev NMRCPH01»

Received 13.10.2023
Accepted 16.01.2024

Correspondence:

Dmitry A. Bleskin,
a junior researcher at the Laboratory
of Biorheology and Biomechanics of the
Center for Theoretical Problems of Physical
and Chemical Pharmacology,
Russian Academy of Sciences
Address: 30 Srednyaya Kalitnikovskaya St.,
Moscow 109029, Russia
E-mail: dmitriybleskin@gmail.com

DOI: 10.24287/1726-1708-2024-23-2-198-207

Структурно-функциональные свойства тромбомодулина

Д.А. Блескин^{1, 2}, Е.М. Кольцова^{1, 3}, Д.Ю. Нечипуренко^{1, 3, 4}

¹ФГБУН «Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии» РАН, Москва

²ФГБУН «Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля» РАН, Москва

³ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, Москва

⁴ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», Москва

Тромбомодулин (ТМ) является неотъемлемым компонентом мультимолекулярной системы, локализованной главным образом в эндотелии сосудов и регулирующей ряд важнейших физиологических ответов организма, включая свертывание крови и воспаление. В данном обзоре приведены известные на сегодняшний день ключевые функции ТМ в контексте его структуры. В первой части обзора рассмотрена доменная структура молекулы ТМ и описаны ключевые молекулярные процессы, в которых участвуют соответствующие домены. Вторая часть обзора посвящена более детальному анализу участия молекулы ТМ в регуляции физиологических процессов в организме человека. Так как центральная функция ТМ связана с регуляцией гемостатического ответа на повреждение сосудистой стенки, отдельное внимание уделяется роли данной молекулы в активации протеина С и тромбин-активируемого ингибитора фибринолиза, ответственного за остановку процесса фибринолиза. В работе также кратко описаны некоторые данные о роли ТМ в митогенезе различных типов клеток и процессах ангиогенеза. Отдельный раздел обзора посвящен современным представлениям об участии ТМ в регуляции воспалительных реакций организма. В данном разделе описаны ключевые механизмы, за счет которых ТМ способен ограничивать уровень провоспалительных сигналов, а также регулировать процессы активации системы комплемента.

Ключевые слова: тромбомодулин, эндотелиальный рецептор к протеину С, путь протеина С, тромбин, система гемостаза

Блескин Д.А. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2024; 23 (2): 198–207. DOI: 10.24287/1726-1708-2024-23-2-198-207

Structural and functional properties of thrombomodulin

D.A. Bleskin^{1, 2}, E.M. Koltsova^{1, 3}, D.Yu. Nechipurenko^{1, 3, 4}

¹Center for Theoretical Problems of Physical and Chemical Pharmacology, Russian Academy of Sciences, Moscow

²N.M. Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow

³Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology of Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow

⁴M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow

Thrombomodulin (TM) is an integral component of a multimolecular system, localized primarily in the vascular endothelium, and regulating a number of crucial physiological responses of an organism, including blood coagulation and inflammation. This review presents the currently known key functions of TM in the context of its structure. The first part of the review examines the domain structure of the TM molecule and describes the key molecular processes in which the corresponding domains participate. The second part of the review is devoted to a more detailed analysis of the TM molecule participation in the regulation of physiological processes in the human organism. Since the main function of TM is associated with the regulation of the hemostatic response to vascular wall injury, special attention is paid to the role of this molecule in the activation of protein C and thrombin-activated fibrinolysis inhibitor, which is responsible for stopping fibrinolysis. In addition, the review briefly describes some data on the role of TM in the mitogenesis of various cell types and in angiogenesis processes. One section of the review is devoted to the current knowledge of TM participation in the regulation of inflammatory reactions of the body. This section describes the key mechanisms through which TM is able to limit the level of pro-inflammatory signals, as well as regulate the processes of complement system activation.

Key words: thrombomodulin, endothelial protein C receptor, protein C pathway, thrombin, hemostatic system

Bleskin D.A., et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology 2024; 23 (2): 198–207.
DOI: 10.24287/1726-1708-2024-23-2-198-207

Гемостатический ответ на повреждение сосудистой стенки имеет импульсный характер: динамика процесса характеризуется быстрой активацией обоих звеньев гемостаза, ростом гемостатического тромба и последующей стабилизацией его размера. Считается, что такая динамика обеспечивается большим количеством положительных и отрицательных обратных связей [1–3].

Каскад свертывания крови, который традиционно относят ко вторичному звену гемостаза, также имеет

как петли положительной обратной связи, увеличивающие наработку центрального фермента каскада – тромбина, так и отрицательные обратные связи, подавляющие его производство для того, чтобы кровь не начала неконтролируемо сворачиваться во всем сосудистом русле [4, 5]. Одной из ключевых систем, отвечающих за уменьшение прокоагулянтной активности тромбина, является система протеина С (РС) [6, 7].

Тромбомодулин (ТМ), которому посвящен данный обзор, является первым и центральным звеном в

активации системы PC: будучи связанным с тромбином, он образует с ним каталитический комплекс, переводящий PC из неактивного состояния в активное. Помимо своей основной роли в системе свертывания крови ТМ также участвует в активации одного из компонентов системы фибринолиза – тромбин-активируемого ингибитора фибринолиза (ТАФИ) и принимает участие в реакциях воспаления, пролиферации и ангиогенеза [8–11].

Данный обзор посвящен современным представлениям о структуре и функциях ТМ.

Структура тромбомодулина

Человеческий ТМ представляет собой трансмембранный гликопротеин типа 1, состоящий из 557 аминокислотных остатков, молекулярный вес которого составляет 78 кДа. ТМ кодируется безинтронным геном *THBD* [12] и присутствует в организме в 2 формах – растворимой и экспрессируемой на поверхности клеток. Растворимый ТМ в норме обнаруживается в человеческой плазме в концентрации до 10 нг/мл, а также в моче [13]. Мембранная (т. е. нерастворимая) форма ТМ экспрессируется на поверхности эндотелия кровеносных и лимфатических сосудов [14]. Кроме этого, нерастворимый (т. е. трансмембранный) ТМ обнаруживается в тромбоцитах человека, однако его количество в мембране тромбоцитов достаточно низкое – около 60 молекул на тромбоцит [15], в то время как на поверхности человеческих эндотелиальных клеток из вены пуповины (HUVEC) – 50 000–100 000 молекул на клетку [16–18].

Следует отметить, что ТМ также был найден на поверхности кератиноцитов [19], остеобластов [20], мезангиальных клеток [21] и циркулирующих лейкоцитов, таких как нейтрофилы и моноциты [22, 23].

Полноразмерный человеческий ТМ (т. е. его нерастворимая форма) состоит из 5 структурных регионов [24] (рисунк 1). Первый регион, начиная с N-концевой части, представляет из себя лектин-подобный домен с небольшим гидрофобным перешейком, в него входят первые 226 аминокислотных остатков. N-терминальный лектин-подобный домен C-типа (CTLD) состоит из 155 аминокислотных остатков и схож по своей структуре с аналогичным доменом у белков CD93, CLEC14A и CD248 (эндосалин), все эти белки играют роль в воспалении, реакциях врожденного иммунитета и онкологических заболеваниях [9, 25]. Данный домен имеет 2 сайта для N-гликозилирования: сайт связывания иона Ca^{2+} и сайт распознавания углеводов [26]. В промежутке между CTLD и следующим регионом расположен гидрофобный мостик, содержащий аминокислотные остатки 156–226.

Далее в направлении C-конца следует регион, содержащий 6 подобных эпидермальному фактору

роста (EGF) доменов (аминокислотные остатки 227–462). Данные домены отвечают за участие ТМ в процессах свертывания крови и фибринолиза. В данном регионе присутствует 2 сайта N-гликозилирования и 2 метионина, чувствительных к окислению. При этом окисление метионина 388 (Met388), располагающегося в зоне между 4-м и 5-м EGF-подобными доменами, H_2O_2 или хлорамином Т, приводит к падению антикоагулянтной кофакторной активности ТМ на 75–90% [27]. Также к существенной инактивации ТМ через окисление Met388 приводит и ионизирующее излучение [28]. Пространственное расположение EGF456 (ответственен за взаимодействие с тромбином и PC) напоминает Y-подобную структуру (рисунк 2) [29]. В 4-м EGF-домene присутствует сайт связывания кальция (Asp349), за счет которого происходит взаимодействие комплекса ТМ–тромбин (ТМ–Т) с Gla-доменом PC [30].

Третий структурный регион ТМ располагается в пределах 463–497-го аминокислотных остатков и представляет собой область, богатую серином, треонином или пролином, и имеет сайты связывания хондроитина сульфата [31]. Было показано, что хондроитина сульфат участвует во взаимодействии ТМ с тромбином [32, 33].

Четвертый регион представлен гидрофобной трансмембранной частью ТМ (аминокислотные остатки 498–521).

Пятый регион представлен 36 аминокислотными остатками (522–557), это C-концевая часть ТМ, располагающаяся в цитоплазматической части мембраны. Было показано, что в этой части ТМ располагается 2 сайта связывания с N-концом эзрина (большой в аминокислотных остатках 522–539 и маленький в 540–557) – белка, служащего линкером между актиновым цитоскелетом и мембраной клетки [34].

Растворимый ТМ является надмембранной частью полноразмерного ТМ, появляющегося в плазме при повреждении эндотелия. В 1994 г. из человеческой мочи было выделено 2 типа ТМ с разными молекулярными массами – 63/57 кДа и 35 кДа [35]. Растворимый ТМ с большей молекулярной массой содержал EGF-подобные домены, так как мог связывать тромбин и активировать PC. Однако позднее было отмечено, что фрагменты ТМ имеют большее разнообразие вследствие различных механизмов шэддинга [36]. Шэддинг ТМ происходит при появлении провоспалительных факторов ($\text{TNF-}\alpha$, IL-1, IFN- γ) и под влиянием металлопротеиназ [37]. Помимо этого, есть еще протеазы ряда ромбоидов: эластаза, протеиназа-3 и катепсин G [38], которые также участвуют в шэддинге ТМ. Кроме того, циркулирующий полноразмерный ТМ находят в составе микровезикул, которые образуются вследствие повреждения [39] или активации [36] эндотелия.

Рисунок 1

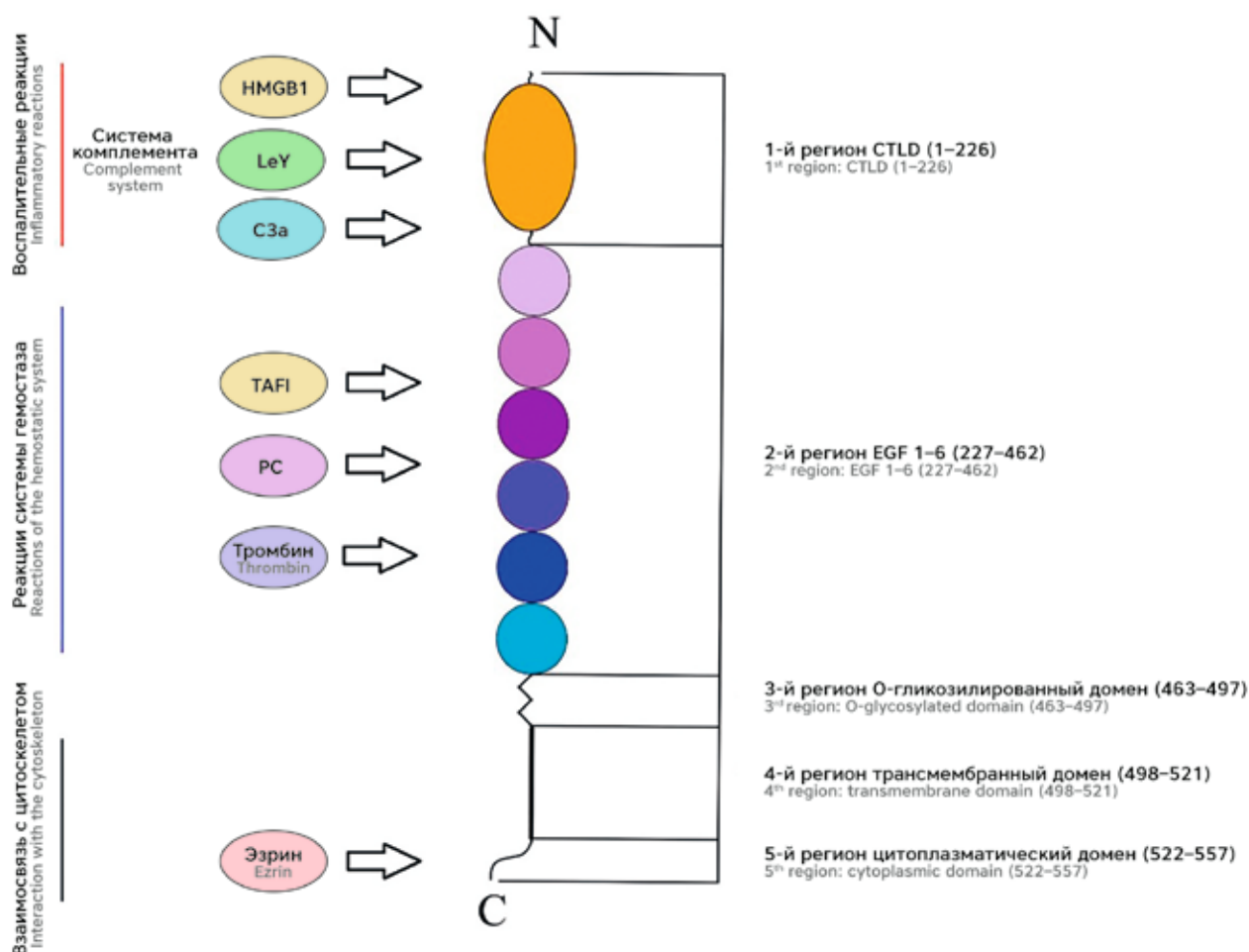
Схема структуры ТМ

ТМ состоит из 5 структурных регионов. Лектин-подобный домен ТМ препятствует активации комплемента и воспалению. Первый регион ТМ также имеет несколько предполагаемых лигандов, включая, например, фибронектин, HMGB1 и Lewis γ (LeY), которые влияют на миграцию, воспаление и ангиогенез. Второй и третий регионы связываются с тромбином и, образуя с ним комплекс, увеличивают активацию РС, а также тканевый ингибитор активатора фибринолиза, тем самым влияя на систему гемостаза. Соединенный с эктодоменом через четвертый регион цитоплазматический регион в некоторых клетках связывается с адаптерным белком эзрином, который изменяет актиновый цитоскелет и тем самым помогает в образовании подосом и модулирует миграцию клеток

Figure 1

Schematic of thrombomodulin (TM) structure

TM consists of five structural regions. The lectin-like domain of TM interferes with complement activation and inflammation. The first region of TM also has several putative ligands, including, for example, fibronectin, HMGB1, and Lewis γ (LeY), which impact migration, inflammation, and angiogenesis. The second and third regions bind to thrombin and, by forming a complex with it, increase the activation of protein C (PC), as well as tissue inhibitor of fibrinolysis activator, thus having an impact on the hemostatic system. Connected to the ectodomain via the fourth region, the cytoplasmic region binds, in some cells, to the adaptor protein ezrin, which alters the actin cytoskeleton and thus promotes podosome formation and modulates cell migration



Ключевые функции тромбомодулина

Гемостаз: регуляция роста тромба посредством активации РС

Основной функцией, которую ТМ играет в процессах гемостаза, является ингибирование процесса наработки тромбина за счет активации системы РС.

Активация РС происходит за счет комплекса ТМ–Т. Данный комплекс образуется при взаимодействии 5-го и 6-го EGF-доменов ТМ с тромбином через анион-связывающий экзосайт-1 тромбина [40–42]. При этом различные лиганды, связывающие экзосайт-2 тромбина, могут модулировать степень связывания РС комплексом ТМ–Т, снижая ее, тем самым

уменьшая скорость его активации [43]. Связанный таким образом тромбин меняет свою субстратную специфичность и теряет способность протеолитически расщеплять фибриноген и другие факторы, которые требуют взаимодействия с экзосайтом-1 тромбина (V, VIII, PAR-1 и др.) [44] и приобретает способность активировать РС. В свою очередь, активированный РС активно подавляет наработку тромбина, влияя на положительные обратные связи в каскаде свертывания, протеолитически расщепляя Va и VIIIa. Данные молекулы являются важными кофакторами, ответственными за усиление выработки тромбина за счет образования комплексов протромбиназы (Xa + Va) и внутренней теназы (IXa + VIIIa).

Рисунок 2

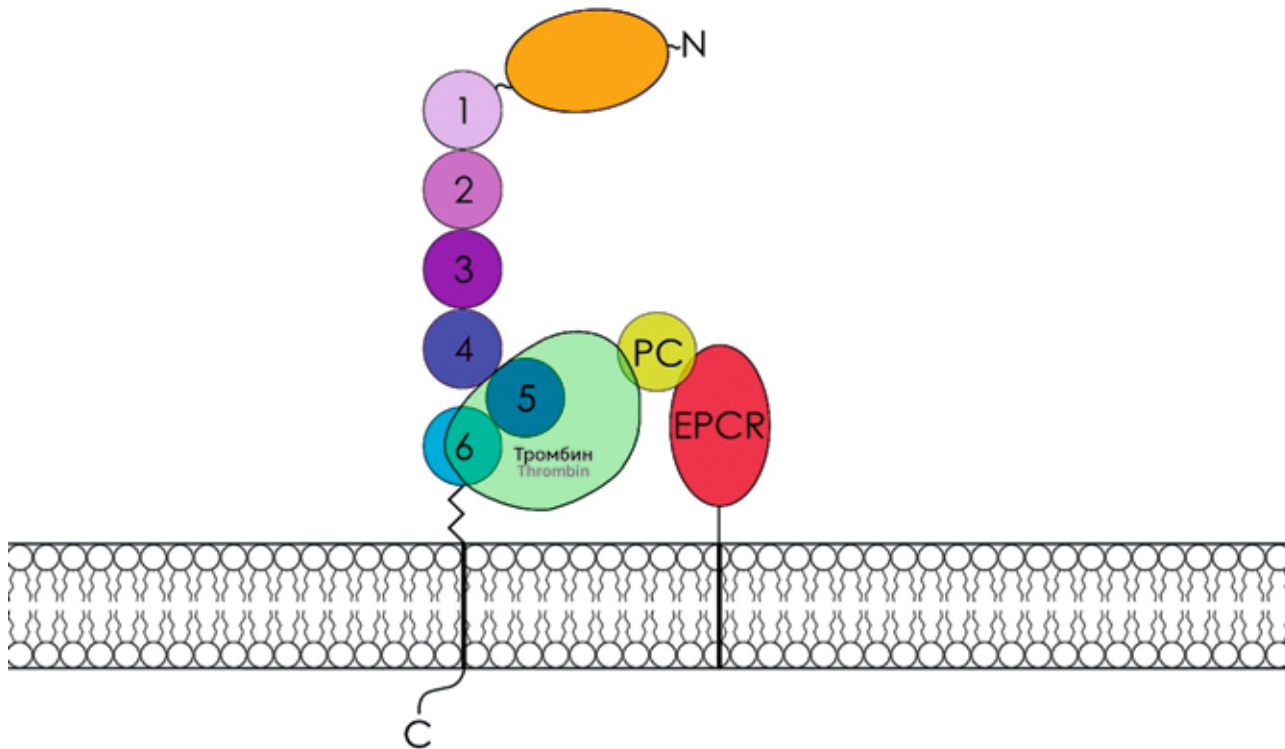
Схема взаимодействия ТМ с тромбином с учетом структурных особенностей

ТМ связывается с тромбином через EGF-домены 5 и 6. В свою очередь, тромбин при содействии эндотелиального рецептора к РС (EPCR) активирует его

Figure 2

Schematic of interaction of TM with thrombin, taking into account the structural features

TM binds to thrombin via EGF domain 5 and 6. Thrombin, in its turn, assisted by the endothelial receptor for PC (EPCR), activates it



Недавние исследования *in vivo* продемонстрировали важный вклад системы PC в ограничение роста тромба при лазер-индуцированном повреждении сосудистой стенки артериол мыши [7].

Образование комплекса ТМ–Т увеличивает скорость активации PC примерно на 3 порядка [45]. Также имеются данные, свидетельствующие о том, что в присутствии EPCR скорость активации PC увеличивается еще на порядок (5–20 раз) [46]. EPCR, по всей видимости, служит для локального увеличения концентрации PC рядом с поверхностью эндотелия с комплексом ТМ–Т [47]. Помимо EPCR увеличение скорости активации PC комплексом ТМ–Т дает тромбоцитарный фактор 4 (PF-4), при этом в то время как EPCR увеличивает активность только мембранного ТМ, PF-4 ускоряет работу и растворимого ТМ примерно в 25 раз [48]. Однако было показано, что PF-4 в то же время снижает антикоагулянтные функции активированного PC через ингибирование протеин S-зависимого протеолиза Va в 3–5 раз [49]. Здесь следует отметить, что протеин S является витамин-K-зависимым кофактором активированного PC, существенно увеличивающим его протеолитическую активность по отношению к факторам Va и VIIIa [50, 51].

Немаловажным фактором, влияющим на активность комплекса ТМ–Т, является концентрация

свободных ионов кальция, которые участвуют в связывании Gla-домена PC комплексом ТМ–Т [52]. Было показано, что наибольшая ферментативная активность комплекса в активации PC достигается при 0,3–0,8 мМ кальция в среде [35]. Несколько иные получились результаты при активации PC только 4–6-м доменами EGF, однако концентрация кальция, при которой активность комплекса была на пике, также не превышала 1 мМ [53, 54]. Известно, что концентрация свободного кальция в крови составляет $1,34 \pm 0,2$ мМ [55]. При этом локальная концентрация кальция в момент выхода плотных гранул из активированных тромбоцитов в зоне повреждения должна подниматься или оставаться на прежнем уровне, так как в плотных гранулах она достигает 2 М [56]. Таким образом, секреция плотных гранул активированными тромбоцитами вблизи поврежденного эндотелия может регулировать активность ТМ.

Активация TAFI и остановка фибринолиза

Помимо активации PC комплекс ТМ–Т также приобретает возможность активирования TAFI (или карбоксипептидаза B). За взаимодействие комплекса с TAFI ответственен 3-й EGF-домен, что было продемонстрировано при помощи рекомбинантных фраг-

ментов ТМ [57]. Интересно, что окисление Met388, которое практически останавливает активацию РС в комплексе ТМ–Т, практически не влияет на активацию TAFI [58]. TAFI, в свою очередь, останавливает процесс фибринолиза путем отщепления остатков лизина от С-концов фибрина, препятствуя тем самым связыванию плазмينا, плазминогена и тканевого активатора плазминогена с фибрином и таким образом блокируя лизис фибрина и ингибируя образование плазмينا.

Пролиферация и ангиогенез

Еще одной важной для гемостаза функцией ТМ является запуск сигналов к делению клетки через EGF-домены ТМ. Как было описано ранее, в результате шэддинга образуется 2 типа растворимого ТМ, один из которых несет в себе EGF-домены. В исследовании H.L. Wu и соавт. было показано, что шэддинг лектин-подобного домена ТМ под воздействием LPA (лизофосфатидная кислота) приводит к полному раскрытию EGF-подобных доменов ТМ для связывания с EGFR (рецептор к эпителиальному фактору роста), что, в свою очередь, стимулирует пролиферативную активность эндотелиальных клеток [59]. Также были проведены исследования, которые показали, что рекомбинантный EGF23-фрагмент ТМ активирует FGFR1 (рецептор к фактору роста фибробластов-1) и способствует пролиферации эндотелия, его миграции и образованию сосуда как *in vitro*, так *in vivo* [60]. Помимо пролиферации эндотелия ТМ также играет роль усилителя в пролиферации эпителия у мышей [61]. Кроме того, при помощи мышиных моделей было показано, что ТМ способствует дифференцировке остеобластов и лечению костей при диабете *in vivo* [62].

Помимо пролиферации ТМ также оказывает цитопротективный эффект благодаря активации PAR1 и PAR3 опосредованно через активированный РС, связанный с EPCR [63], или через beta-arrestin-2, связанный с PAR1, не прибегая к протеазному расщеплению рецептора [64, 65].

Более того, ТМ является одним из важных молекулярных компонентов ангиогенеза: Куо и соавт. обнаружили, что ТМ участвует в процессе образования подосом при инвазии эндотелиальных клеток в базальную мембрану при разветвлении и образовании новых сосудов через взаимосвязь VEGF-ROCK2-ТМ-F-actin. В клетке под действием VEGF (фактор роста эндотелия сосуда) через ROCK2 повышается экспрессия ТМ. ТМ, в свою очередь, через цитоплазматический домен связан с зерином и актиновым цитоскелетом. Таким образом, липидные рафты с высоким содержанием ТМ проявили себя как точки образования и стабилизации подосом в клетках HUVEC [11, 66].

Роль тромбомодулина в регуляции воспаления

На сегодняшний день известно, что ТМ является достаточно активным компонентом воспалительного ответа. Основную роль в процессах, регулирующих воспалительные реакции в молекуле ТМ, играет CTLD. Впервые собственные противовоспалительные свойства этого домена были показаны *in vivo* E.M. Conway и соавт. при помощи мышиной модели с рекомбинантным лектин-подобным доменом [67]. Было показано, что у мутантных мышей без лектин-подобного домена ТМ повышались уровни провоспалительных факторов, таких как TNF и IL-1, при стимуляции липополисахаридов (LPS), а также увеличивалась экспрессия молекул адгезии ICAM и VCAM. В дальнейшем на мышиных моделях воспаления было показано, что CTLD снижает повреждения легких при ишемии-реперфузии, снижая локальное количество клеток иммунитета и концентрации провоспалительных факторов [68]. Далее при помощи прижизненной визуализации внутри сосуда мыши было продемонстрировано, что CTLD ТМ, введенный внутривенно, приводит к увеличению скорости роллинга нейтрофилов по поверхности эндотелия, вследствие чего происходило снижение количества нейтрофилов в зоне воспаления [69].

Помимо этого, во взаимодействии ТМ с нейтрофилами существует еще один эффект. Известно, что в зоне воспаления нейтрофилы являются первой линией защиты от патогенов, и они используют несколько эффекторных механизмов, среди которых также выделяют и выброс нейтрофильных внеклеточных ловушек (NET). NET представляют из себя модифицированный хроматин с прикрепленными белками ядра, гранул и цитоплазмы [70], которые также играют важную роль в тромбообразовании [71]. Было отмечено, что растворимый рекомбинантный ТМ подавляет образование NET через связывание с Мас-1 (антиген макрофагов-1) на поверхности нейтрофилов, и таким образом снижая повреждение эндотелия [72]. Данные эксперименты проводились с использованием высоких концентраций растворимого ТМ (200 мкг/мл), что на 3–4 порядка больше обнаруживаемого в крови растворимого ТМ в норме, однако это все равно показывает его роль в этом процессе (возможно, локальные концентрации растворимого ТМ в зоне воспаления выше общей в крови). Также NET влияют и на общую способность системы ТМ–Т–РС ингибировать образование тромбина. Активированный РС и ТМ связываются с гистонами – ядерными белками, входящими в состав NET, что, по всей видимости, может увеличивать концентрацию тромбина за счет уменьшения антикоагулянтного эффекта ТМ [73].

Также примечательна способность CTLD связывать LeY – олигосахаридные остатки, которые

экспрессируются на активированном эндотелии. С одной стороны, эта способность проявляется благодаря молекулам ТМ, экспрессируемым на моноцитах: по всей видимости, ТМ является неким рецептором к остаткам LeY и участвует в запуске фосфорилирования р38 MAP-киназы и активации В2-интегринов, что способствует первичной адгезии моноцита к эндотелию [74]. С другой стороны, LeY экспрессируется в LPS некоторых грамотрицательных бактерий, таких как *Helicobacter pylori*, *Klebsiella pneumoniae* и *Escherichia Coli*. В данном контексте LPS выступают мощными эндотоксинами, которые вызывают сильный иммунный ответ через повышение провоспалительных медиаторов. CTLD, связывая LeY на бактериях, приводит к их агглютинации и фагоцитозу макрофагами, при этом снижая и уровень LPS [75]. Также было продемонстрировано, что связывание LeY на поверхности HUVEC с рекомбинантным CTLD ТМ приводило к ингибированию ангиогенеза *in vitro*, зависящему от концентраций эндогенного CTLD [76].

Помимо LeY CTLD также связывает белок HMGB1 (high mobility group box 1), который появляется в результате некроза клеток [72] или секретируется активированными моноцитами в зоне воспаления [77]. Эти клеточные продукты связываются со множеством различных рецепторов [78], но основное взаимодействие, через которое начинается воспаление, происходит через RAGE (рецептор конечных продуктов гликозилирования) или TLR-4 (толл-подобный рецептор 4), которые экспрессируются на поверхности эндотелия вместе с ТМ. Таким образом, ТМ, связывая HMGB1 через CTLD, ограничивает уровень провоспалительных сигналов через вышеприведенные рецепторы [79]. Следует отметить, что после связывания HMGB1 с комплексом ТМ–Т происходит его протеолитическая деградация через активный сайт Т и связь со 2-м доменом EGF [10].

Еще одним свойством ТМ является его способность оказывать влияние на систему комплемента. Взаимодействие лектин-подобного домена ТМ с компонентом комплемента С3а [80] приводит к инактивации этой молекулы. Также ТМ в роли кофактора для фактора комплемента Н ингибирует фактор комплемента С3б [81].

Хотя за основное участие в регуляции воспалительных процессов принимают CTLD ТМ, также была показана провоспалительная функция комплекса ТМ–Т. Тромбин относится к провоспалительным факторам в связи с протеолитическим расщеплением рецепторов, активируемых протеазой (PAR-1, PAR-3 и PAR-4), однако PAR-2 не подвергался расщеплению тромбином при его физиологических концентрациях. Известно, что ТМ участвует как корецептор тромбина в расщеплении PAR2, и ключевую роль в этом процессе играет 5-й домен EGF ТМ [82].

Методы диагностики и терапия на основе тромбомодулина

Как было отмечено выше, ТМ выполняет множество функций, а его активность может значительно влиять на все процессы, в которых он задействован. Однако в клинических условиях оценить активность мембранной фракции ТМ затруднительно, поэтому используют оценку растворимого ТМ в крови. Принято считать, что располагающийся на эндотелии ТМ отвечает в первую очередь за тромборезистентность сосудистой стенки. При воспалительных заболеваниях, влияющих на поверхность сосудов, происходит шеддинг ТМ, в результате которого он превращается в растворимую форму. Таким образом, повышение уровня растворимого ТМ в клинических исследованиях рассматривается как один из диагностических маркеров для выявления эндотелиальной дисфункции [83, 84] и определения прогрессии и тяжести таких заболеваний, как атеросклероз [85, 86], диссеминированное внутрисосудистое свертывание [87, 88], гемато-уремический синдром [89, 90], хроническая венозная недостаточность [91], сепсис [92, 93], цирроз печени [94], повреждение почек и легких.

Также ТМ используется в модифицированном протоколе теста генерации тромбина, который служит для глобальной оценки не только системы свертывания, но и системы остановки роста сгустка за счет системы активированного РС. Впервые она была применена для оценки состояния пациентов с циррозом печени, в этом случае наблюдается дефицит факторов коагулянтной системы и, как выяснилось, факторов антикоагулянтной системы [95], значимых отличий у пациентов с циррозом и в группе контроля не наблюдалось. Также таких отличий не наблюдалось и у пациентов с циррозом и инфекцией [96]. При этом данная модификация позволяет определить и оценить истощение системы РС. Данная ситуация наблюдается у пациентов с ишемической болезнью сердца, что, в свою очередь, ведет к повышению рисков тромбозов у людей с данным заболеванием при повторной операционной реваскуляризации миокарда [97].

Помимо того, что ТМ используется для диагностики, его также применяют в терапии как антикоагулянт при сепсисе, диссеминированном внутрисосудистом свертывании, респираторных, почечных и сердечных заболеваниях [72, 98].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

ТМ является мультифункциональной молекулой, участвующей в регуляции нескольких важнейших физиологических ответов организма человека, включая свертывание крови и воспаление. Данная

мультифункциональность обеспечивается сложной доменной структурой ТМ, причем ключевые функциональные домены расположены вне клетки и участвуют в образовании специфичных комплексов с ключевыми молекулами-партнерами – тромбином, HMGB1, C3a и др. В своей растворимой форме отдельные домены ТМ также способны связываться с рецепторами на поверхности клеток, например, с рецептором к эпителиальному фактору роста. Следует отметить, что часть исследований, приведенных в данном обзоре, была проведена с использованием животных моделей, поэтому необходимо с осторожностью интерпретировать эти данные в контексте аналогичных процессов в организме человека. Тем не менее сегодня не вызывает сомнений,

что ТМ обеспечивает взаимосвязь и регуляцию сразу нескольких физиологических систем в организме человека и поэтому представляется перспективным терапевтическим агентом для коррекции ряда жизнеугрожающих состояний, в частности обусловленных процессом тромбовоспаления.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда №22-24-01028.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

ORCID

Koltsova E.M. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0167-6726>

Литература / References

- Hemker H.C., Kessels H. Feedback mechanisms in coagulation. *Pathophysiol Haemost Thromb* 1991; 21 (4): 189–96.
- Атауллаханов Ф.И., Зарница В.И., Кондратович А.Ю., Лобанова Е.С., Сарбаш В.И. Особый класс автоволн – автоволны с остановкой – определяет пространственную динамику свертывания крови. *Успехи физических наук* 2002; 172 (6): 671–90. DOI: 10.1070/PU2002v045n06ABEH001090 [Ataullakhanov F.I., Zarnitsyna V.I., Kondratovich A.Yu., Lobanova E.S., Sarbash V.I. A new class of stopping self-sustained waves: a factor determining the spatial dynamics of blood coagulation. *Phys. Usp.* 2002; 172 (6): 671–90. (In Russ.)].
- Пантелеев М.А., Котова Я.Н., Токарев А.А., Атауллаханов Ф.И. Механизмы регуляции свертывания крови. *Терапевтический архив* 2008; 80 (7): 88–91. [Panteleev M.A., Kotova I.N., Tokarev A.A., Ataullakhanov F.I. Blood coagulation: mechanisms of regulation. *Therapeutic Archive* 2008; 80 (7): 88–91. (In Russ.)].
- Panteleev M.A., Ovanesov M.V., Kireev D.A., Shibeko A.M., Sinauridze E.I., Ananyeva N.M., et al. Spatial propagation and localization of blood coagulation are regulated by intrinsic and protein C pathways, respectively. *Biophys J* 2006; 90 (5): 1489–500.
- Пантелеев М.А., Атауллаханов Ф.И. Свертывание крови: биохимические основы. *Клиническая онкогематология* 2008; 1 (1): 50–62. [Panteleev M.A., Ataullakhanov F.I. Blood coagulation: basic biochemistry. *Clinical Oncohematology* 2008; 1 (1): 50–62. (In Russ.)].
- Amiral J., Seghatchian J. Revisiting the activated protein C-protein S-thrombomodulin ternary pathway: Impact of new understanding on its laboratory investigation. *Transfus Apher Sci* 2019; 58 (4): 538–44.
- Marar T.T., Matzko C.N., Wu J., Esmon C.T., Sinno T., Brass L.F., et al. Thrombin spatial distribution determines protein C activation during hemostasis and thrombosis. *Blood* 2022; 139 (12): 1892–902.
- Loghmani H., Conway E.M. Exploring traditional and nontraditional roles for thrombomodulin. *Blood* 2018; 132 (2): 148–58.
- Khan K.A., McMurray J.L., Mohammed F., Bicknell R. C-type lectin domain group 14 proteins in vascular biology, cancer and inflammation. *FEBS J* 2019; 286 (17): 3299–332.
- Hermann D.M., Kleinschnitz C. Thrombomodulin, a Master Switch Controlling Poststroke Microvascular Remodeling and Angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2020; 40 (12): 2818–20.
- Alonso F., Dong Y., Génot E. Thrombomodulin, an Unexpected New Player in Endothelial Cell Invasion During Angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2021; 41 (5): 1672–4.
- Jackman R.W., Beeler D.L., Fritze L., Soff G., Rosenberg R.D. Human thrombomodulin gene is intron depleted: Nucleic acid sequences of the cDNA and gene predict protein structure and suggest site of regulatory control. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84 (18): 6425–9.
- Ishii H., Majerus P.W. Thrombomodulin is present in human plasma and urine. *J Clin Invest* 1985; 76 (6): 2178–81.
- Maruyama I., Elliott Bell C., Majerus P.W. Thrombomodulin is found on endothelium of arteries, veins, capillaries, and lymphatics, and on syncytiotrophoblast of human placenta. *J Cell Biol* 1985; 101 (2): 363–71.
- Suzuki K., Nishioka J., Hayashi T., Kosaka Y. Functionally active thrombomodulin is present in human platelets. *J Biochem* 1988; 104 (4): 628–32.
- Maruyama I., Majerus P.W. The turnover of thrombin-thrombomodulin complex in cultured human umbilical vein endothelial cells and A549 lung cancer cells. Endocytosis and degradation of thrombin. *J Biol Chem* 1985; 260 (29): 15432–8.
- Xu J., Esmon N.L., Esmon C.T. Reconstitution of the human endothelial cell protein C receptor with thrombomodulin in phosphatidylcholine vesicles enhances protein C activation. *J Biol Chem* 1999; 274 (10): 6704–10.
- Campbell J.E., Brummel-Ziedins K.E., Butenas S., Mann K.G. Cellular regulation of blood coagulation: A model for venous stasis. *Blood* 2010; 116 (26): 6082–91.
- Senet P., Peyri N., Berard M., Dubertret L., Boffa M.C. Thrombomodulin,

- a functional surface protein on human keratinocytes, is regulated by retinoic acid. *Arch Dermatol Res* 1997; 289 (3): 151–7.
20. Maillard C. Thrombomodulin is synthesized by osteoblasts, stimulated by 1,25-(OH)₂D₃ and activates protein C at their cell membrane. *Endocrinology* 1993; 133 (2): 668–74.
 21. Pruna A., Peyri N., Berard M., Boffa M.C. Thrombomodulin is synthesized by human mesangial cells. *Kidney Int* 1997; 51 (3): 687–93.
 22. Conway E., Nowakowski B., Steiner-Mosonyi M. Human neutrophils synthesize thrombomodulin that does not promote thrombin-dependent protein C activation. *Blood* 1992; 80 (5): 1254–63.
 23. McCachren S.S., Diggs J., Weinberg J.B., Dittman W.A. Thrombomodulin expression by human blood monocytes and by human synovial tissue lining macrophages. *Blood* 1991; 78 (12): 3128–32.
 24. Suzuki K. Gene structure of human thrombomodulin, a thrombin receptor on endothelium acting as a cofactor for thrombin-catalyzed activation of protein C. *Nihon Ketsueki Gakkai Zasshi* 1988; 51 (8): 1655–64.
 25. Bohlson S., Greenlee M., Sullivan S. CD93 and Related Family Members: Their Role in Innate Immunity. *Curr Drug Targets* 2008; 9 (2): 130–8.
 26. Huang H.C., Shi G.Y., Jiang S.J., Shi C.S., Wu C.M., Yang H.Y., et al. Thrombomodulin-mediated cell adhesion: Involvement of its lectin-like domain. *J Biol Chem* 2003; 278 (47): 46750–9.
 27. Glaser C.B., Morser J., Clarke J.H., Blasko E., McLean K., Kuhn I., et al. Oxidation of a specific methionine in thrombomodulin by activated neutrophil products blocks cofactor activity: A potential rapid mechanism for modulation of coagulation. *J Clin Invest* 1992; 90 (6): 2565–73.
 28. Ross C.C., MacLeod S.L., Plaxco J.R., Froude J.W., Fink L.M., Wang J., et al. Inactivation of Thrombomodulin by Ionizing Radiation in a Cell-Free System: Possible Implications for Radiation Responses in Vascular Endothelium. *Radiat Res* 2008; 23 (1): 408–16.
 29. Fuentes-Prior P., Iwanaga Y., Huber R., Paglia R., Rumennik G., Seto M., et al. Structural basis for the anticoagulant activity of the thrombin-thrombomodulin complex. *Nature* 2000; 404 (6777): 518–25.
 30. Zushi M., Gomi K., Honda G., Kondo S., Yamamoto S., Hayashi T., et al. Aspartic acid 349 in the fourth epidermal growth factor-like structure of human thrombomodulin plays a role in its Ca²⁺-mediated binding to protein C. *J Biol Chem* 1991; 266 (30): 19886–9.
 31. Edano T., Kumai N., Mizoguchi T., Ohkuchi M. The glycosylation sites and structural characteristics of oligosaccharides on recombinant human thrombomodulin. *Int J Biochem Cell Biol* 1998; 30 (1): 77–88.
 32. Koyama T., Parkinson J.F., Sie P., Bang N.U., Muller-Berghaus G., Preissner K.T. Different glycoforms of human thrombomodulin. Their glycosaminoglycan-dependent modulatory effects on thrombin inactivation by heparin cofactor II and antithrombin III. *Eur J Biochem* 1991; 198 (3): 563–70.
 33. Elisen. Erratum: Protein C inhibitor acts as a procoagulant by inhibiting the thrombomodulin induced activation of protein in human plasma. *Blood* 1998; 91 (8): 3091.
 34. Hsu Y., Shi G., Kuo C., Liu S., Wu C., Ma C., et al. Thrombomodulin is an ezrin-interacting protein that controls epithelial morphology and promotes collective cell migration. *FASEB J* 2012; 26 (8): 3440–52.
 35. Jackson D.E., Tetaz T.J., Salem H.H., Mitchell C.A. Purification and characterization of two forms of soluble thrombomodulin from human urine. *Eur J Biochem* 1994; 221 (3): 1079–87.
 36. Boron M., Hauzer-Martin T., Keil J., Sun X.-L. Circulating Thrombomodulin: Release Mechanisms, Measurements, and Levels in Diseases and Medical Procedures. *TH Open* 2022; 6 (3): e194–212.
 37. Wang L., Bastarache J.A., Wickersham N., Fang X., Matthay M.A., Ware L.B. Novel role of the human alveolar epithelium in regulating intra-alveolar coagulation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2007; 36 (4): 497–503.
 38. Lohi O., Urban S., Freeman M. Diverse Substrate Recognition Mechanisms for Rhomboids: Thrombomodulin Is Cleaved by Mammalian Rhomboids. *Curr Biol* 2004; 14 (3): 236–41.
 39. Matsumoto H., Yamakawa K., Ogura H., Koh T., Matsumoto N., Shimazu T. Enhanced expression of cell-specific surface antigens on endothelial microparticles in sepsis-induced disseminated intravascular coagulation. *Shock* 2015; 43 (5): 443–9.
 40. Ye J., Liu L.W., Esmon C.T., Johnson A.E. The fifth and sixth growth factor-like domains of thrombomodulin bind to the anion-binding exosite of thrombin and alter its specificity. *J Biol Chem* 1992; 267 (16): 11023–8.
 41. Mathews I.I., Padmanabhan K.P., Tulinsky A., Sadler J.E. Structure of a Nonadecapeptide of the Fifth EGF Domain of Thrombomodulin Complexed with Thrombin. *Biochemistry* 1994; 33 (46): 13547–52.
 42. Hall S.W., Nagashima M., Zhao L., Morser J., Leung L.L.K. Thrombin interacts with thrombomodulin, protein C, and thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor via specific and distinct domains. *J Biol Chem* 1999; 274 (36): 25510–6.
 43. Chen K., Stafford A.R., Wu C., Yeh C.H., Kim P.Y., Fredenburgh J.C., et al. Exosite 2-Directed Ligands Attenuate Protein C Activation by the Thrombin-Thrombomodulin Complex. *Biochemistry* 2017; 56 (24): 3119–28.
 44. Lane D.A., Philippou H., Huntington J.A. Directing thrombin. *Blood* 2005; 106 (8): 2605–12.
 45. Pozzi N., Barranco-Medina S., Chen Z., Di Cera E. Exposure of R169 controls protein C activation and autoactivation. *Blood* 2012; 120 (3): 664–70.
 46. Stearns-Kurosawa D.J., Kurosawa S., Mollica J.S., Ferrell G.L., Esmon C.T. The endothelial cell protein C receptor augments protein C activation by the thrombin-thrombomodulin complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93 (19): 10212–6.
 47. Wu C., Kim P.Y., Swystun L.L., Liaw P.C., Weitz J.I. Activation of protein C and thrombin activable fibrinolysis inhibitor on cultured human endothelial cells. *J Thromb Haemost* 2016; 14 (2): 366–74.
 48. Slungaard A., Key N.S. Platelet factor 4 stimulates thrombomodulin protein C-activating cofactor activity. A structure-function analysis. *J Biol Chem* 1994; 269 (41): 25549–56.
 49. Preston R.J.S., Tran S., Johnson J.A., Ainle F.N., Harmon S., White B., et al. Platelet factor 4 impairs the anticoagulant activity of activated protein C. *J Biol Chem* 2009; 284 (9): 5869–75.

50. Suleiman L., Négrier C., Boukerche H. Protein S: A multifunctional anticoagulant vitamin K-dependent protein at the crossroads of coagulation, inflammation, angiogenesis, and cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 2013; 88 (3): 637–54.
51. Gierula M., Ahnström J. Anticoagulant protein S – New insights on interactions and functions. *J Thromb Haemost* 2020; 18 (11): 2801–11.
52. Rezaie A.R., Mather T., Sussman F., Esmon C.T. Mutation of Glu-80 → Lys results in a protein C mutant that no longer requires Ca²⁺ for rapid activation by the thrombin-thrombomodulin complex. *J Biol Chem* 1994; 269 (5): 3151–4.
53. Light D.R., Glaser C.B., Betts M., Blasko E., Campbell E., Clarke J.H., et al. The interaction of thrombomodulin with Ca²⁺. *Eur J Biochem* 1999; 262 (2): 522–33.
54. Hayashi T., Zushi M., Yamamoto S., Suzuki K. Further localization of binding sites for thrombin and protein C in human thrombomodulin. *J Biol Chem* 1990; 265 (33): 20156–9.
55. Mann K.G., Whelihan M.F., Butenas S., Orfeo T. Citrate anticoagulation and the dynamics of thrombin generation. *J Thromb Haemost* 2007; 5(10): 2055–61.
56. McNicol A., Israels S.J. Platelet Dense Granules : Structure, Function and Implications for Haemostasis. *Thromb Res* 1999; 95 (1): 1–18.
57. Kokame K., Zheng X., Sadler J.E. Activation of thrombin-activable fibrinolysis inhibitor requires epidermal growth factor-like domain 3 of thrombomodulin and is inhibited competitively by protein C. *J Biol Chem* 1998; 273 (20): 12135–9.
58. Wang W., Nagashima M., Schneider M., Morser J., Nesheim M. Elements of the primary structure of thrombomodulin required for efficient thrombin-activable fibrinolysis inhibitor activation. *J Biol Chem* 2000; 275 (30): 22942–7.
59. Wu H.L., Lin C.I., Huang Y.L., Chen P.S., Kuo C.H., Chen M.S., et al. Lysophosphatidic acid stimulates thrombomodulin lectin-like domain shedding in human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 367 (1): 162–8.
60. Kuo C.-H., Sung M.-C., Chen P.-K., Chang B.-I., Lee F.-T., Cho C.-F., et al. FGFR1 mediates recombinant thrombomodulin domain-induced angiogenesis. *Cardiovasc Res* 2015; 105 (1): 107–17.
61. Cheng T.L., Chen P.K., Huang W.K., Kuo C.H., Cho C.F., Wang K.C., et al. Plasminogen/thrombomodulin signaling enhances VEGF expression to promote cutaneous wound healing. *J Mol Med* 2018; 96 (12): 1333–44.
62. Chen C.H., Lai C.H., Hong Y.K., Lu J.M., Lin S.Y., Lee T.C., et al. Thrombomodulin Functional Domains Support Osteoblast Differentiation and Bone Healing in Diabetes in Mice. *J Bone Miner Res* 2020; 35 (9): 1812–23.
63. Burnier L., Mosnier L.O. Novel mechanisms for activated protein C cytoprotective activities involving noncanonical activation of protease-activated receptor 3. *Blood* 2013; 122 (5): 807–16.
64. Roy R.V., Ardeshirylajimi A., Dinarvand P., Yang L., Rezaie A.R. Occupancy of human EPCR by protein C induces β -arrestin-2 biased PAR1 signaling by both APC and thrombin. *Blood* 2016; 128 (14): 1884–93.
65. Soh U.J.K., Trejo J.A. Activated protein C promotes protease-activated receptor-1 cytoprotective signaling through β -arrestin and dishevelled-2 scaffolds. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108 (50): E1372–80.
66. Kuo C.H., Huang Y.H., Chen P.K., Lee G.H., Tang M.J., Conway E.M., et al. VEGF-Induced Endothelial Podosomes via ROCK2-Dependent Thrombomodulin Expression Initiate Sprouting Angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2021; 41 (5): 1657–71.
67. Conway E.M., Van De Wouwer M., Pollefeyt S., Jurk K., Van Aken H., De Vriese A., et al. The lectin-like domain of thrombomodulin confers protection from neutrophil-mediated tissue damage by suppressing adhesion molecule expression via nuclear factor κ B and mitogen-activated protein kinase pathways. *J Exp Med* 2002; 196 (5): 565–77.
68. Geudens N., Van De Wouwer M., Vanaudenaerde B.M., Vos R., Van De Wauwer C., Verleden G.M., et al. The lectin-like domain of thrombomodulin protects against ischaemia-reperfusion lung injury. *Eur Respir J* 2008; 32 (4): 862–70.
69. Nishizawa S., Kikuta J., Seno S., Kajiki M., Tsujita R., Mizuno H., et al. Thrombomodulin induces anti-inflammatory effects by inhibiting the rolling adhesion of leukocytes *in vivo*. *J Pharmacol Sci* 2020; 143 (1): 17–22.
70. Воробьева Н.В. Нейтрофильные внеклеточные ловушки: новые аспекты. Вестник Московского университета. Серия 16. Биология. 2020; 75 (4): 210–25. [Vorobjeva N.V. Neutrophil extracellular traps: new aspects. *Vestnik Moskovskogo universiteta. Seriya 16. Biologiya* 2020; 75 (4): 210–25. (In Russ.)].
71. Martinod K., Wagner D.D. Thrombosis: Tangled up in NETs. *Blood* 2014; 123 (18): 2768–76.
72. Watanabe-Kusunoki K., Nakazawa D., Ishizu A., Atsumi T. Thrombomodulin as a Physiological Modulator of Intravascular Injury. *Front Immunol* 2020; 11: 1–12.
73. Ammollo C.T., Semeraro F., Xu J., Esmon N.L., Esmon C.T. Extracellular histones increase plasma thrombin generation by impairing thrombomodulin-dependent protein C activation. *J Thromb Haemost* 2011; 9 (9): 1795–803.
74. Lin W.L., Chen C.C., Shi G.Y., Ma C.Y., Chang C.F., Wu H.L. Monocytic thrombomodulin promotes cell adhesion through interacting with its ligand, Lewisy. *Immunol Cell Biol* 2017; 95 (4): 372–9.
75. Shi C.S., Shi G.Y., Hsiao S.M., Kao Y.C., Kuo K.L., Chih-Yuan M., et al. Lectin-like domain of thrombomodulin binds to its specific ligand Lewis y antigen and neutralizes lipopolysaccharide-induced inflammatory response. *Blood* 2008; 112 (9): 3661–70.
76. Kuo C.H., Chen P.K., Chang B.I., Sung M.C., Shi C.S., Lee J.S., et al. The recombinant lectin-like domain of thrombomodulin inhibits angiogenesis through interaction with Lewis Y antigen. *Blood* 2012; 119 (5): 1302–13.
77. Gardella S., Andrei C., Ferrera D., Lotti L.V., Torrisi M.R., Bianchi M.E., et al. The nuclear protein HMGB1 is secreted by monocytes via a non-classical, vesicle-mediated secretory pathway. *EMBO Rep* 2002; 3 (10): 995–1001.
78. Tsujita R., Tsubota M., Sekiguchi F., Kawabata A. Role of high-mobility group box 1 and its modulation by thrombomodulin/thrombin axis in neuropathic and inflammatory pain. *Br J Pharmacol* 2021; 178 (4): 798–812.
79. Abeyama K., Stern D.M., Ito Y., Kawahara K.I., Yoshimoto Y., Tanaka M., et al. The N-terminal domain of thrombomodulin sequesters high-mobility group-B1 protein, a novel antiinflammatory mechanism. *J Clin Invest* 2005; 115 (5): 1267–74.

80. Wang H., Vinnikov I., Shahzad K., Bock F., Ranjan S., Wolter J., et al. The lectin-like domain of thrombomodulin ameliorates diabetic glomerulopathy via complement inhibition. *Thromb Haemost* 2012; 108 (6): 1141–53.
81. Delvaeye M., Noris M., De Vriese A., Esmon C.T., Esmon N.L., Ferrell G., et al. Thrombomodulin Mutations in Atypical Hemolytic–Uremic Syndrome. *N Engl J Med* 2009; 361 (4): 345–57.
82. Heuberger D.M., Franchini A.G., Madon J., Schuepbach R.A. Thrombin cleaves and activates the protease-activated receptor 2 dependent on thrombomodulin co-receptor availability. *Thromb Res* 2019; 177: 91–101.
83. Mahmood I., Hamdan F., Al-Tameemi W. Role of endothelial dysfunction in relation to prothrombogenesis in polycythemia vera. *Iraqi J Hematol* 2018; 7 (1): 8.
84. Page A.V., Liles W.C. Biomarkers of endothelial activation/dysfunction in infectious diseases. *Virulence* 2013; 4 (6): 507–16.
85. Salomaa V., Matei C., Aleksic N., Sansores-Garcia L., Folsom A.R., Juneja H., et al. Soluble thrombomodulin as a predictor of incident coronary heart disease and symptomless carotid artery atherosclerosis in the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study: A case-cohort study. *Lancet* 1999; 353 (9166): 1729–34.
86. Kampoli A.M., Tousoulis D., Antoniadis C., Siasos G., Stefanadis C. Biomarkers of premature atherosclerosis. *Trends Mol Med* 2009; 15 (7): 323–32.
87. Wada H., Mori Y., Shimura M., Hiyoyama K., Ioka M., Nakasaki T., et al. Poor outcome in disseminated intravascular coagulation or thrombotic thrombocytopenic purpura patients with severe vascular endothelial cell injuries. *Am J Hematol* 1998; 58 (3): 189–94.
88. Lin S.M., Wang Y.M., Lin H.C., Lee K.Y., Da H.C., Liu C.Y., et al. Serum thrombomodulin level relates to the clinical course of disseminated intravascular coagulation, multiorgan dysfunction syndrome, and mortality in patients with sepsis. *Crit Care Med* 2008; 36 (3): 683–9.
89. Mori Y., Wada H., Okugawa Y., Tamaki S., Nakasaki T., Watanabe R., et al. Increased Plasma Thrombomodulin as a Vascular Endothelial Cell Marker in Patients With Thrombotic Thrombocytopenic Purpura and Hemolytic Uremic Syndrome. *Clin Appl Thromb* 2001; 7 (1): 5–9.
90. Shimizu M., Kuroda M., Inoue N., Konishi M., Igarashi N., Taneichi H., et al. Extensive serum biomarker analysis in patients with enterohemorrhagic *Escherichia coli* O111-induced hemolytic-uremic syndrome. *Cytokine* 2014; 66 (1): 1–6.
91. Budzyń M., Iskra M., Turkiewicz W., Krasiński Z., Gryszczyńska B., Kasprzak M.P. Plasma concentration of selected biochemical markers of endothelial dysfunction in women with various severity of chronic venous insufficiency (CVI) – A pilot study. *PLoS One* 2018; 13 (1): 1–17.
92. Mihajlovic D.M., Lendak D.F., Draskovic B.G., Mikic A.S.N., Mitic G.P., Cebovic T.N., et al. Thrombomodulin is a Strong Predictor of Multiorgan Dysfunction Syndrome in Patients with Sepsis. *Clin Appl Thromb* 2015; 21 (5): 469–74.
93. Faust S.N., Levin M., Harrison O.B., Goldin R.D., Lockhart M.S., Kondaveeti S., et al. Dysfunction of Endothelial Protein C Activation in Severe Meningococcal Sepsis. *N Engl J Med* 2001; 345 (6): 408–16.
94. Wei X., Du X., Liu Y., Wu J., Zhang J. High plasma soluble thrombomodulin levels indicated poor prognosis of decompensated liver cirrhosis: A prospective cohort study. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2022; 34 (11): 1140–6.
95. Tripodi A., Salerno F., Chantarangkul V., Clerici M., Cazzaniga M., Primignani M., et al. Evidence of normal thrombin generation in cirrhosis despite abnormal conventional coagulation tests. *Hepatology* 2005; 41 (3): 553–8.
96. Zanetto A., Campello E., Bulato C., Gavasso S., Saggiorato G., Shalaby S., et al. Global hemostatic profiling in patients with decompensated cirrhosis and bacterial infections. *JHEP Rep* 2022; 4 (7): 100493.
97. Напалкова О.С., Эмануэль В.Л., Карпенко М.А., Вавилова Т.В., Березовская Г.А., Яковлев А.Н. и др. Тест генерации тромбина в оценке риска повторной операции ревааскуляризации миокарда. Тромбоз, гемостаз и реология 2016; 1 (65): 65–71. [Napalkova O.S., Emanuel V.L., Karpenko M.A., Vavilova T.V., Berezovskaya G.A., Yakovlev A.N., et al. Thrombin generation test in risk assessment for reoperation of myocardium revascularization. *Tromboz, gemostaz i reologia* 2016; 1 (65): 65–71. (In Russ.)].
98. Ito T., Thachil J., Asakura H., Levy J.H., Iba T. Thrombomodulin in disseminated intravascular coagulation and other critical conditions – A multi-faceted anticoagulant protein with therapeutic potential. *Crit Care* 2019; 23 (1): 280.

© 2024 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ
им. Дмитрия Рогачева»
Минздрава России
Поступила 11.01.2024
Принята к печати 08.02.2024



EDN: VGBVYC

Контактная информация:

Горонкова Ольга Владимировна,
врач-гематолог, научный сотрудник отдела
депрессий кроветворения, миелоидных
лейкозов, редких и наследственных
болезней ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия
Рогачева» Минздрава России
Адрес: 117997, Москва,
ул. Саморы Машела, 1
E-mail: goronkova@yandex.ru

© 2024 by «D. Rogachev NMRCPHOI»

Received 11.01.2024
Accepted 08.02.2024

Correspondence:

Olga V. Goronkova,
a hematologist, a researcher
at the Department of Bone Marrow
Depression, Myeloid Leukemia, Rare and
Hereditary Diseases of the Dmitry Rogachev
National Medical Research Center of Pediatric
Hematology, Oncology and Immunology,
Ministry of Healthcare
of the Russian Federation
Address: 1 Samory Mashela St.,
Moscow 117997, Russia
E-mail: goronkova@yandex.ru

DOI: 10.24287/1726-1708-2024-23-2-208-220

Апластическая анемия у детей: современная концепция дифференциальной диагностики

О.В. Горонкова, А.В. Павлова, Е.В. Райкина

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии
и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, Москва

В статье представлен краткий обзор публикаций, посвященных апластической анемии (АА) у детей и тесно связанных с ней состояний. Рассмотрена патофизиология АА, включающая 3 основных механизма деструкции костного мозга, приводящих к аплазии: прямое повреждение, опосредованная иммунными клетками деструкция и недостаточность костного мозга, возникшая в результате наследственных и клональных нарушений. Освещены новые аспекты, касающиеся врожденных синдромов костномозговой недостаточности, врожденных дефектов иммунитета и миелодиспластических синдромов как наиболее частых состояний, входящих в круг дифференциальной диагностики АА у детей. Представлен комплексный алгоритм диагностики АА, включающий стандартные лабораторные тесты и дополнительные современные молекулярно-генетические методы исследования, способствующие лучшему пониманию этой гетерогенной группы заболеваний и определяющие подходы к выбору тактики терапии. Цель обзора: предоставить врачам – педиатрам и детским гематологам обновленную информацию об этом редком гетерогенном заболевании на основании анализа последних данных литературы.

Ключевые слова: дети, апластическая анемия, дифференциальная диагностика

Горонкова О.В. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2024; 23 (2): 208–20. DOI: 10.24287/1726-1708-2024-23-2-208-220

Aplastic anemia in children: the current concept of differential diagnosis

O.V. Goronkova, A.V. Pavlova, E.V. Raykina

Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology of Ministry of Healthcare
of the Russian Federation, Moscow

This article presents a brief overview of publications on pediatric aplastic anemia (AA) and closely related conditions. Here we consider the pathophysiology of AA, which includes three main mechanisms of bone marrow destruction resulting in aplasia: direct injury, immune mediated destruction and bone marrow failure resulting from inherited and clonal disorders. New aspects of inherited bone marrow failure syndromes, inborn errors of immunity and myelodysplastic syndromes are highlighted as the most common conditions included in the spectrum of differential diagnosis of AA in children. A comprehensive algorithm for the diagnosis of AA in children is presented, including standard laboratory tests and additional modern molecular and genetic techniques that contribute to a better understanding of this heterogeneous group of diseases and determine approaches to the choice of therapy. The purpose of the review is to provide pediatricians and pediatric hematologists with an updated information of this rare, heterogeneous condition based on an analysis of the latest literature data.

Key words: children, aplastic anemia, differential diagnosis

Goronkova O.V., et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology 2024; 23 (2): 208–20.
DOI: 10.24287/1726-1708-2024-23-2-208-220

Апластическая анемия (АА) – редкое, угрожающее жизни заболевание крови, характеризующееся панцитопенией и гипоклеточным костным мозгом (КМ), в основе его патогенеза лежит деструкция гемопоэтических стволовых клеток с замещением КМ жировой тканью при отсутствии признаков злокачественного поражения [1]. АА – это описательный термин, используемый для различных гипопластических и апластических состояний КМ (синдромов костномозговой недостаточности (КМН)) с цитопенией различной степени выраженности в периферической крови со стороны 2 или 3 основных клеточных линий: эритроцитов, лейкоцитов и/или тромбоцитов.

Последние достижения в понимании патофизиологии и современные стратегии лечения привели к существенному улучшению выживаемости детей

с АА, ранее неизбежно приводившей к летальному исходу. Поскольку АА у детей встречается редко, многие врачи, включая детских гематологов, имеют ограниченный опыт в диагностике и лечении.

Цель данного обзора – осветить современные подходы к дифференциальной диагностике АА у детей на основании анализа последних публикаций.

В основе патофизиологии АА лежат 3 основных патологических механизма, приводящих к «опустошению» КМ и замещению его жировой тканью: химическое или физическое повреждение, иммунологическая деструкция (преимущественно цитотоксическими Т-лимфоцитами) и конституциональный дефект в генах, играющих важную роль в поддержании целостности клеток и иммунной регуляции (рисунки) [2].

Рисунок

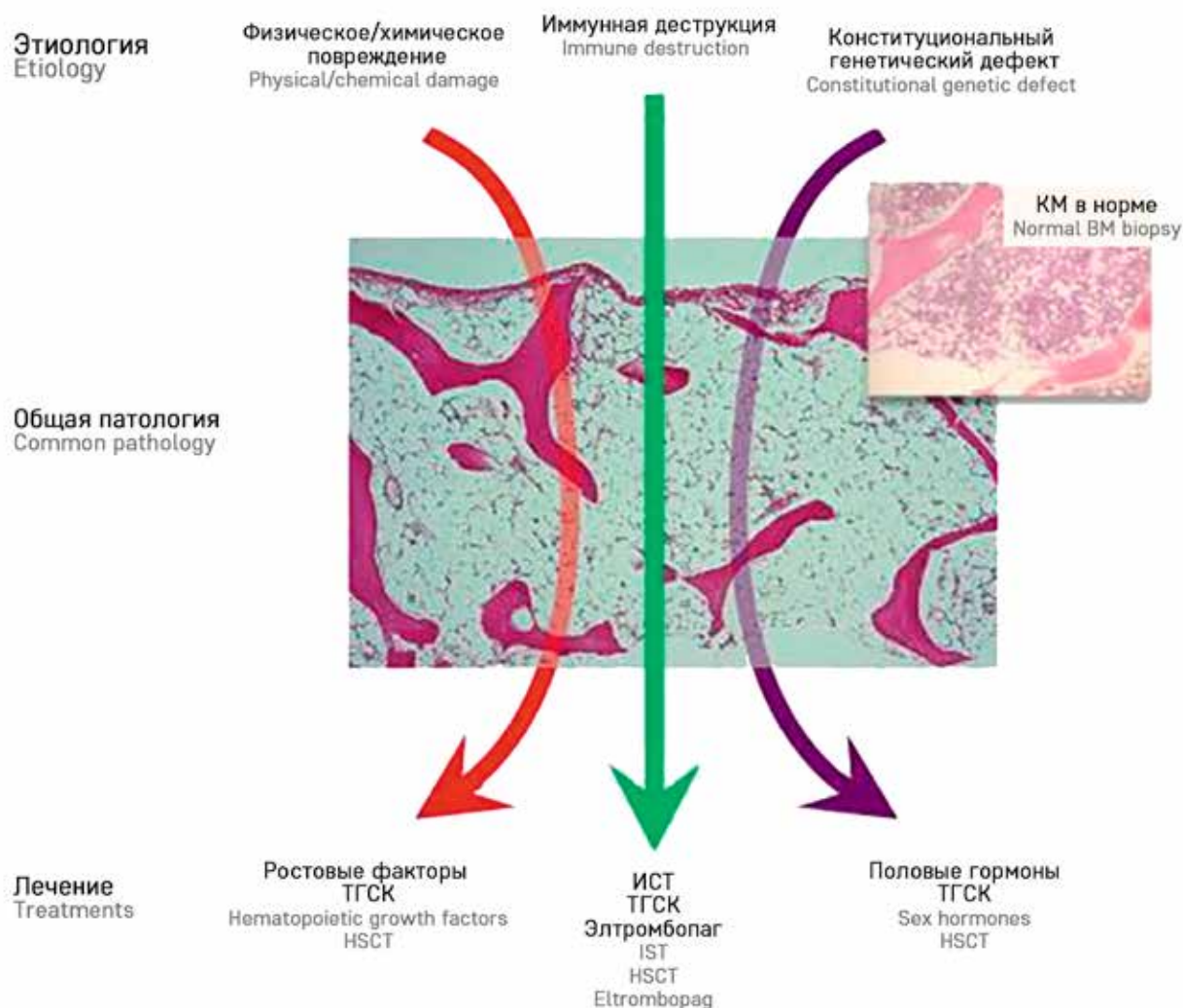
Патофизиология АА (адаптировано из N.S. Young [2])

ТГСК – трансплантация гемопоэтических стволовых клеток; ИСТ – иммуносупрессивная терапия

Figure

Pathophysiology of aplastic anemia (AA) (adapted from N.S. Young [2])

HSCT – hematopoietic stem cell transplantation; IST – immunosuppressive therapy; BM – bone marrow



Диагноз АА устанавливается на основании общепринятых критериев [1–4]:

1. Стойкое (более 2 нед) снижение минимум 2 из 3 показателей периферической крови:

- гемоглобин < 110 г/л;
- абсолютное число нейтрофилов $< 1,5 \times 10^9$ /л;
- тромбоциты $< 140,0 \times 10^9$ /л.

2. Морфологическая картина аспирата КМ:

- снижение клеточности КМ и отсутствие мегакариоцитов;
- отсутствие лейкемических и других опухолевых клеток;
- отсутствие признаков дисплазии, характерных для миелодиспластического синдрома (МДС).

3. Данные трепанобиопсии:

- аплазия или гипоплазия КМ (снижение клеточности менее 50%, преобладание жирового компонента над кроветворным КМ в биоптате).

Тяжесть АА определяется на основании критериев, предложенных В. Camitta в 1975 г. [5]. В зависимости от степени снижения показателей периферической крови и клеточности КМ выделяют сверхтяжелую, тяжелую и нетяжелую степени АА [4, 6].

Сверхтяжелая АА:

- клеточность КМ по данным трепанобиопсии $< 25\%$ и наличие ≥ 2 из следующих показателей:
- нейтрофилы $< 0,2 \times 10^9$ /л;
- тромбоциты $< 20 \times 10^9$ /л;
- ретикулоциты $< 40\,000 \times 10^9$ /л.

Тяжелая АА:

- клеточность КМ $< 25\%$ и наличие ≥ 2 из следующих показателей:
- нейтрофилы $> 0,2 \times 10^9$ /л, но $< 0,5 \times 10^9$ /л;
- тромбоциты $< 20 \times 10^9$ /л;
- ретикулоциты $< 40\,000 \times 10^9$ /л.

Нетяжелая АА:

- гипоклеточный КМ и показатели периферической крови, не соответствующие критериям тяжелой и сверхтяжелой АА;
- нейтрофилы $> 0,5 \times 10^9/\text{л}$.

Современная классификация АА построена по этиологическому принципу (таблица). В зависимости от этиологии выделяют приобретенную (ПАА) и врожденную АА. Частота встречаемости ПАА у детей составляет приблизительно 2 случая на 1 млн детского населения в год в Северной Америке и Европе, при этом заболеваемость в странах Азии в 2–3 раза выше [3]. В России эпидемиологических данных о частоте ПАА у детей нет.

ПАА подразделяется на вторичную (приблизительно 10–20% случаев с известной этиологией, большинство из них являются гепатит-ассоциированными) и идиопатическую (около 80–90% случаев, причина развития которых не установлена) [4]. Среди причин, вызывающих вторичную ПАА, выделяют вирусные инфекции (наиболее часто вирусы гепатита, цитомегаловирус (ЦМВ), вирус Эпштейна–Барр (ЭБВ), вирус иммунодефицита человека (ВИЧ), вирус простого герпеса 6-го типа (ВПГ-6), парвовирус В19), прием некоторых медикаментозных препаратов (например, 6-меркаптопурин, азатиоприн, тиреостатики, противоэпилептические препараты, нестероидные противовоспалительные средства, хлорамфеникол), токсины (например, бензол, растворители, пестициды), ионизирующее излучение, дефицит некоторых витаминов и микроэлементов (витамин В₁₂, фолиевая кислота, цинк, медь), а также аутоиммунные заболевания и синдромы иммунной дисрегуляции (таблица).

В основе патогенеза идиопатической ПАА лежат иммуноопосредованные механизмы. Цитотоксические Т-клетки играют ключевую роль в нарушении регуляции иммунной системы: напрямую (за счет активации апоптоза по пути Fas/FasL) либо опосредованно (увеличение продукции INF- γ , TNF- α), что приводит к апоптозу гемопоэтических стволовых клеток [7]. Потеря гетерозиготности на коротком плече хромосомы 6 (6pLOH) приводит к потере одного гаплотипа HLA (human leukocyte antigen, человеческий лейкоцитарный антиген), вызывая неадекватную презентацию антигена главным комплексом гистосовместимости, что приводит к появлению аутореактивных Т-клеток [8]. Существуют данные о нарушении стромального микроокружения и роли адипоцитов в патогенезе АА. Все вышеописанное приводит к деструкции КМ и замещению его жировой тканью [7, 8]. У 40% детей с АА обнаруживается клональная экспансия гемопоэтических стволовых клеток с приобретенными соматическими вариантами в гене *PIGA*, что приводит к дефициту гликозил-

фосфатидилинозитол (GPI)-связанных белков CD55 и CD59 (клон пароксизмальной ночной гемоглобинурии (ПНГ)) и влечет за собой избыточную активацию системы комплемента, ассоциированную с гибелью клеток КМ [9]. Гипотеза, объясняющая высокую частоту выявления клона ПНГ при ПАА, заключается в избирательном преимуществе клеток с дефицитом GPI-связанных белков избегать иммуноопосредованного разрушения [10]. Выявление клона ПНГ на этапе диагностики может свидетельствовать в пользу диагноза иммуноопосредованной ПАА, а не врожденной АА, особенно при отсутствии каких-либо особенностей в анамнезе пациента, в том числе семейном [11]. Прогностическое значение наличия клона ПНГ в дебюте ПАА в отношении успеха ИСТ остается предметом дискуссий. В некоторых исследованиях у детей показано увеличение вероятности ответа на ИСТ при наличии клона ПНГ [9, 12]. Не вызывает сомнений необходимость мониторинга клона ПНГ методом проточной цитометрии на фоне ИСТ и во время последующего наблюдения у пациентов с ПАА, учитывая потенциальную возможность развития нового клона и изменения размера клона ПНГ [9, 13].

Врожденные АА, или ВСКМН, представляют собой гетерогенную группу заболеваний, характеризующихся нарушением со стороны одной или нескольких линий кроветворения. В основе ВСКМН лежат герминальные генетические варианты. Приблизительно у 30% детей и 10% молодых взрослых АА является врожденной, или генетически детерминированной [14, 15]. Клинические проявления ВСКМН варьируют в зависимости от типа и количества вовлеченных линий гемопоэза, включая различные комбинации анемии, лейкопении и тромбоцитопении. При некоторых ВСКМН могут присутствовать системные негематологические проявления, такие как врожденные пороки развития, аномалии кожных покровов и слизистых оболочек, задержка роста и развития, повышенный риск развития МДС, ОМЛ и солидных опухолей. Трудности в дифференциальной диагностике могут представлять пациенты с наследственными формами, но без врожденных аномалий, а также без семейного анамнеза, у которых развитие заболевания связано с возникновением замены *de novo* или наличием варианта, обуславливающего низкую пенетрантность. Существенный прогресс в генетической диагностике ВСКМН за последнее десятилетие позволил выявить более 100 вовлеченных генов. Это гены, ответственные за репарацию ДНК (АФ), поддержание функции теломер (ВД) и биогенез рибосом (СШД и АДБ) [16]. При подозрении на ВСКМН следует проводить молекулярно-генетический анализ на наличие вариантов в известных в настоящее время генах для верификации диагноза и генетического консульти-

Таблица

Классификация АА по этиологии (адаптировано из А.Г. Румянцев и соавт. [4] и E. Furlong и соавт. [6])

Tables

Classification of aplastic anemia (AA) by etiology (adapted from A.G. Rumyantsev et al. [4] and E. Furlong et al. [6])

ПАА Acquired AA		Врожденные (генетически детерминированные) АА Congenital (genetically determined) AA
Идиопатические Idiopathic (80–90%)	Вторичные Secondary (10–20%)	
	Поствирусные: Post-viral: - гепатит-ассоциированные - hepatitis-associated - ЭБВ, ВИЧ, ЦМВ, ВПГ-6, парвовирус В19 - EBV, HIV, CMV, HSV-6, parvovirus B19 Радиация Radiation Медикаментозные (лекарства, токсины): Medicinal (drugs, toxins): - дозозависимые (6-меркаптопурин, азатиоприн, цитостатики) - dose-dependent (6-mercaptopurine, azathioprine, cytostatics) - идиосинкратические - idiosyncratic На фоне иммунных заболеваний: Associated with immune diseases: - РТПХ, тимомы, аутоиммунные заболевания (СКВ, РА и др.), эозинофильный фасциит - GVHD, thymoma, autoimmune diseases (SLE, RA, and others), eosinophilic fasciitis	Врожденные синдромы КМН (ВСКМН): Congenital bone marrow failure syndromes: - Анемия Фанкони (АФ) - Fanconi anemia - Врожденный дискератоз (ВД) - Dyskeratosis congenita - Анемия Даймонда–Блекфена (АДБ) - Diamond-Blackfan anemia - Синдром Швахмана–Даймонда (СШД) - Schwachman–Diamond syndrome - Тяжелая врожденная нейтропения (ТВН) - Severe congenital neutropenia - Врожденная амегакариотическая тромбоцитопения (MPL) - Congenital amegakaryocytic thrombocytopenia (MPL) - Радиоульнарный синостоз - Radioulnar synostosis с амегакариотической тромбоцитопенией 1-го типа (HOXA11) with amegakaryocytic thrombocytopenia, type 1 (HOXA11) MECOM-ассоциированные синдромы MECOM-associated syndromes Синдром Пирсона Pearson syndrome Врожденные дефекты иммунитета (ВДИ): Inborn errors of immunity: - Дефицит ADA2 (DADA2) - ADA2 deficiency (DADA2) - Дефицит CTLA4 - CTLA4 deficiency - Синдром Ниймеген (NBN) - Nijmegen breakage syndrome (NBN) - X-сцепленный лимфопролиферативный синдром (XLP) - X-linked lymphoproliferative syndrome (XLP) - Аутоиммунный лимфопролиферативный синдром (FAS, FASLG, CASP10, CASP8, NRAS, KRAS) - Autoimmune lymphoproliferative syndrome (FAS, FASLG, CASP10, CASP8, NRAS, KRAS) Наследственная предрасположенность к МДС/ОМЛ: Inherited predisposition to MDS/AML: - CEBPA-ассоциированная семейная предрасположенность к ОМЛ - CEBPA-associated familial susceptibility to AML - Семейная тромбоцитопения/тромбоцитопатия с предрасположенностью к ОМЛ (RUNX1) - Familial platelet disorder with associated myeloid malignancy (RUNX1) - ETV6-ассоциированная тромбоцитопения - ETV6-associated thrombocytopenia - ANKRD26-ассоциированная тромбоцитопения - ANKRD26-associated thrombocytopenia - Дефицит GATA2 - GATA2 deficiency - SAMD9/SAMD9L-ассоциированные синдромы - SAMD9/SAMD9L-associated syndromes - DDX41-ассоциированная семейная предрасположенность к МДС/ОМЛ - DDX41-associated familial susceptibility to MDS/AML Синдромы КМН (SRP72, ERCC6L2, DNAJC21, MYSM1, MDM4) BM failure syndromes (SRP72, ERCC6L2, DNAJC21, MYSM1, MDM4)

Примечание. РТПХ – реакция «трансплантат против хозяина»; СКВ – системная красная волчанка; РА – ревматоидный артрит; ADA2 – аденозиндеаминаза 2; ОМЛ – острый миелоидный лейкоз.

Note. CMV – cytomegalovirus; EBV – Epstein-Barr virus; HIV – human immunodeficiency virus; HSV-6 – herpes simplex virus-6; GVHD – graft versus host disease; SLE – systemic lupus erythematosus; RA – rheumatoid arthritis; ADA2 – adenosine deaminase 2; MDS – myelodysplastic syndrome; AML – acute myeloid leukemia.

рования семьи, поскольку возможны различные пути наследования (аутосомно-рецессивный, аутосомно-доминантный или X-сцепленный) в зависимости от заболевания.

К наиболее частым ВСКМН, которые входят в круг дифференциальной диагностики ПАА, относят АФ и ВД. АФ характеризуется повышенной ломкостью хромосом, проявляется КМН с дебютом в первые 10 лет жизни и повышенной склонностью к развитию МДС/ОМЛ, а также солидных опухолей (преимущественно плоскоклеточных карцином головы и шеи, урогенитального тракта, опухолей печени). У боль-

шинства пациентов помимо КМН также отмечаются негематологические проявления, включающие низкий рост и вес, изменения кожи (гипер- или гипопигментация, пятна «кофе с молоком»), скелета (микроцефалия, мелкие «птичьи» черты лица, аномалии пальцев, гипоплазия лучевых костей), эндокринной системы, мочеполовой системы (аномалии мочевыводящих путей и почек, например гипоплазия почки, подковообразная почка), желудочно-кишечного тракта (например, атрезия пищевода, двенадцатиперстной кишки, трахеопищеводный свищ), врожденные пороки сердца и сосудов. Однако в 25–40% случаев

врожденные аномалии развития могут отсутствовать, и некоторым пациентам диагноз может быть установлен поздно, нередко в связи с развитием злокачественного новообразования (ЗНО). Для АФ характерен аутосомно-рецессивный тип наследования, однако возможно X-сцепленное и аутосомно-доминантное наследование. У большинства пациентов с АФ обнаруживаются варианты в генах *FANCA*, *FANCC* и *FANCG*, реже (менее чем у 5% пациентов) в генах *FANCI*, *FANCE*, *FANCF*, *FANCP* и очень редко в других группах комплементации АФ [17].

ВД относится к заболеваниям, характеризующимся нарушением биологии теломер, и проявляется изменениями кожи и слизистых оболочек (аномальная пигментация кожи, дистрофия ногтей, лейкоплакия), зубов (тяжелый кариес), волос (ранняя седина), аномалиями органов желудочно-кишечного тракта (стеноз пищевода, цирроз печени), мочеполовой системы (стриктуры уретры, фимоз), нервной системы (гипоплазия мозжечка), глаз (стеноз носослезного канала, ретинопатия), легких (фиброз, эмфизема), скелета (остеопороз, аваскулярный некроз) и сосудов (мальформации). КМН является основной причиной смерти пациентов с ВД. Также пациенты с ВД предрасположены к развитию опухолей (преимущественно плоскоклеточных карцином головы, шеи и урогенитального тракта, опухолей печени), МДС/ОМЛ и фиброзу легких. Для заболеваний, характеризующихся нарушением биологии теломер, включающих главным образом ВД, известны генетические варианты в следующих генах: *TERT*, *TERC*, *DKC1*, *RTBL1*, *PARN*, *TINF2*, *WRAP53*, *ACD*, *NAF1*, *NHP2*, *NOP10*, *CTC1*, *STN1*, *POT1* и *ZCCHC8* [17, 18].

СШД – врожденное аутосомно-рецессивное заболевание, характеризующееся нейтропенией или реже АА (около 20% пациентов), негематологическими проявлениями (задержка роста и развития, недостаточность экзокринной функции поджелудочной железы (ПЖ), аномалии скелета и других различных органов и систем), частыми инфекциями и предрасположенностью к развитию МДС/ОМЛ. Однако менее чем у 50% пациентов наблюдается классическое сочетание КМН и экзокринной недостаточности ПЖ с дебютом в раннем возрасте, клиническая картина может быть довольно гетерогенной, что приводит к поздней диагностике [19]. У большинства пациентов с СШД (> 90%) обнаруживаются биаллельные варианты в гене *SBDS*, который играет важную роль в биогенезе рибосом [20]. Недавно показано, что биаллельные варианты в генах *EFL1* и *DNAJC21* и гетерозиготные варианты в гене *SRP54* могут вызвать заболевание, похожее на СШД (SDS-like) [21].

Классическая АДБ – врожденное заболевание с аутосомно-доминантным типом наследования, возни-

кающее в результате вариантов в рибосомальных генах. Реже встречается неклассическая АДБ (фенотипические копии АДБ, DBA-like) с X-сцепленным рецессивным наследованием с вариантами в генах *GATA1* и *TSR2*. Классическая картина АДБ характеризуется изолированным угнетением эритроидного роста в КМ, макроцитарной гипорегенераторной анемией с развитием до 1 года жизни у 90% пациентов в сочетании с различными негематологическими проявлениями, такими как скелетные аномалии конечностей и лицевого черепа, врожденные пороки сердца и мочеполовой системы, а также предрасположенностью к развитию МДС/ОМЛ и солидных опухолей [22]. У 50% пациентов наблюдается минимум одна врожденная аномалия, у 25% – более одной. Хотя при АДБ обычно выявляется изолированная красноклеточная аплазия, у некоторых пациентов может наблюдаться АА вследствие общего дефекта кроветворения. Приблизительно у 25% пациентов выявляются варианты в гене *RPS19*. Описаны также варианты в других генах, кодирующих белки малой (*RPS7*, *RPS10*, *RPS15*, *RPS17*, *RPS24*, *RPS26*, *RPS27*, *RPS28* и *RPS29*) и большой (*RPL5*, *RPL9*, *RPL11*, *RPL15*, *RPL18*, *RPL26*, *RPL27*, *RPL31*, *RPL35* и *RPL35A*) субъединиц рибосом. На сегодняшний день генетические варианты могут быть установлены приблизительно у 75% пациентов с АДБ [17, 23].

ТВН характеризуется развитием тяжелой нейтропении с числом нейтрофилов менее 500/мкл в течение первого года жизни пациента, частыми бактериальными и грибковыми инфекциями, улучшающимися при применении гранулоцитарного колониестимулирующего фактора, и повышенной предрасположенностью к развитию МДС/ОМЛ. Клинические проявления включают хронический гингивит, тяжелый кариес, пониженную минеральную плотность костей, ведущую к склонности к переломам. Тромбоцитопения и анемия не характерны, однако прогрессирующая КМН может быть признаком развития МДС у пациента с нераспознанной ТВН. Выявляются герминальные варианты в генах *ELANE*, *GFI1*, *HAX1*, *G6PC3*, *VPS45*, *JAGN1*, *CSF3R*, *SRP54*, *CLPB*, *WAS*, *CXCR2*, *CXCR4*, *USB1* [17].

При дебюте АА в раннем возрасте, особенно до 1 года, следует помнить о таких заболеваниях, как митохондриальные болезни (например, синдром Пирсона), амегакариоцитарные тромбоцитопении, а также редкие синдромы (например, синдром Роджерса).

Синдром Пирсона – очень редкое врожденное заболевание (1 случай на 1 млн новорожденных), которое возникает вследствие делеций в митохондриальной ДНК и характеризуется сидеробластной анемией, экзокринной недостаточностью ПЖ и метаболическим ацидозом. Клинические проявления

включают макроцитарную анемию в течение первых 6 месяцев жизни, в дальнейшем могут присоединиться нейтропения и тромбоцитопения, а также различные симптомы дисфункции многих органов и систем. Диагноз устанавливают на основании повышения лактата в сыворотке крови, характерной морфологической картины КМ (кольцевые сидеробласты, вакуолизация миелоидных и эритроидных предшественников в КМ) и подтверждающего генетического анализа митохондриальной ДНК [24, 25].

Синдром Роджерса, или тиамин-зависимая мегалобластная анемия, – очень редкий врожденный синдром, в основе которого лежит нарушение трансмембранного транспорта витамина В₁ в клетки вследствие генетического дефекта в гене *SLC19A2*, ответственного за синтез переносчика тиамина THTR-1, с аутосомно-рецессивным типом наследования. Клинические проявления включают триаду:

- 1) мегалобластная анемия с дебютом в младенческом или раннем детском возрасте;
- 2) инсулинозависимый диабет с ранним дебютом (до 5 лет) со значительной гипергликемией и необходимостью инсулинотерапии;
- 3) нейросенсорная тугоухость, которая может возникать позже анемии и диабета.

Триада обусловлена присутствием транспортера THTR-1 в бета-клетках ПЖ, клетках улитки внутреннего уха и гематопозитических тканях. В дополнение к триаде могут возникать нарушения со стороны сердца (аритмии, дефекты перегородок, нарушения проводимости), глаз (пигментная ретинопатия, атрофия зрительного нерва, макулопатия), неврологические и иные проявления. Ежедневный пероральный прием высоких доз витамина В₁ приводит к увеличению концентрации в сыворотке и пассивной диффузии витамина через клеточную мембрану, обеспечивая коррекцию гематологических нарушений и большинства других клинических проявлений [26].

Врожденная амегакариоцитарная тромбоцитопения обычно выявляется в младенческом возрасте и характеризуется изолированной тромбоцитопенией и отсутствием мегакариоцитарного роста в КМ; негематологические проявления не характерны. Приблизительно у 50% пациентов отмечается развитие АА к возрасту 5 лет. Возможна эволюция заболевания в МДС/ОМЛ. При амегакариоцитарной тромбоцитопении выявляются биаллельные варианты в гене *MPL*, кодирующем рецептор тромбопоэтина. Тромбоцитопения с отсутствием лучевых костей (thrombocytopenia with absent radius, TAR) обычно диагностируется в младенческом возрасте. TAR-синдром развивается в результате сочетания в гене *RMB8A* в компаунд-гетерозиготном состоянии полиморфизма с низкой популяционной частотой в некодирующей области и протяженной делеции [17].

В последние годы описаны патогенные варианты в генах *HOXA11* и *MECOM*, которые вызывают синдромы, включающие амегакариоцитарную тромбоцитопению с радиоульнарным синостозом 1-го и 2-го типов. Кроме того, опубликована серия сообщений о генетических вариантах в гене *MECOM* у пациентов с цитопенией, КМН и различными системными аномалиями, включая патологию почек, сердца, конечностей, нейросенсорную тугоухость и дефицит В-клеток [27]. В 2018 г. был предложен термин *MECOM*-ассоциированные синдромы для этой гетерогенной группы с герминальными вариантами в гене *MECOM*, имеющими различные фенотипические проявления [28].

В клинической практике генетические тесты, основанные на последних достижениях в области молекулярной биологии, существенно облегчают диагностику ВСКМН, особенно в случаях, когда клинических признаков недостаточно для точной классификации заболевания. ТГСК с использованием современных протоколов с низкой токсичностью на основе флударабина существенно улучшила результаты, особенно у пациентов с АФ и ВД [14, 17].

В последнее время было показано, что некоторые первичные иммунодефициты (ПИД), или ВДИ, согласно международной классификации IUIS 2022 г. [29], ассоциированы с развитием АА в рамках комплексной иммунной дисрегуляции, включающей аутоиммунные проявления и персистирующие инфекции, в том числе атипичными микроорганизмами. Примерами таких ВДИ с КМН являются дефицит GATA2, характеризующийся нарушением дифференцировки и самообновления гемопозитических стволовых клеток, с развитием АА с последующей клональной эволюцией в миелоидные ЗНО и повышенной восприимчивостью к микобактериям и вирусам [30]; синдром иммунной дисрегуляции с дефицитом CTLA-4 [31, 32] и аутовоспалительный синдром DADA2 [33, 34]. Гематологические проявления в виде АА не являются типичными для ВДИ, что затрудняет своевременную верификацию диагноза, а также выбор необходимой патогенетической терапии. ТГСК является радикальным методом терапии для большинства пациентов с ВДИ.

В круг дифференциальной диагностики АА у детей с цитопенией помимо приобретенной АА и ВСКМН включают МДС. МДС – клональное заболевание крови, характеризующееся неэффективным кроветворением, цитопенией, дисплазией КМ и повышенным риском развития ОМЛ. МДС у детей является редким заболеванием и составляет менее 5% всех ЗНО детского возраста. С ростом доступности молекулярно-генетического тестирования растет понимание того, что у детей и подростков МДС/ОМЛ зачастую развивается на фоне синдромов генетиче-

ской предрасположенности – приблизительно 30–45% случаев МДС у детей генетически детерминированы [35]. В 2022 г. была предложена новая международная классификация МДС Всемирной организации здравоохранения, согласно которой рефрактерная цитопения детского возраста (refractory cytopenia of childhood) включена в отдельный раздел педиатрических заболеваний, и для стратификации риска и оценки прогноза при МДС используется ряд балльных систем, включающих помимо анализа периферических цитопений, процентного содержания бластов в КМ и цитогенетических характеристик также молекулярно-генетические данные [36]. Согласно современным представлениям и пересмотренной классификации МДС у детей и молодых взрослых, выделяют 3 основных типа МДС:

1) МДС, связанные с терапией (цитотоксическая терапия, ионизирующее излучение);

2) МДС, связанные с ПАА (с клональным гемопоэзом и соматическими вариантами в МДС-ассоциированных генах, таких как *ASXL1*, *BCOR*, *DNMT3A*, *TET2*, *SETBP1*, *RUNX1*);

3) МДС вследствие наличия у пациента классического ВСКМН (главным образом АФ, ВД, СШД, ТВН, АДБ) или же поломки в ряде генов, ответственных за развитие синдромов наследственной предрасположенности к МДС/ОМЛ (*GATA2*, *ETV6*, *RUNX1*, *ANKRD26*, *RBM8A*, *CEBPA*, *CBL*, *MPL*, *DDX41*, *SRP72*, *ERCC6L2*, *DNAJC21*, *MYSM1*, *MDM4*, *ADH5*, *DUT*, *TET2*, *DNMT3A*, *SAMD9* и *SAMD9L*) [37, 38].

При дефиците *GATA2* общая частота развития миелоидных новообразований, включая МДС, составляет 75% с медианой возраста на момент дебюта 20 лет [38]. У детей и подростков с первичным МДС герминальные поломки в гене *GATA2* выявляются в 7% всех случаев МДС и у 37% детей с МДС и моносомией 7, достигая пика 72% у подростков [39]. В последние годы получено большое число данных, указывающих на связь *SAMD9/SAMD9L*-ассоциированных синдромов с развитием МДС у детей. При синдромах *SAMD9/SAMD9L* могут страдать многие системы органов с преобладанием гематологических проявлений, иммунологических нарушений, а также поражением эндокринной, половой, нервной и других систем. Первичные клинические проявления неоднородны и могут варьировать от тяжелого заболевания с высокой летальностью в детском возрасте до легкой цитопении и иммунной дисфункции. На сегодняшний день синдромы предрасположенности к МДС/ОМЛ, обусловленные наличием патогенных вариантов в генах *GATA2* и *SAMD9/SAMD9L*, считаются самыми частыми причинами первичных МДС у детей, особенно связанных с моносомией 7, и составляют по меньшей мере 50% педиатрических МДС с моносомией 7 [38, 39]. У детей МДС может

проявляться двух- или трехростковой цитопенией и гипоклеточным КМ – рефрактерная цитопения детского возраста (так называемый гипоклеточный МДС), поэтому без дополнительного цитогенетического исследования КМ может быть сложно отличить МДС от ПАА. Примерно в 20% случаев МДС у детей выявляется случайно при рутинном лабораторном обследовании или во время обследования при подозрении на ВСКМН. Для окончательного диагноза часто требуются повторные исследования КМ и сопоставление с дополнительными лабораторными тестами. При стандартном кариотипировании клеток КМ у детей с МДС наиболее часто обнаруживаются аномалии хромосомы 7 (моносомия 7, *del(7q)*, *der(1;7)*, сопряженные с неблагоприятным прогнозом, *isochromosome 7q*). Реже встречаются другие хромосомные аномалии: трисомия хромосомы 8 (+8), трисомия хромосомы 21 (+21), аномалии хромосом 3 и 5 [35]. Для лечения МДС в большинстве случаев требуется проведение ТГСК с более интенсивным, чем при ПАА, режимом кондиционирования, и ее следует рассматривать у всех пациентов в зависимости от клинических и генетических особенностей. Выявление генетического дефекта при ВСКМН или синдроме предрасположенности к МДС/ОМЛ в рамках дифференциальной диагностики АА также может иметь значение при выборе родственного донора для проведения ТГСК, поскольку членам семьи может потребоваться дополнительная оценка статуса носителя генетического заболевания, прежде чем выбрать их в качестве подходящего донора [35, 40].

Диагностика ПНГ у детей представляет трудности в клинической практике, прежде всего из-за недостаточной осведомленности врачей об этом редком заболевании. Клиническая картина ПНГ характеризуется внутрисосудистым гемолизом, дисфункцией КМ и повышенным риском тромботических и органических осложнений. Выделяют форму ПНГ, развившуюся у пациентов с доказанной ПАА (АА/ПНГ), и классическую форму ПНГ без выраженной КМН, которые одинаково часто дебютируют у детей, однако из-за трудностей распознавания диагноз классической ПНГ чаще устанавливают у взрослых [41]. Частота выявления клона ПНГ у первичных больных АА младше 18 лет составляет приблизительно 40–50% [42, 43], однако активная гемолитическая ПНГ развивается не у всех больных и коррелирует с размером клона ПНГ (> 10% среди гранулоцитов) и активностью лактатдегидрогеназы (>1,5 верхней границы нормы) [44]. Клинические проявления гемолитической ПНГ включают слабость, гемоглобинурию, боль в животе, желтуху, дисфагию, лихорадку и инфекцию. У всех пациентов с подозрением на ПАА в дебюте заболевания и в динамике на фоне ИСТ и последующего

наблюдения обязательно исследование наличия и размера клона ПНГ методом проточной цитометрии с анализом экспрессии GPI-якорных белков среди гранулоцитов, моноцитов и эритроцитов, а также оценка клинических и лабораторных признаков внутрисосудистого гемолиза. Это необходимо для своевременного начала патогенетической таргетной терапии экулизумабом (моноклональное антитело против C5-компонента комплемента), позволяющей осуществлять контроль гемолиза, профилактику развития тромбозов и органных осложнений у этих пациентов.

Целью ведения пациентов с ПАА является быстрое начало лечения, и единый подход к диагностике поможет провести необходимое обследование в сроки, позволяющие обеспечить оптимальное лечение и наблюдение. Хотя пациенты подвержены риску смертности из-за кровотечений или инфекций, общая выживаемость у детей с ПАА в настоящее время составляет более 90% после проведения современных схем ИСТ с добавлением элтромбопага или ТГСК [45–47]. Однако на пути к диагнозу ПАА врача-гематолога подстерегают определенные диагностические сложности. Прежде всего необходимо отметить, что клиническая картина ПАА неспецифична и определяется внезапно развившейся цитопенией, с которой ассоциированы симптомы заболевания. Тромбоцитопения проявляется геморрагическим синдромом от петехий и экхимозов до угрожающих жизни кровотечений. Анемический синдром проявляется классической клинической картиной (бледность кожных покровов, быстрая утомляемость, тахикардия). Нейтропения приводит к рецидивирующим инфекциям, чаще грибковой или бактериальной природы, в связи с чем лихорадка или наличие очагов инфекции (отит, пневмония, язвенно-некротическое поражение слизистых полости рта и др.) могут возникать в качестве первоначальных жалоб. В ряде случаев диагноз АА может стать случайной лабораторной находкой. Также и основные диагностические тесты, а именно гематологические показатели крови, результаты морфологической оценки КМ по данным миелограммы и трепанобиопсии позволяют лишь установить факт наличия аплазии кроветворения и определить степень тяжести АА, тогда как при выборе тактики терапии основное значение имеет этиология АА. Поэтому идиопатическая ПАА по-прежнему остается диагнозом исключения. Необходимо провести целый ряд обследований для выявления причины цитопении и определения этиологии АА.

В 2021 г. был опубликован консенсусный диагностический алгоритм, разработанный Североамериканским консорциумом по АА у детей (North American Pediatric Aplastic Anemia Consortium), объединивший усилия детских онкогематологов и трансплантологов (экспертов в области АА, ВСКМН и МДС) для создания

единого подхода к методам диагностики тяжелой АА у детей с учетом современных знаний [48].

Ниже представлены основные аспекты обследования пациента с подозрением на АА, в том числе на основании этого алгоритма.

Необходимые обследования

Анамнез

В ряде случаев тщательный сбор анамнеза позволяет установить факторы, которые могли непосредственно повлиять на развитие АА, либо заподозрить подлежащее заболевание, которое могло привести к развитию цитопении. Семейный анамнез, включающий цитопению, заболевания крови и ЗНО у родственников, может указывать на ВСКМН или синдром предрасположенности к МДС/ОМЛ. Семейный анамнез гибели детей в раннем возрасте, наличие в анамнезе у пациента частых инфекционных эпизодов, аутоиммунных заболеваний позволяет заподозрить ВДИ. При сборе данных анамнеза необходимо оценить дебют заболевания у пациента и наличие сопутствующих патологических состояний: для ПАА чаще всего характерен острый дебют двух- или трехростковой цитопении у прежде здорового ребенка, тогда как длительная предшествующая одноростковая цитопения (изолированная тромбоцитопения, реже анемия), сопутствующие заболевания других органов и систем и/или частые инфекционные эпизоды могут указывать на возможное наличие у пациента ВСКМН или ВДИ. Данные о весе и росте ребенка при рождении, оценка физического и психического развития также могут оказаться полезными при подозрении на ВСКМН или ВДИ. Указания на перенесенный ранее гепатит с неустановленным инфекционным агентом с последующим развитием цитопении или параллельное развитие гепатита и цитопении могут свидетельствовать о гепатит-ассоциированной ПАА. Следует оценить характер питания ребенка для исключения возможных дефицитных анемий. Сведения о сопутствующих заболеваниях и их лечении, приеме лекарственных препаратов, пищевых добавок, проводимой химиолучевой терапии по поводу ЗНО в анамнезе могут способствовать выявлению вторичной АА.

Осмотр

При физикальном обследовании пациента с ПАА обычно не определяется никаких отклонений кроме анемического, геморрагического синдромов и очагов инфекции на фоне глубокой нейтропении; нехарактерно наличие лимфаденопатии, гепатоспленомегалии, изменения суставов, непетехиальной сыпи, желтухи. Выявление таких отклонений, как задержка роста и развития, стигмы дисэмбриогенеза, фенотипические особенности строения лица, аномалии

развития скелета, сердца или почек, пороки развития мочеполовой системы, изменения со стороны ногтей, зубов, кожи глаз и нарушение слуха, должно настораживать в отношении ВСКМН и синдромов предрасположенности к МДС/ОМЛ, а также некоторых ВДИ. При наличии кожных проявлений атопического дерматита в сочетании с аутоиммунными заболеваниями у пациента или его ближайших родственников, особенно при повышенной склонности к частым инфекциям, необходимо исключать ВДИ. Дебют заболевания у пациентов с АФ или ВД может не отличаться от такового у пациентов с ПАА. При выявлении нетипичных клинических проявлений или данных анамнеза необходимо проведение дополнительных тестов в зависимости от конкретной ситуации.

Лабораторное обследование

Анализ периферической крови

– Общий анализ крови с подсчетом лейкоцитарной формулы, оценкой абсолютного количества ретикулоцитов и мазка периферической крови.

– Биохимический анализ крови с оценкой показателей функции почек, печени, а также электролитов, лактатдегидрогеназы и мочевой кислоты, так как на начальных этапах в круг дифференциальной диагностики включают острый лейкоз и иммуноопосредованные цитопении. Поскольку приблизительно 10–15% ПАА у детей ассоциированы с предшествующим или сопутствующим гепатитом [49], следует оценить активность печеночных трансаминаз, концентрации общего билирубина и его фракций. Исследование содержания лактата в сыворотке крови рекомендовано при подозрении на синдром Пирсона [25]. Исследование ферментов ПЖ (концентрация панкреатической амилазы в крови, панкреатической эластазы в кале) при подозрении на СШД.

– Коагулологические тесты для оценки функции печени и перед инвазивными медицинскими процедурами.

– Прямой/непрямой антиглобулиновый тест (проба Кумбса) для исключения иммунной гемолитической анемии.

– Определение концентрации фолиевой кислоты, витамина B₁₂ в крови, показателей обмена железа для исключения дефицитных анемий.

– Исследования на инфекции методом полимеразной цепной реакции для выявления ЦМВ, ЭБВ, ВПГ-6, парвовируса В19 в крови/КМ; серологическое исследование крови на ВИЧ, вирусные гепатиты В и С.

– Иммунологические исследования: концентрация сывороточных иммуноглобулинов IgG, IgM, IgA, иммунофенотипирование лимфоцитов периферической крови (расширенная Т- и В-клеточная панель), TREC/KREC, дубль-негативные Т-лимфоциты в каче-

стве скрининговых тестов при подозрении на ВДИ.

Цитопении могут наблюдаться при СКВ, РА и других аутоиммунных заболеваниях. При подозрении на системное заболевание соединительной ткани: антинуклеарные антитела, ревматоидный фактор, компоненты комплемента С3 и С4, антифосфолипидные антитела, другие специальные тесты. Следует также помнить, что воспалительные ревматологические заболевания могут быть ассоциированы с АА и МДС [50, 51].

– Определение клона ПНГ в периферической крови методом высокочувствительной проточной цитометрии среди эритроцитов, нейтрофилов и моноцитов [13, 52].

– Тест на ломкость хромосом. «Золотым стандартом» является тест с дизепоксибутаном (ДЭБ) – обнаружение в лимфоцитах периферической крови спонтанного и индуцированного ДЭБ хромосомного разрыва, что указывает на АФ. В качестве альтернативы может использоваться тест с митомицином С (ММС). У небольшой доли пациентов с клиническим диагнозом АФ число разрывов хромосом при инкубации с ДЭБ или ММС может не увеличиваться в крови из-за соматического мозаицизма. При подозрении на АФ и отрицательном тесте на ломкость хромосом рекомендуется биопсия кожи для оценки хромосомных разрывов с помощью ДЭБ или ММС в культивируемых фибробластах [53].

– Исследование длины теломер в мононуклеарах периферической крови. Используется для диагностики ВД и других нарушений биологии теломер, характеризующихся укорочением их длины [54]. Для оценки длины теломер применяется несколько методов, однако наиболее применимым в клинической практике является определение относительной длины теломер методом проточной цитофлуориметрии [55, 56]. Существуют данные о том, что укорочение длины теломер у пациентов с ПАА без клинических и анамнестических признаков ВД может быть предиктором плохого ответа на ИСТ, повышенного риска рецидива заболевания, клональной эволюции в МДС с моносомией 7 и ухудшения общей выживаемости [57, 58].

– Определение содержания фетального гемоглобина (HbF) методом электрофореза гемоглобина. В условиях нормального эритропоэза HbF быстро снижается в течение первых 6 месяцев – 1 года жизни и в дальнейшем составляет < 1% от общей концентрации гемоглобина. При состояниях дизэритропоэза или «стрессового» эритропоэза часто наблюдается повышение HbF после периода новорожденности. У пациентов с ВСКМН (в частности АФ, ВД, СШД) наблюдается «стрессовый» эритропоэз с анемией, макроцитозом, повышением HbF > 1% и высоким содержанием эритропоэтина [59]. Опре-

деление HbF – полезный дополнительный тест для дифференциальной диагностики ПАА и ВСКМН, хотя его повышение не является специфичным и может наблюдаться при наследственной персистенции HbF, талассемии, МДС, лейкозе, выздоровлении при транзитной эритробластопении детского возраста.

– HLA-типирование пациента и сиблингов (родных братьев и сестер) по HLA I класса (A, B, C) и II класса (DR, DQ). При наличии полностью HLA-совместимого сиблинга в первой линии терапии АА у детей проводится аллогенная ТГСК, после которой долгосрочная выживаемость пациентов в настоящее время приближается к 100% [60].

Исследования костного мозга

– Аспирация КМ из 2 анатомических точек (подвздошные кости). Проводятся морфологическое и иммунофенотипическое исследования для исключения инфильтрации КМ лейкоэмическими бластами или клетками злокачественных опухолей.

– Трепанобиопсия для определения клеточности, морфологии КМ и оценки миелофиброза.

– Стандартное цитогенетическое исследование клеток КМ (кариотипирование) и определение моносомии/делеции хромосомы 7 методом флуоресцентной гибридизации *in situ* как наиболее частой и значимой аномалии у детей. При выявлении моносомии/делеции хромосомы 7 у пациента детского возраста рекомендовано исследование на наличие герминальных мутаций в генах *SAMD9/SAMD9L* и *GATA2*. При некоторых ВСКМН (например, АФ, ВД, СШД) и подозрении на прогрессию в МДС/ОМЛ у детей описаны моносомия/делеция хромосомы 7, а также клональные цитогенетические аномалии хромосом 1, 3, 5, 8, 11 и 20 [16, 61, 62]. При СШД часто встречаются *del20q11* и *изохромосома 7q10*, которые могут сохраняться в виде изолированной аномалии без прогрессирования в МДС/ОМЛ [63].

Молекулярно-генетическая диагностика

Все большее значение для верификации этиологии АА приобретают методы молекулярно-генетического анализа, такие как секвенирование по Сэнгеру, высокопроизводительное секвенирование с помощью таргетных панелей генов, полноэкзомное секвенирование и полногеномное секвенирование, метод мультиплексной амплификации лигазозависимых проб, хромосомный микроматричный анализ, которые доступны в крупных федеральных центрах и коммерческих лабораториях. В то время как ПАА можно успешно лечить с применением ИСТ или ТГСК, у пациентов с АА в рамках ВСКМН и ВДИ выявление подлежащего генетического дефекта может иметь важные последствия для выбора терапии и в случае запланированной ТГСК – для выбора донора.

Кроме того, при ВСКМН с дефектом репарации ДНК (например, АФ), укорочением длины теломер (ВД) или определенными дефектами рибосом (СШД) потребуются изменения в режиме кондиционирования, чтобы избежать чрезмерной токсичности при проведении аллогенной ТГСК [17]. Решение о необходимости выполнения молекулярно-генетического исследования пациенту и потенциальному донору, а также выбор метода исследования зависит от результатов обследования согласно вышеописанному алгоритму, характера цитопении, сроков получения результатов генетического тестирования, срочности начала лечения и выбора донора для трансплантации [64, 65]. При отсутствии лабораторных данных и/или доказанного генетического дефекта, подтверждающих ВСКМН, генетическое тестирование родственных доноров не показано и может привести к неоправданной задержке ТГСК. Важно помнить, что отрицательный результат молекулярно-генетического исследования не исключает ВСКМН или ВДИ. Если есть подозрение на генетически-детерминированное заболевание и необходимо срочно провести ТГСК, то может быть рассмотрен вопрос о поиске неродственного донора. Тесное сотрудничество с клиническим и лабораторным генетиком поможет выбрать подходящие молекулярно-генетические исследования, правильно оценить полученные результаты и осуществлять медико-генетическое консультирование семей. Широко распространена практика проведения молекулярно-генетического тестирования в целях выявления ВСКМН всем пациентам с АА. Однако в настоящее время недостаточно данных, чтобы рекомендовать генетическое тестирование для пациентов без клинических, лабораторных или анамнестических факторов риска, указывающих на наличие ВСКМН, особенно если не планируется ТГСК от родственного донора [48]. Решение следует принимать индивидуально, принимая во внимание ожидаемую пользу вследствие верификации генетического диагноза ВСКМН у конкретного пациента и потенциальную задержку в лечении, связанную с длительностью проведения некоторых молекулярно-генетических тестов (полноэкзомное и полногеномное секвенирование), а также невозможность исключения конституционального дефекта на основании отрицательных результатов генетического тестирования. При отсутствии ответа на первую линию ИСТ молекулярно-генетическое исследование рекомендовано всем пациентам с рефрактерной ПАА для исключения генетической причины заболевания и выбора тактики дальнейшей терапии. Возможно, в будущем дополнительные исследования в области молекулярно-генетической диагностики ВСКМН, проводимые в настоящее время много-

численными научно-исследовательскими группами, помогут сформулировать более однозначные критерии для назначения тех или иных генетических тестов в целях подтверждения наличия конституционального дефекта у пациентов с предполагаемой идиопатической ПАА.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Помимо описания стандартного обследования, которое должны пройти все пациенты с АА, в работе указаны особенности анамнеза и клинично-лабораторные данные, которые должны привести к дальнейшему расширенному обследованию пациента на наличие других заболеваний, включая ВСКМН и ВДИ. Современные молекулярно-генетические методы, несомненно, улучшили наше понимание этой гете-

рогенной группы заболеваний и стали ключевым инструментом в верификации диагноза. Вследствие широкого применения генетических исследований научные знания о данной группе заболеваний продолжают расширяться, это позволит усовершенствовать диагностику и лечение АА.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование проведено при поддержке фонда «Наука – детям».

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

ORCID

Goronkova O.V. ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-8571-5395>

Pavlova A.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3974-5662>

Raykina E.V. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-7634-2053>

Литература / References

- Miano M., Dufour C. The diagnosis and treatment of aplastic anemia: a review. *Inter J Hematol* 2015; 101 (6): 527–35.
- Young N.S. Aplastic anaemia. *N Engl J Med* 2018; 379 (17): 1643–56.
- Hartung H.D., Olson T. S., Bessler M. Acquired aplastic anemia in children. *Pediatr Clin North Am* 2013; 60 (6): 1311–36.
- Румянцев А.Г., Масчан А.А. Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению приобретенной апластической анемии у детей. М.; 2015. [Rumyantsev A.G., Maschan A.A. Federal clinical guidelines for the diagnosis and treatment of acquired aplastic anemia in children. Moscow; 2015. (In Russ.).]
- Camitta B.M., Rapoport J.M., Parkman R., Nathan D.G. Selection of patients for bone marrow transplantation in severe aplastic anemia. *Blood* 1975; 45 (3): 355–63.
- Furlong E., Carter T. Aplastic anaemia: Current concepts in diagnosis and management. *J Paediatr Child Health* 2020; 56 (7): 1023–8.
- Young N.S., Calado R.T., Scheinberg P. Current concepts in the pathophysiology and treatment of aplastic anemia. *Blood* 2006; 108 (8): 2509–19.
- Deng X.Z., Du M., Peng J., Long J.X., Zheng C.J., Tan Y., et al. Associations between the HLA-A/B/DRB1 polymorphisms and aplastic anemia: Evidence from 17 case-control studies. *Hematology* 2018; 23 (3): 154–62.
- Timeus F., Crescenzo N., Longoni D., Doria A., Foglia L., Pagliano S., et al. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clones in children with acquired aplastic anemia: a multicentre study. *PLoS One* 2014; 9 (7): e101948.
- Sun L., Babushok D.V. Secondary myelodysplastic syndrome and leukemia in acquired aplastic anemia and paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 2020; 136 (1): 36–49.
- DeZern A.E., Symons H.J., Resar L.S., Borowitz M.J., Armanios M.Y., Brodsky R.A. Detection of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clones to exclude inherited bone marrow failure syndromes. *Eur J Haematol* 2014; 92 (6): 467–70.
- Narita A., Muramatsu H., Sekiya Y., Okuno Y., Sakaguchi H., Nishio N., et al. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and telomere length predicts response to immunosuppressive therapy in pediatric aplastic anemia. *Haematologica* 2015; 100 (12): 1546–52.
- Lima M. Laboratory studies for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, with emphasis on flow cytometry. *Pract Lab Med* 2020; 20: e00158.
- Shimamura A., Alter B.P. Pathophysiology and management of inherited bone marrow failure syndromes. *Blood Rev* 2010; 24 (3): 101–22.
- Wilson D., Link D., Mason P., Bessler M. Inherited bone marrow failure syndromes in adolescents and adults. *Ann Med* 2014; 46 (6): 353–63.
- Savage S.A., Dufour C. Classical inherited bone marrow failure syndromes with high risk for myelodysplastic syndrome and acute myelogenous leukemia. *Semin Hematol* 2017; 54 (2): 105–14.
- Dokal I., Tummala H., Vulliamy T. Inherited bone marrow failure in the pediatric patient. *Blood* 2022; 140 (6): 556–70.
- Niewisch M.R., Savage S.A. An update on the biology and management of dyskeratosis congenita and related telomere biology disorders. *Expert Rev Hematol* 2019; 12 (12): 1037–52.
- Myers K.C., Bolyard A.A., Otto B., Wong T.E., Jones A.T., Harris R.E., et al. Variable clinical presentation of Shwachman-Diamond syndrome: update from the North American Shwachman-Diamond Syndrome Registry. *J Pediatr* 2014; 164 (4): 866–70.
- Тесаков И.П., Деордиева Е.А., Бронтвейн Т.Г., Свешникова А.Н. Синдром Швахмана–Даймонда: взгляд гематолога. *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии* 2023; 22 (3): 185–91. DOI: 10.24287/1726-1708-2023-22-3-185-191 [Tesaakov I.P., Deordieva E.A., Brontveyn T.G., Sveshnikova A.N. Shwachman–Diamond syndrome: a hematologist's view. *Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology* 2023; 22 (3): 185–91. (In Russ.).]
- Warren A.J. Molecular basis of the human ribosomopathy Shwachman–Diamond syn-

- drome. *Adv Biol Regul* 2018; 67: 109–27.
22. Федорова Д.В., Сметанина Н.С. Современные представления о патогенезе анемии Даймонда–Блекфена (обзор литературы). Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2013; 12(3): 6–14. [Fedorova D.V., Smetanina N.S. Current knowledge of the pathogenesis of Diamond-Blackfan anemia (a literature review). *Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology* 2013; 12(3): 6–14. (In Russ.)].
 23. Vlachos A., Ball S., Dahl N., Alter B.P., Sheth S., Ramenghi U., et al; Participants of Sixth Annual Daniella Maria Arturi International Consensus Conference. Diagnosing and treating Diamond Blackfan anaemia: results of an international clinical consensus conference. *Br J Haematol* 2008; 142 (6): 859–76.
 24. Farruggia P., Di Marco F., Dufour C. Pearson syndrome. *Expert Rev Hematol* 2018; 11 (3): 239–46.
 25. Овсянникова Г.С., Калинина И.И., Байдильдина Д.Д., Хачатрян Л.А., Масчан М.А., Сметанина Н.С. Синдром Пирсона. Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского 2014; 93 (6): 83–9. [Ovsyannikova G.S., Smetanina N.S., Khachatryan L.A., Maschan M.A., Kalinina I.I., Baydildina D.D. Pearson syndrome. *Pediatria. Journal n. a. G.N. Speransky* 2014; 93 (6): 83–9. (In Russ.)].
 26. Mikstiene V., Songailiene J., Byckova J., Rutkauskienė G., Jasinskienė E., Verkauskienė R., et al. Thiamine-responsive megaloblastic anemia syndrome: a novel homozygous SLC19A2 gene mutation identified. *Am J Med Genet A* 2015; 167 (7): 1605–9.
 27. Lozano Chinga M.M., Bertuch A.A., Afify Z., Dollerschell K., Hsu J.I., John T.D., et al. Expanded phenotypic and hematologic abnormalities beyond bone marrow failure in *MECOM*-associated syndromes. *Amer J Med Gen* 2023; 191 (7): 1826–35.
 28. Germeshausen M., Ancliff P., Estrada J., Metzler M., Ponstingl E., Rütschle H., et al. *MECOM*-associated syndrome: A heterogeneous inherited bone marrow failure syndrome with amegakaryocytic thrombocytopenia. *Blood Advances* 2018; 2: 586–96.
 29. Tangye S.G., Al-Herz W., Bousfiha A., Cunningham-Rundles C., Franco J.L., Holland S.M., et al. Human Inborn Errors of Immunity: 2022 Update on the Classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee. *J Clin Immunol* 2022; 42 (7): 1473–507.
 30. Wlodarski M.W., Collin M., Horwitz M.S. GATA2 deficiency and related myeloid neoplasms. *Semin Hematol* 2017; 54 (2): 81–6.
 31. Kuehn H.S., Ouyang W., Lo B., Deenick E.K., Niemela J.E., Avery D.T., et al. Immune dysregulation in human subjects with heterozygous germline mutations in CTLA4. *Science* 2014; 345 (6204): 1623–27.
 32. Богданова Д.В., Родина Ю.А., Райкина Е.В., Алексенко М.Ю., Кива А.М., Роппельт А.А. и др. Клиническая характеристика группы пациентов с синдромом гаплонедостаточности CTLA4: опыт одного Центра. Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского 2021; 100 (2): 22–30. DOI: 10.24110/0031-403X-2021-100-2-22-30 [Bogdanova D.V., Rodina Yu.A., Raykina E.V., Alexenko M.Yu., Kieva A.M., Roppelt A.A., et al. Clinical characteristics of a group of patients with CTLA4 haploinsufficiency syndrome: experience of one center. *Pediatria. Journal n. a. G.N. Speransky* 2021; 100 (2): 22–30. (In Russ.)].
 33. Michniacki T.F., Hannibal M., Ross C.W., Frame D.G., DuVall A.S., Khoriaty R., et al. Hematologic manifestations of deficiency of adenosine deaminase 2 (DADA2) and response to tumor necrosis factor inhibition in DADA2-associated bone marrow failure. *J Clin Immunol* 2018; 38 (2): 166–73.
 34. Козлова А.Л., Нестеренко З.А., Егорова К.К., Кан Н.Ю., Хорева А.Л., Моисеева А.А. и др. Многоликость аутовоспаления: синдром дефицита аденозиндеаминазы 2 (DADA2) у ребенка 12 лет. Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского 2021; 100 (2): 246–53. DOI: 10.24110/0031-403X-2021-100-2-246-253 [Kozlova A.L., Nesterenko Z.A., Egorova K.K., Kan N.Yu., Khoreva A.L., Moiseeva A.A., et al. The many faces of autoinflammation: adenosine deaminase 2 (DADA2) deficiency in a 12 year old. *Pediatria. Journal n. a. G.N. Speransky* 2021; 100 (2): 246–53. (In Russ.)].
 35. Sanjay S., Patel M.D. Pediatric myelodysplastic syndromes. *Clin Lab Med* 2021; 41 (3): 517–28.
 36. Arber A.A., Orazi A., Hasserjian R.P., Borowitz M.J., Calvo K.R., Kvasnicka H.-M., et al. International Consensus Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemias: integrating morphologic, clinical, and genomic data. *Blood* 2022; 140 (11): 1200–28.
 37. Babushok D.V., Bessler M., Olson T.S. Genetic predisposition to myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia in children and young adults. *Leuk Lymphoma* 2016; 57 (3): 520–36.
 38. Sahoo S.S., Kozyra E.J., Wlodarski M.W. Germline predisposition in myeloid neoplasms: Unique genetic and clinical features of GATA2 deficiency and SAMD9/SAMD9L syndromes. *Best Pract Res Clin Haematol* 2020; 33 (3): 101–97.
 39. Wlodarski M.W., Hirabayashi S., Pastor V., Stary J., Hasle H., Masetti R., et al. Prevalence, clinical characteristics, and prognosis of GATA2-related myelodysplastic syndromes in children and adolescents. *Blood* 2016; 127 (11): 1387–97.
 40. Locatelli F., Strahm B. How I treat myelodysplastic syndromes of childhood. *Blood* 2018; 131 (13): 1406–14.
 41. Кулагин А.Д., Климова О.У., Добронравов А.В., Рудакова Т.А., Голубовская И.К., Лапина А.В. и др. Пароксизмальная ночная гемоглобинурия у детей и взрослых: сравнительный клинический профиль и долгосрочный прогноз. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2018; 17 (3): 11–21. DOI: 10.24287/1726-1708-2018-17-3-11-21 [Kulagin A.D., Klimova O.U., Dobronravov A.V., Rudakova T.A., Golubovskaya I.K., Lapina A.V., et al. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in children and adults: comparative clinical profile and long-term prognosis. *Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology* 2018; 17 (3): 11–21. (In Russ.)].
 42. Kulagin A., Lisukov I., Ivanova M., Golubovskaya I., Kruchkova I., Bondarenko S., et al. Prognostic value of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria clone presence in aplastic anaemia patients treated with combined immunosuppression: results of two-centre prospective study. *Br J Haematol* 2014; 164 (4): 546–54.
 43. Новичкова Г.А., Петрова У.Н., Калинина И.И., Масчан А.А. Пароксизмальная ночная гемоглобинурия у детей (обзор литературы). Доктор.Ру. Гематология 2016; 5 (122): 15–20. [Novichkova G.A., Petrova U.N., Kalinina I.I., Maschan A.A. Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria in Children: Literature Review.

- Doctor.Ru 2016; 5 (122): 15–20. (In Russ.)).
44. Urbano-Ispizua A., Muus P., Schrezenmeier H., Almeida A.M., Wilson A., Ware R.E. Different clinical characteristics of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in pediatric and adult patients. *Haematologica* 2017; 102 (3): 76–9.
 45. Dufour C., Veys P., Carraro E., Bhatnagar N., Pillon M., Wynn R., et al. Similar outcome of upfront-unrelated and matched sibling stem cell transplantation in idiopathic paediatric aplastic anaemia. A study on behalf of the UK Paediatric BMT working party, Paediatric diseases working party and severe aplastic Anaemia working party of EBMT. *Br J Haematol* 2015; 171 (4): 585–94.
 46. Townsley D.M., Scheinberg P., Winkler T., Desmond R., Dumitriu B., Rios O., et al. Eltrombopag added to standard immunosuppression for aplastic anemia. *N Engl J Med* 2017; 376 (16): 1540–50.
 47. Goronkova O., Novichkova G., Salimova T., Kalinina I., Baidildina D., Petrova U., et al. Efficacy of combined immunosuppression with or without eltrombopag in children with newly diagnosed aplastic anemia. *Blood Adv* 2023; 7 (6): 953–62.
 48. Shimano K.A., Narla A., Rose M.J., Gloude N.J., Allen S.W., Bergstrom K. Diagnostic work-up for severe aplastic anemia in children: Consensus of the North American Pediatric Aplastic Anemia Consortium. *Hematology* 2021; 96 (11): 1491–504.
 49. Gonzalez-Casas R., Garcia-Buey L., Jones E.A., Gisbert J.P., Moreno-Otero R. Systematic review: hepatitis-associated aplastic anaemia – a syndrome associated with abnormal immunological function. *Aliment Pharmacol Ther* 2009; 30 (5): 436–43.
 50. Горонкова О.В., Калинина И.И., Салимова Т.Ю., Сунцова Е.В., Петрова У.Н., Байдильдина Д.Д. и др. Аутоиммунные заболевания у детей с приобретенной апластической анемией. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2018; 17 (1): 23–8. DOI: 10.24287/1726-1708-2018-17-1-23-28 [Goronkova O.V., Kalinina I.I., Salimova T.Yu., Suntsova E.V., Petrova U.N., Baydildina D.D., et al. Autoimmune diseases in children with acquired aplastic anemia. *Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology* 2018; 17 (1): 23–8. (In Russ.)].
 51. Mobini M., Shekarriz R., Ali Mohammad Pour R., Zakeri S. Inflammatory rheumatologic disorders in patients with myelodysplastic syndromes: a cross-sectional study. *Int J Hematol Oncol Stem Cell Res* 2015; 9 (1): 22–5.
 52. Попов А.М., Кашпор С.А., Вержбицкая Т.Ю., Борисов В.И., Фечина Л.Г., Плясунова С.А. и др. Определение FLAER-негативных гранулоцитов в периферической крови – простой скрининг-тест для диагностики пароксизмальной ночной гемоглобинурии. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2016; 15 (3): 12–8. DOI: 10.24287/1726-1708-2016-15-3-12-18 [Popov A.M., Kashpor S.A., Verzhbitskaya T.Yu., Borisov V.V., Fechina L.G., Plyasunova S.A., et al. FLAER-negative granulocytes detection in peripheral blood is simple and highly reproducible test for pnh screening. *Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology* 2016; 15 (3): 12–8. (In Russ.)].
 53. Auerbach A.D. Diagnosis of Fanconi anemia by diepoxybutane analysis. *Curr Protoc Hum Genet* 2015; 85: 8.7.1–17.
 54. Alter B.P., Giri N., Savage S.A., Rosenberg P.S. Telomere length in inherited bone marrow failure syndromes. *Haematologica* 2015; 100 (1): 49–54.
 55. Дёмина И.А., Семченкова А.А., Кагирова З.Р., Попов А.М. Измерение абсолютной длины теломер методом проточной цитометрии. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2018; 17 (4): 68–74. DOI: 10.24287/1726-1708-2018-17-4-68-74 [Demina I.A., Semchenkova A.A., Kagirova Z.R., Popov A.M. Flow cytometric measurement of absolute telomere length. *Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology* 2018; 17 (4): 68–74. (In Russ.)].
 56. Lai T.-P., Wright W.E., Shay J.W. Comparison of telomere length measurement methods. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2018; 373 (1741): 20160451.
 57. Park H.S., Park S.N., Im K., Kim S.-M., Kim J.-A., Hwang S.M., et al. Telomere length and somatic mutations in correlation with response to immunosuppressive treatment in aplastic anaemia. *Br J Haematol* 2017; 178 (4): 603–15.
 58. Scheinberg P., Cooper J.N., Sloand E.M., Wu C.O., Calado R.T., Young N.S. Association of telomere length of peripheral blood leukocytes with hematopoietic relapse, malignant transformation, and survival in severe aplastic anemia. *JAMA* 2010; 304 (12): 1358–64.
 59. Alter B.P., Rosenberg P.S., Day T., Menzel S., Giri N., Savage S.A., et al. Genetic regulation of fetal haemoglobin in inherited bone marrow failure syndromes. *Br J Haematol* 2013; 162 (4): 542–6.
 60. Georges G.E., Doney K., Storb R. Severe aplastic anemia: allogeneic bone marrow transplantation as first-line treatment. *Blood Adv* 2018; 2 (15): 2020–8.
 61. Fox L.C., Wood E.M., Ritchie D.S., Blombery P. Diagnostic evaluation and considerations in hypocellular bone marrow failure – a focus on genomics. *Int J Lab Hematol* 2020; 42 (Suppl 1): 82–9.
 62. Quentin S., Cuccuini W., Ceccaldi R., Nibourel O., Pondarre C., Pages M.-P., et al. Myelodysplasia and leukemia of Fanconi anemia are associated with a specific pattern of genomic abnormalities that includes cryptic RUNX1/AML1 lesions. *Blood* 2011; 117 (15): e161–70.
 63. Pressato B., Valli R., Marletta C., Mare L., Montalbano G., Curto F.L., et al. Cytogenetic monitoring in Shwachman–Diamond syndrome: a note on clonal progression and a practical warning. *J Pediatr Hematol Oncol* 2015; 37 (4): 307–10.
 64. West A.H., Churpek J.E. Old and new tools in the clinical diagnosis of inherited bone marrow failure syndromes. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2017; 2017 (1): 79–87.
 65. Lin F., Cao K., Chang F., Oved J.H., Luo M., Fan Z., et al. Uncovering the Genetic Etiology of Inherited Bone Marrow Failure Syndromes Using a Custom-Designed Next-Generation Sequencing Panel 2024; 26 (3): 191–201. DOI: 10.1016/j.jmoldx.2023.11.010

© 2024 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ
им. Дмитрия Рогачева»
Минздрава России
Поступила 05.12.2023
Принята к печати 08.04.2024



EDN: WGSPSF

Контактная информация:

Свешникова Анастасия Никитична,
д-р физ.-мат. наук, заведующая
лабораторией клеточной биологии и
трансляционной медицины ФГБУ «НМИЦ
ДГОИ им. Дмитрия Рогачева»
Минздрава России
Адрес: 117997, Москва,
ул. Саморы Машела, 1
E-mail: a.sveshnikova@physics.msu.ru

© 2024 by «D. Rogachev NMRCPHOI»

Received 05.12.2023
Accepted 08.04.2024

Correspondence:

Anastasia N. Sveshnikova,
Dr. Sci. in Physics and Mathematics, Head
of the Laboratory of Cellular Biology
and Translational Medicine of the Dmitry
Rogachev National Medical Research Center
of Pediatric Hematology, Oncology
and Immunology, Ministry of Healthcare
of the Russian Federation
Address: 1 Samory Mashela St.,
Moscow 117997, Russia
E-mail: a.sveshnikova@physics.msu.ru

DOI: 10.24287/1726-1708-2024-23-2-222-230

Внутриклеточная сигнализация при феномене запрограммированной гибели нейтрофилов с появлением внеклеточных ДНК-ловушек при тромбообразовании

А.Н. Свешникова¹⁻³, Е.А. Адаманская^{1,3}, Ю.-Д.Д. Коробкина³, М.А. Пантелеев¹⁻³

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, Москва

²ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», Москва

³ФГБУН «Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии» РАН, Москва

Формирование внеклеточных ДНК-ловушек нейтрофилов (NET-оз) является важной составляющей многих патологических процессов, относящихся к областям современной гематологии, онкологии и иммунологии. Этот механизм запрограммированной клеточной смерти нейтрофилов и других лейкоцитов оказался вовлечен и в патогенез тромбозов и тромботических осложнений многих заболеваний. В данном обзоре мы рассматриваем пути внутриклеточной сигнализации, ведущие к активации нейтрофилов в условиях тромбоза и гемостаза. Несмотря на то, что биохимические реакции в клетке изучены достаточно хорошо, в NET-оз оказываются вовлечены такие специфические белки, как NADPH-оксидаза (NOX) и пептидил-аргинин деиминаза (PAD4), регуляция активности которых изучена недостаточно. Отдельно рассматриваются существующие подходы к фармакологической модуляции NET-оза.

Ключевые слова: нейтрофилы, ДНК-ловушки, внутриклеточная сигнализация, тромбозы

Свешникова А.Н. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2024; 23 (2): 222–30. DOI: 10.24287/1726-1708-2024-23-2-222-230

Intracellular signaling involved in the programmed neutrophil cell death leading to the release of extracellular DNA traps in thrombus formation

A.N. Sveshnikova¹⁻³, E.A. Adamanskaya^{1,3}, Yu.-D.D. Korobkina³, M.A. Pantelev¹⁻³

¹Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology of Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow

²M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow

³Center for Theoretical Problems of Physical and Chemical Pharmacology, Russian Academy of Sciences, Moscow

The formation of extracellular DNA traps by neutrophils, or NETs (neutrophil extracellular traps) plays an essential role in many pathological processes related to hematological, oncological, and immunological diseases. This mechanism of the programmed cell death of neutrophils and other leukocytes appears to be also involved in the pathogenesis of thrombosis and thrombotic complications of a variety of disorders. In this review, we discuss the pathways of intracellular signaling leading to neutrophil activation in thrombosis and hemostasis. Even though the biochemical reactions in a cell are quite well investigated, the regulation of activity of specific proteins involved in NETosis, such as NADPH oxidase (NOX) and protein-arginine deiminase (PAD4), requires further investigation. Current approaches to the pharmacological modulation of NETosis are also specifically addressed here.

Key words: neutrophils, DNA traps, intracellular signaling, thrombosis

Sveshnikova A.N., et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology 2024; 23 (2): 222–30.
DOI: 10.24287/1726-1708-2024-23-2-222-230

Внеклеточные ДНК-ловушки (neutrophil extracellular traps, NETs) – «выбрасываемые» активированными нейтрофилами отрицательно заряженные нити ДНК с ассоциированными с ними активными ферментами нейтрофилов (рисунки 1А) – представляют собой результат гиперактивации нейтрофилов при выполнении их функций. Формирование NETs (NET-оз) имеет и патологическую сторону: оно сопровождается любой тромботической процесс, в ряде случаев являясь его причиной [1]. NETs также считаются важной патогенной частью микроокружения опухоли и сопровождают рак-ассоциированный тромбоз [2]. В частности, при раке

молочной железы происходит значительное повышение доли нейтрофилов, переходящих в NET-оз [3] (рисунки 1Б). При этом, возможно, именно активированные тромбоциты являются индукторами NET-оза в окрестности опухоли [4]. При избыточной активации нейтрофилов в месте воспаления сосудистого эндотелия сети приходят в контакт с циркулирующей кровью и вызывают тромбообразование по внутреннему пути свертывания крови [5], что приводит, в частности, к венозным тромбозам [6].

Настоящий обзор посвящен одному из наиболее плохо изученных аспектов NET-оза – внутриклеточной сигнализации, управляющей происходящей

Рисунок 1

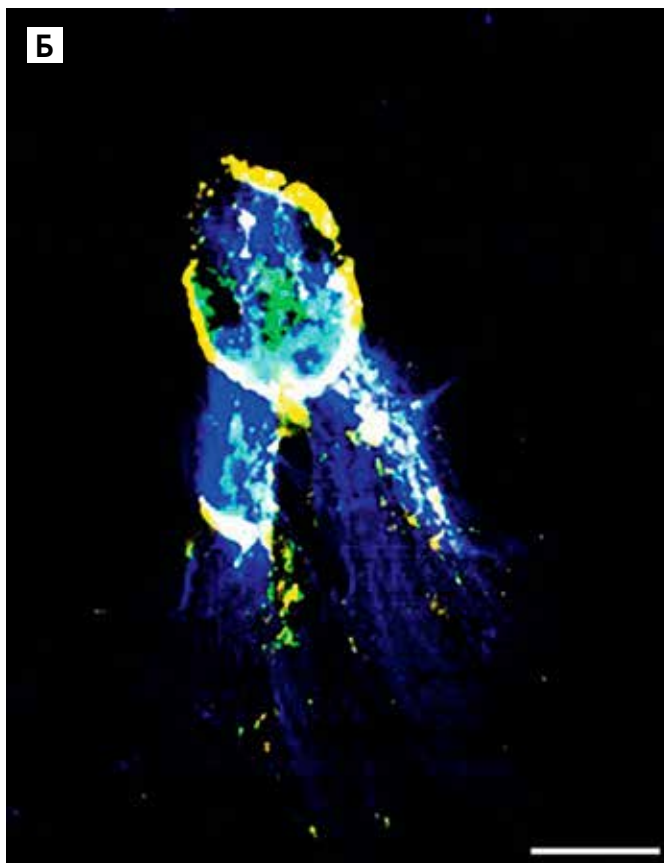
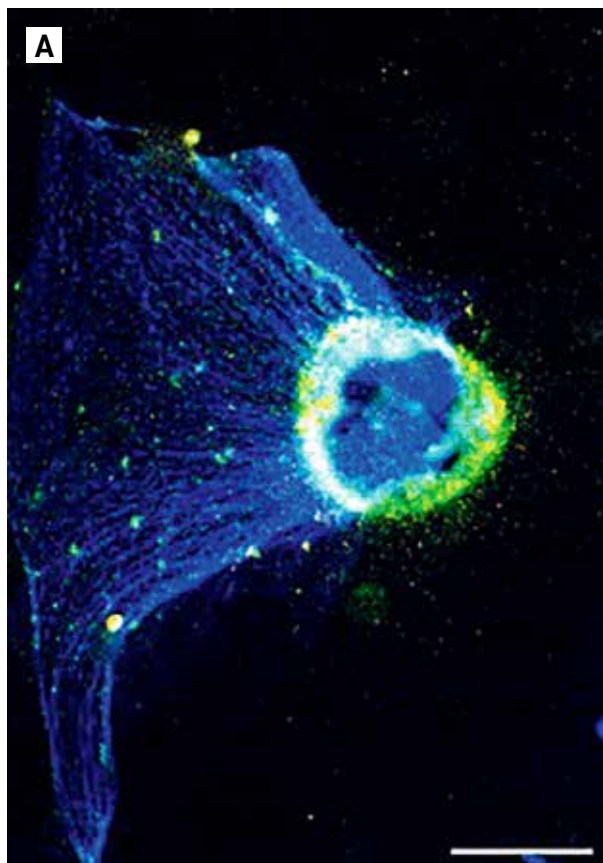
Конфокальная микроскопия PFA-фиксированных гранулоцитов (адаптировано из [3])

Синий цвет – ДНК (окраска Hoechst33342); зеленый цвет – миелопероксидаза (MPO); желтый цвет – эластаза (Ela; окраска флуоресцентно-мечеными антителами). Масштабный отрезок 10 мкм. А – типичный нейтрофил здорового донора, испытавший суицидальный NET-оз, можно видеть покрытые ферментами нити ДНК, выходящие за пределы мембраны клетки; Б – типичный NET-озный нейтрофил пациента с раком молочной железы

Figure 1

Confocal microscopy of PFA-fixed granulocytes (adapted from [3])

DNA is represented in blue (Hoechst33342 dye), myeloperoxidase (MPO) in green, and elastase (Ela) in yellow (a fluorescent antibody stain). Scale bar is 10 μ m. A, a typical neutrophil from a healthy donor undergoing suicidal NETosis: there are DNA strands coated with enzymes extending beyond the cell membrane; B, a typical NETotic neutrophil from a patient with breast cancer



в ситуации тромбообразования активацией нейтрофилов, и пути перехода в состояние гиперактивации, сопровождающееся NET-озом.

Условия возникновения ДНК-ловушек нейтрофилов

Нейтрофилы, или сегментоядерные лейкоциты, являются первой линией защиты организма от патогенов, осуществляемой за счет фагоцитоза и дегрануляции [7, 8]. В месте воспаления нейтрофилы оказываются благодаря их способности двигаться против градиента хемоаттрактантов [9], выделяемых другими клетками, бактериями, активированными тромбоцитами или самими нейтрофилами [10]. В случае воспаления или повреждения сосудистого эндотелия тромбоциты быстро адгезируют к активированным эндотелиоцитам или белкам межклеточного матрикса и образуют тромб [11], что привлекает нейтрофилы [12], которые проникают в область раны, фагоцитируют бактерии и производят цитокины, которые привлекают другие лейкоциты [13].

В условиях тромбовоспаления или другой гиперактивации нейтрофилов наблюдается высвобождение NETs, характеризующихся появлением внеклеточной ДНК с ассоциированными с ней белками нейтрофилов – MPO, Ela, а также цитрулированными гистонами [12].

Классический вариант NET-оза, суицидальный, в экспериментах *in vitro* наблюдается при активации нейтрофилов PMA – химическим агентом, напрямую активирующим протеинкиназу C (PKC) [14]. Считается, что активная PKC приводит к активации NADPH-оксидазы (NOX) нейтрофилов, что ведет к высвобождению активных форм кислорода (ROS), опосредующих окисление гистонов и расплетение хроматина, а также разрушение мембран гранул и выход гранулярных ферментов в цитозоль [15]. Другой вариант NET-оза, витальный, характеризуется выбросом ДНК без гибели клеток, запускается липополисахаридами или цитокинами и не зависит от NOX и ROS [16]. Ключевым ферментом в витальном NET-озе считается деиминаза PAD4, в частности,

деимилирующая аргинин в гистонах, что приводит к расплечению ДНК [17].

Внутриклеточная сигнализация, приводящая к высвобождению миелопероксидазы и эластазы

В гранулах гранулоцитов хранится несколько ферментов, обладающих противомикробными функциями [18]. На NETs в первую очередь обнаруживают два из них – Ela и MPO (рисунк 1) [19]. Нейтрофильная Ela является сериновой протеазой, она выходит из гранул при активации нейтрофила [20, 21] и может разрушать клеточную стенку бактерий [22, 23]. Дополнительно Ela действует на иммунный ответ, модифицируя иммуноглобулины и компоненты комплемента [24]. Регуляция деятельности Ela проводится несколькими эндогенными ингибиторами (например, альфа-1-антитрипсин (A1AT)), которые ограничивают чрезмерную активность Ela [22, 25].

При выполнении защитной функции нейтрофильная Ela может вносить вклад и в патогенез таких заболеваний, как муковисцидоз и хроническая обструктивная болезнь легких [22, 26]. Проявляется это за счет чрезмерного выделения Ela, несущего за собой повреждение тканей организма и продуцирование воспаления. В связи с этим ингибиторы Ela рассматриваются как возможные средства лечения воспалительных и аутоиммунных заболеваний [27].

MPO – фермент нейтрофильных лизосом, является катализатором превращения перекиси водорода в хлорноватистую кислоту (HOCl) [28]. HOCl является достаточно мощным окислителем, уничтожающим бактерии, вирусы и иные патогены. Подобно Ela MPO играет важную роль в иммунном ответе организма, а чрезмерная активность этого фермента способствует повреждению тканей и развитию заболеваний. Хотя Ela и MPO выполняют разные функции, они могут регулировать активность друг друга. Так, Ela за счет расщепления пропептида активирует MPO, а MPO, окисляя остатки цистеина на ней, инактивирует Ela [29]. Тем не менее Ela, скорее, важна для антибактериальной активности NETs, нежели для регуляции их формирования. У мышей, не имеющих Ela, формирование NETs идет нормально как в ответ на стандартные агонисты, так и при тромбозе [30].

Состояние нейтрофилов в крови здорового человека называется «спящим состоянием» [31]. При появлении медиаторов воспаления нейтрофилы переходят в состояние «роллинга» – качения по эндотелию, заканчивающегося их экстравазацией к очагу воспаления. Основными медиаторами этого процесса являются интерлейкин-8 (IL-8), фактор активации тромбоцитов (PAF), лейкотриен B₄ (LTB₄), компонент комплемента C5a и др. [32]. Это означает, что классические хемоаттрактанты инициируют активацию нейтрофилов, достаточную для перестройки цитоске-

лета, – действительно, рецепторы ко всем перечисленным медиаторам, как и классические рецепторы к хемоаттрактантам (CXC-рецепторы), являются ассоциированными с G-белками рецепторами преимущественно Gi-типа [9]. Интересно, что сигнализация, вызываемая этими хемокинами – G γ -сигнализация, приводящая к слабой активации фосфолипазы C и PI3K γ , т. е. к кальциевой и фосфоинозитидной сигнализации, достаточна для перестройки цитоскелета и активации интегринов, необходимых для миграции и экстравазации нейтрофилов.

Однако внутриклеточная сигнализация изменяется при встрече с возбудителем – нейтрофилы распознают так называемые молекулярные паттерны, ассоциированные с патогенами (PAMP), обнаруженные в широком ряде микробов [33] через рецепторы распознавания образов на клеточной поверхности (PRR), такие как Toll-подобные рецепторы (TLR). Альтернативно нейтрофилы распознают опсонизированные иммуноглобулинами или компонентами комплемента чужеродные объекты или свои поврежденные клетки [21], используя рецепторы к иммуноглобулинам (FcR). Как PRR, так и FcR стимулируют фагоцитоз и активацию нейтрофила, приводящую к реакции, называемой «респираторный взрыв» [31]. При этом с фагосомой сливаются гранулы нейтрофилов, запуская к возбудителям антибактериальные пептиды и гидролазы, а на поверхности фагосомы активируется NOX, генерирующая супероксид-анион, далее преобразуемый в перекись водорода и гидроксильный радикал. Содержащаяся в гранулах MPO на их основе уже делает HOCl, разрушающую возбудителей. Интересно, что хемоаттрактанты нейтрофилов, действовавшие на первой стадии, обладают эффектом «праймирования»: в их отсутствии активация NOX происходит на порядок слабее [31].

Внутриклеточная сигнализация, приводящая к активации PAD4

Механизмы активации PAD4 до сих пор подлежат дискуссии [34], однако известно, что она опосредована набором сигнальных путей: ядерный фактор κ B (NF- κ B) и фактор, индуцируемый гипоксией (HIF-1 α) [35–38]. Отдельным вопросом является действие ионов кальция [39, 40]. С одной стороны, PAD4 содержит 5 сайтов связывания кальция, из которых 2 регулируют ее каталитическую активность, однако *in vitro* измеренная аффинность этих сайтов к кальцию составляет 5–10 мМ [41, 42], что на много порядков превышает встречающуюся в клетке. Кальций-зависимый NET-оз, симулируемый кальциевыми ионофорами, является PAD4-зависимым, однако в настоящем обзоре мы его рассматриваем как вариант суицидального NET-оза [43]. При встречающейся в

организме активации, как было описано выше, кальциевая сигнализация может запускаться при активации фосфолипазы C в результате G-белковой (цитокины) либо тирозинкиназной (иммуноглобулины) сигнализации [44]. В обоих случаях концентрация кальция не превышает 1 мкМ, что недостаточно для активации PAD4. Таким образом, сейчас рассматриваются дополнительные пути активации PAD4 [34]. Интересно, что PAD4 требует основной среды для реализации своей активности, а присутствие ROS ее ингибирует [45], в то время как восстановленный глутатион, наоборот, активирует [46].

Внутриклеточная регуляция перехода нейтрофила в NET-оз

Разберем последовательно внутриклеточные сигнальные события, ведущие к NET-озу при тромбозе. В данном случае мы не рассматриваем процессы, вызванные химическими агентами – кальциевыми ионофорами или PMA. В этом случае первична активация нейтрофила, вызываемая хемоаттрактантами через их рецепторы [31] (*рисунок 2*). Происходящие процессы можно разделить на 3 основных пути: активация через ассоциированные с G-белками рецепторы, активация через рецепторы, ассоциированные с тирозинкиназами, а также NF-κB и MAPK-сигнализацию.

Первый путь – это активация через рецепторы, ассоциированные с G-белками, основными из которых являются CXC-рецепторы (*рисунок 2*). В свете тромбоза актуальны рецепторы CXCR1 и CXCR2 нейтрофилов, активируемые хемокинами тромбоцитарного происхождения – IL-8 и NAP-2 [47], а также хемокинами из других клеток иммунной системы и активированными или погибшими эндотелиоцитами [48]. Эти рецепторы ассоциированы с белками Gi и G₁₂ и запускают кальциевую и фосфоинозитидную сигнализацию, в первую очередь по Gβγ-пути. Кроме Rho-зависимой перестройки цитоскелета и поляризации клетки данной сигнализацией управляется активация малых растворимых GTP-аз Ras-семейства [49]. Хотя этой сигнализации недостаточно для полноценной активации PKC или генерации ROS митохондриями, она приводит к так называемому праймингу нейтрофилов, к дальнейшей активации [31]. Сочетание кальциевой и фосфоинозитидной сигнализации также приводит к секреции гранул [50]. Кроме того, дегрануляцию и активацию нейтрофилов при тромбозе может регулировать тромбин через ассоциированные с Gq рецепторы PAR-1, вызывающие кальциевую сигнализацию [51]. Существует мнение, что в G-белковой сигнализации также запускается MAPK-киназный каскад [52], конкретно киназы p38 и ERK, регулирующие экспрессию множества генов и запускающие, в частности, путь NF-κB [53]. Однако

окислительный стресс сам по себе является достаточно сильным активатором p38 [54], поэтому при активации нейтрофила MAPK-каскад запускается несколькими путями.

Роль кальциевой сигнализации в NET-озе исследовалась хелаторами кальция. В работе A. Teijeira и соавт. [55] продемонстрировано, что для индукции NET-оза необходимо на порядок больше IL-8, чем для индукции хемотаксиса нейтрофилов, при этом наблюдаемый суицидальный NET-оз успешно блокировался хелаторами кальция, что полностью согласуется с гипотезой PKC-зависимой активации.

Отдельным недавно выявленным феноменом является действие протеинкиназы A (PKA). Как отмечалось выше, активация NOX требует прайминга, который состоит в связывании цитозольных субъединиц NOX с мембранными субъединицами. Недавно было показано, что PKA-зависимое фосфорилирование мембранных субъединиц предотвращает активацию NOX PKC [56]. Многие рецепторы к цитокинам, в частности CXCR1 и CXCR2, активируют Gi-сигнализацию, в ходе которой ингибируется производство cAMP, а следовательно, снимается PKA-барьер на активации NOX. С точки зрения фармакологического воздействия на NET-оз это означает, что можно использовать увеличивающее концентрацию cAMP воздействие, например, ингибиторы фосфодиэстераз. Также адреналин оказывает ингибиторное воздействие на NET-оз, возможно, благодаря повышению содержания cAMP в результате активации β-адренорецепторов [57].

Второй набор путей внутриклеточной сигнализации, вызывающий активацию нейтрофилов, – это тирозинкиназная сигнализация (*рисунок 2*). В нейтрофилах, как и в тромбоцитах, основной тирозинкиназой считается Syk [44], хотя для тирозинкиназ характерен каскад взаимной активации и ингибирования. Классическими запускающими тирозинкиназную сигнализацию рецепторами нейтрофилов считаются интегрины, подающие сигнал снаружи-внутри (outside-in) при связывании мультивалентных лигандов [58]. Через интегрины нейтрофилы взаимодействуют как с тромбоцитами, так и с клетками эндотелия. Кроме того, Syk-опосредованную сигнализацию вызывает содержащий ITAM-последовательность PSGL-рецептор нейтрофилов [59], отвечающий за взаимодействие как с тромбоцитами, так и с эндотелием. Тирозинкиназная сигнализация приводит к сборке LAT-сигнаlosомы [59, 60], в рамках которой происходит активация как PI3K (фосфоинозитидная сигнализация), так и PLC (кальциевая сигнализация), т. е. внутриклеточная сигнализация аналогична цитокиновой. Отличие состоит в том, что через сигнаlosому активируется более стабильная изоформа β PI3K, в то время как в Gβγ-пути происходит акти-

вая изоформы γ , в результате в тирозинкиназном пути происходит активация сериновой протеинкиназы Akt, фосфорилирующей множество мишеней в клетке [61], в том числе путь NF- κ B. К рецепторам, ассоциированным с тирозинкиназами, также относятся ITAM-содержащие Fc-рецепторы, активируемые при фагоцитозе опсонизированных антителами мишеней [52]. Syk-зависимая активация PKC опосредуется именно активацией кальциевой сигнализации в результате фосфорилирования PLC γ в LAT-сигнальномosome.

Третьей группой рецепторов, вызывающих активацию нейтрофилов, являются рецепторы, активирующие путь NF- κ B, в первую очередь TLR, особенно TLR-4, реагирующий на липополисахариды клеточной стенки грамотрицательных бактерий [62]. В предположении тромбоза, не связанного с бактериальным заражением, у TLR4 также есть активатор – белок HMGB1, секретируемый активированными тромбоцитами [63]. Аналогичная сигнализация также вызывается рецептором к фактору некроза опухоли- α [64]. Так как сигнализация NF- κ B в первую очередь регулирует секрецию гранул [65] и изменение экспрессии генов, то можно предположить, что возникновение NET-оза в ответ на запуск данной сигнализации является вторичным процессом: синтезируемые в ответ цитокины аутокринно активируют кальциевую сигнализацию в нейтрофиле [66, 67].

Роль перестройки цитоскелета в NET-озе

Существует ряд работ, указывающих на важную роль перестроек актинового цитоскелета в NET-озе. Актин, один из основных компонентов актинового цитоскелета, имеет 2 формы: мономерную (G-актин) и филаментозную (F-актин) [68]. Многие клеточные функции, включая подвижность, деление и дегрануляцию клеток, контролируются актиновым цитоскелетом [68]. В исследовании H.R. Thiam и соавт. [17] было продемонстрировано, что процесс NET-оза начинается с диссоциации актинового цитоскелета. В работах K.D. Metzler и соавт. показано, что при стимуляции нейтрофилов опсонизированным *C. albicans* происходит диссоциация азуромы (комплекс нейтрофильных белков и цитоскелета [69]), что способствует выходу нейтрофильной Ela из гранул в цитозоль [70]. Нейтрофильная Ela способна расщеплять F-актин и останавливать его полимеризацию, что ведет к иммобилизации нейтрофила [70]. В других работах быстрая разборка F-актина также наблюдалась, когда NET-оз был индуцирован PMA и иономицином [17, 71].

В ряде других исследований было показано, что при различных видах стимуляции, таких как PMA, *C. albicans*, кристаллы моноурата натрия и липополисахариды, ингибирование динамики F-актина,

наоборот, препятствует формированию NETs [72]. Также было установлено, что ингибирование немышечного миозина II также блокирует NET-оз [73]. У пациентов с дефектами в актиновом цитоскелете NET-оз либо нарушен, либо полностью отсутствует, даже если продукция ROS и Ela находится в норме или превышает ее [73].

Таким образом, можно предположить, что либо роль актина может быть различной при различных активаторах и условиях эксперимента, либо актин играет динамическую роль в NET-озе. На динамическую роль актинового цитоскелета в NET-озе указывает исследование H.R. Thiam и соавт. [17]. В данной работе было продемонстрировано, что обработка PMA постепенно увеличивает полимеризацию актина в нейтрофилах. Она достигает пика через 60 мин, после чего постепенно снижается до исходного уровня к 180 мин.

На ранней стадии NET-оза полимеризация актина может потребоваться для транслокации в ядро киназ, фосфорилирующих ламины, что необходимо для разрыва ядерной оболочки [74]. Диссоциация кортикального актина требуется для разрыва плазматической мембраны, что необходимо на поздней стадии NET-оза для высвобождения NETs [17].

Дополнительные особенности перехода в NET-оз

Для переключения в суицидальный NET-оз «точкой принятия решения» можно считать уровень генерации ROS NOX и/или митохондриями. В нейтрофилах, как и в других клетках, существует мощная система антиоксидантной защиты, лимитирующая действие NOX фагосомами [75, 76]. Можно предположить, что, если эта система перегружена, то ROS начинают проникать в цитоплазму, разрушать гранулы и окислять гистоны, что и приводит к суицидальному NET-озу. Эта гипотеза подтверждается эффективным предотвращением NET-оза с помощью антиоксидантов [77, 78].

Есть точка зрения, что размер фагоцитируемого объекта влияет на переключение в NET-оз – если объект слишком большой, содержащие Ela гранулы сливаются с ядром, что приводит к деконденсации хроматина и NET-озу [79]. Однако исследованы случаи, когда мелкие микроорганизмы способны вызвать NET-оз. Происходит это в том случае, когда микроорганизму удается избежать фагоцитирующего действия нейтрофила [80]. Есть предположение, что вирулентные бактерии вызывают NET-оз, а умеренные – нет [81].

Стоит также отметить, что NET-оз не является проявлением апоптоза [82]. Аргументы включают как различия в морфологии – при апоптозе наблюдаются конденсация хроматина и сохранение

сегментной структуры ядра, без разрыва ядерной оболочки, органеллы не разрушены, в то время как при NET-озе разрушаются органеллы [82], так и реакцию на ингибирование апоптоза [77]. При этом при воздействии ультрафиолетового облучения нейтрофилы уходят в процесс, названный "АроNETosis" – гибрид апоптоза и NET-оза, при котором происходят митохондриально-зависимое производство ROS и выход цитохрома С с одновременной активацией PAD4, возможно, зависящей от p38-МАРК-киназы [83].

Возможно, недостающим звеном в каскаде перехода нейтрофила в NET-оз является недавно открытый процесс, названный "transcriptional firing" («транскрипционная стрельба») [84] – процесс быстрой многоточечной транскрипции, запускаемый МАРК-киназами p38 и ERK в процессе NET-оза. Было показано, что ингибирование транскрипции пода-

вляет как витальный, так и суицидальный NET-оз, а также АроNET-оз, вызываемый ультрафиолетом [83, 84].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Можно предположить, что управление NET-озом проходит в несколько стадий: первичная активация/прайминг нейтрофила хемокинами или иными агентами через G-белок-ассоциированные рецепторы (способствующая в том числе движению к очагу процесса), за которой следует полноценная индукция NET-оза через прямые межклеточные контакты с активированными тромбоцитами и активированным эндотелием, стимулирующие тирозин-киназные рецепторы. Можно предположить, что активация NET-оза при тромбозе может как минимум частично регулироваться путями, которые отличаются от

Рисунок 2

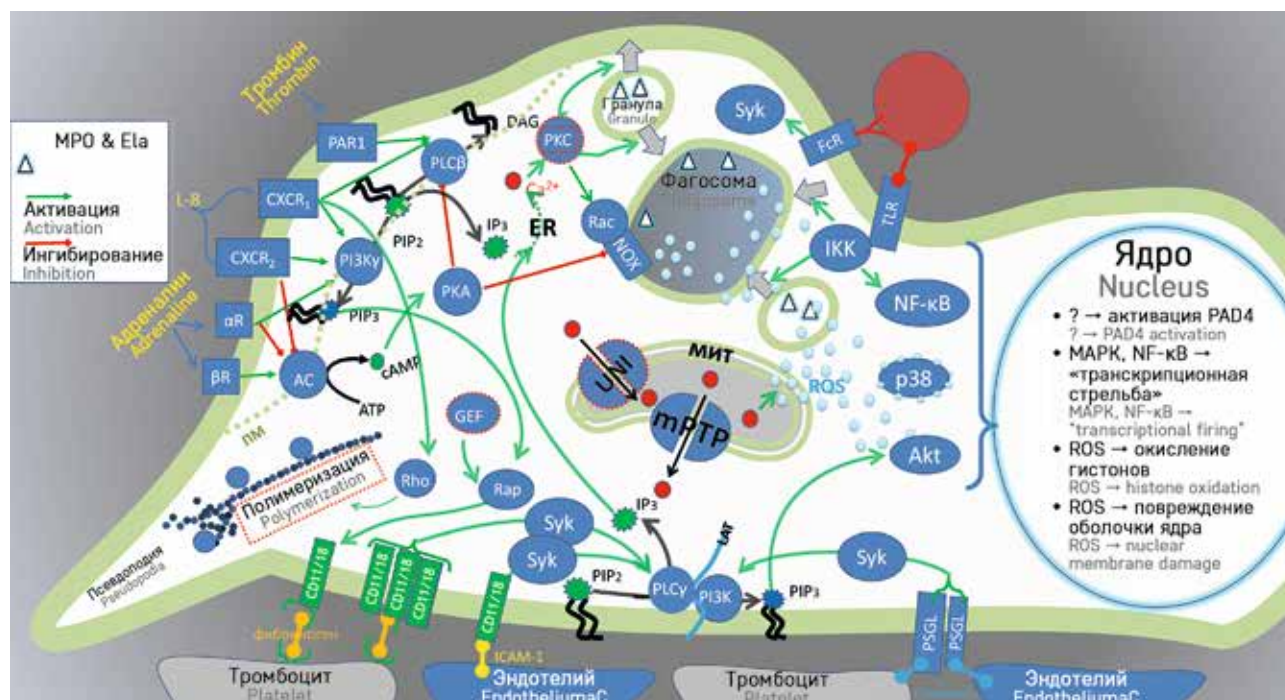
Схема путей внутриклеточной сигнализации, приводящих к активации NOX в нейтрофилах

Активация нейтрофила через рецепторы, ассоциированные с G-белками (на схеме CXCR1/2, PAR1 и рецепторы к адреналину), или через рецепторы, вызывающие тирозинкиназную сигнализацию (на схеме CD11/18, PSGL, Fc-рецептор), приводит к активации фосфолипазы С (PLC) и в большинстве случаев фосфоинозитид-3-киназы (PI3K). Эти ферменты запускают наработку 2 наиболее важных вторичных мессенджеров для активации нейтрофилов – кальция (красные кружки) и фосфоинозитид-3,4,5-трифосфата (PIP3). Хемотаксис, дегрануляция и активация NOX управляются либо одним, либо сразу обоими мессенджерами. Некоторые из известных кальций-чувствительных белков и процессов отображены красными точками; активация показана зелеными линиями; ингибирование – красными линиями. AC – аденилатциклаза; α R – α 2A-адренорецептор; β R – β 2-адренорецептор; GEF – кальций-диацилглицерол гуанодинотрифосфат обменник I (CalDAGGEFI); DAG – диацилглицерол; ER – эндоплазматический ретикулум; IP3 – инозитол-1,4,5-трифосфат; мит – митохондрии; mPTP – митохондриальная пора; PAR – активируемый протеазой рецептор; PIP2 – фосфоинозитид-4,5-бисфосфат; UNI – митохондриальный унипортер

Figure 2

A schematic overview of intracellular signaling pathways leading to NADPH oxidase activation in neutrophils

Neutrophil activation through G protein coupled receptors (on the scheme: CXCR1/2, PAR1, and adrenaline receptors) or through receptors inducing tyrosine kinase signaling (on the scheme: CD11/18, PSGL, Fc receptor) leads to an activation of phospholipase C (PLC) and, in the majority of cases, phosphoinositide 3-kinase (PI3K). These enzymes initiate the production of two most important secondary messengers involved in neutrophil activation: calcium (red circles) and phosphoinositide-3,4,5-trisphosphate (PIP3). Chemotaxis, degranulation, and activation of NOX are regulated by one or by both messengers. Some of the well-known calcium-sensitive proteins and processes are shown by red dots; activation is shown by green lines and inhibition by red lines. AC – adenylate cyclase; α R – α 2A-adrenoceptor; β R – β 2-adrenoceptor; GEF – calcium diacylglycerol guanine nucleotide exchange factor I (CalDAGGEFI); DAG – diacylglycerol; ER – endoplasmic reticulum; IP3 – inositol 1,4,5-trisphosphate; mit – mitochondria; mPTP – mitochondrial permeability transition pore; PAR – protease-activated receptor; PIP2 – phosphoinositid 4,5-bisphosphate; PKA – protein kinase A; PKC – protein kinase C; UNI – mitochondrial uniporter



NET-оза в ответ на патогены. Конечный результат может быть как витальным, так и суицидальным. Лабораторное тестирование готовности нейтрофилов к NET-озу уже сейчас может дать клинически значимые результаты. В перспективе выявление путей управления этим процессом способно привести к появлению антитромботических препаратов нового поколения, избирательно и гемостатически безопасно блокирующих те или иные типы тромбообразования.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, проект №23-45-10039.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

ORCID

Sveshnikova A.N. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4720-7319>

Adamanskaya E.A. ORCID: <https://orcid.org/0009-0000-4828-4063>

Korobkina Yu.-D.D. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2762-5460>

Panteleev M.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8128-7757>

Литература / References

- Palacios-Acedo A.L., Mège D., Crescence L., Dignat-George F., Dubois C., Panicot-Dubois L. Platelets, Thrombo-Inflammation, and Cancer: Collaborating With the Enemy. *Front Immunol* 2019, 10: 1805. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01805
- Thälén C., Hisada Y., Lundström S., Mackman N., Wallén H. Neutrophil Extracellular Traps: Villains and Targets in Arterial, Venous, and Cancer-Associated Thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2019, 39 (9): 1724–38. DOI: 10.1161/ATVBAHA.119.312463
- Адаманская Е.А., Коробкина Ю.Д., Юшкова Е.В., Свешникова А.Н. Повышенное образование ДНК-ловушек нейтрофилов и особенности их хемотаксиса в образцах крови пациентов с раком молочной железы. Тезисы докладов Международной научной конференции, посвященной 50-летию института (Республика Беларусь, Минск, 26–27 октября 2023 г.). Минск, 2023. [Adamanskaya E.A., Korobkina Yu.-D.D., Yushkova E.V., Sveshnikova A.N. Increased formation of neutrophil DNA traps and the characteristics of neutrophil chemotaxis in blood samples from patients with breast cancer. Abstracts for International Scientific Conference to Mark the 50th Anniversary of the Institute (Republic of Belarus, Minsk, 26–27 October 2023). Minsk, 2023. (In Russ.).]
- Caudrillier A., Kessenbrock K., Gilliss B.M., Nguyen J.X., Marques M.B., Monestier M., et al. Platelets Induce Neutrophil Extracellular Traps in Transfusion-Related Acute Lung Injury. *J Clin Invest* 2012, 122: 2661–71. DOI: 10.1172/JCI61303
- Golas A., Parhi P., Dimachkie Z.O., Siedlecki C.A., Vogler E.A. Surface-Energy Dependent Contact Activation of Blood Factor XII. *Biomaterials* 2010, 31: 1068–79. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2009.10.039
- Fuchs T.A., Brill A., Wagner D.D. Neutrophil Extracellular Trap (NET) Impact on Deep Vein Thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012, 32: 1777–83. DOI: 10.1161/ATVBAHA.111.242859
- Borregaard N. Neutrophils, from Marrow to Microbes. *Immunity* 2010, 33: 657–70. DOI: 10.1016/j.immuni.2010.11.011
- Nathan C. Neutrophils and Immunity: Challenges and Opportunities. *Nat Rev Immunol* 2006, 6: 173–82. DOI: 10.1038/nri1785
- Petri B., Sanz M.-J. Neutrophil Chemotaxis. *Cell Tissue Res* 2018, 371: 425–36. DOI: 10.1007/s00441-017-2776-8
- Cassatella M.A. The Neutrophil: An Emerging Regulator of Inflammatory and Immune Response. Karger Medical and Scientific Publishers, 2003.
- Sveshnikova A., Stepanyan M., Panteleev M. Platelet Functional Responses and Signaling: The Molecular Relationship. Part 1: Responses. *Syst Biol Physiol Rep* 2021, 1: 20. DOI: 10.52455/sbpr.01.202101014
- Andrews R.K., Arthur J.F., Gardiner E.E. Neutrophil Extracellular Traps (NETs) and the Role of Platelets in Infection. *Thromb Haemostasis* 2014, 112: 659–65. DOI: 10.1160/TH14-05-0455
- Knorr D.A., Bachanova V., Vernieris M.R., Miller J.S. Clinical Utility of Natural Killer Cells in Cancer Therapy and Transplantation. *Semin Immunol* 2014, 26: 161–72. DOI: 10.1016/j.smim.2014.02.002
- Damascena H.L., Silveira W.A.A., Castro M.S., Fontes W. Neutrophil Activated by the Famous and Potent PMA (Phorbol Myristate Acetate). *Cells* 2022, 11: 2889. DOI: 10.3390/cells11182889
- Tatsiy O., McDonald P.P. Physiological Stimuli Induce PAD4-Dependent, ROS-Independent NETosis, With Early and Late Events Controlled by Discrete Signaling Pathways. *Front Immunol* 2018, 9: 2036. DOI: 10.3389/fimmu.2018.02036
- von Köckritz-Blickwede M., Winstel V. Molecular Prerequisites for Neutrophil Extracellular Trap Formation and Evasion Mechanisms of *Staphylococcus Aureus*. *Front Immunol* 2022, 13.
- Thiam H.R., Wong S.L., Qiu R., Kittisopikul M., Vahabikashi A., Goldman A.E., et al. NETosis Proceeds by Cytoskeleton and Endomembrane Disassembly and PAD4-Mediated Chromatin Decondensation and Nuclear Envelope Rupture. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2020; 117: 7326–37. DOI: 10.1073/pnas.1909546117
- Borregaard N., Sørensen O.E., Theilgaard-Mönch K. Neutrophil Granules: A Library of Innate Immunity Proteins. *Trends Immunol* 2007; 28: 340–45. DOI: 10.1016/j.it.2007.06.002
- Boettcher M., Esser M., Trah J., Klohs S., Mokhaberi N., Wenskus J., et al. Markers of Neutrophil Activation and Extracellular Traps Formation Are Predictive of Appendicitis in Mice and Humans: A Pilot Study. *Sci Rep* 2020; 10: 18240. DOI: 10.1038/s41598-020-74370-9
- Rosales C. Neutrophil: A Cell with Many Roles in Inflammation or Several Cell Types? *Front Physiol* 2018; 9.
- Witko-Sarsat V., Rieu P., Descamps-Latscha B., Lesavre P., Halbwachs-Mecarelli L. Neutrophils: Molecules, Functions and Pathophysiological Aspects. *Lab Invest* 2000; 80: 617–53. DOI: 10.1038/labinvest.3780067
- Polverino E., Rosales-Mayor E., Dale G.E., Dembowski K., Torres A. The Role of Neutrophil Elastase Inhibitors in Lung Diseases. *Chest* 2017; 152: 249–62. DOI: 10.1016/j.chest.2017.03.056
- Voynow J.A., Shinbashi M. Neutrophil Elastase and Chronic Lung Disease. *Biomolecules* 2021; 11: 1065. DOI: 10.3390/biom11081065

24. Fu Z., Akula S., Thorpe M., Hellman L. Potent and Broad but Not Unselective Cleavage of Cytokines and Chemokines by Human Neutrophil Elastase and Proteinase 3. *Int J Mol Sci* 2020; 21: 651. DOI: 10.3390/ijms21020651
25. Hubbard R.C., Crystal R.G. Alpha-1-Antitrypsin Augmentation Therapy for Alpha-1-Antitrypsin Deficiency. *Am J Med* 1988; 84: 52–62. DOI: 10.1016/S0002-9343(88)80071-8
26. Groutas W.C., Dou D., Alliston K.R. Neutrophil Elastase Inhibitors. *Exp Opin Ther Pat* 2011; 21: 339–54. DOI: 10.1517/13543776.2011.551115
27. Sun R., Xu Z., Zhu C., Chen T., Muñoz L.E., Dai L., Zhao Y. Alpha-1 Antitrypsin in Autoimmune Diseases: Roles and Therapeutic Prospects. *Int Immunopharmacol* 2022; 110: 109001. DOI: 10.1016/j.intimp.2022.109001
28. Козлов С.О., Кудрявцев И.В., Грудина Н.А., Костевич В.А., Панасенко О.М., Соколов А.В., Васильев В.Б. Активированные нейтрофилы, продуцирующие НОСЛ, выявляющиеся при проточной цитометрии и конфокальной микроскопии с помощью целестинового синего В. *Acta Biomedica Scientifica* 2016; 1 (3(2)): 86–91. DOI: 10.12737/article_590823a4895537.04307905 [Kozlov S.O., Kudryavtsev I.V., Grudinina N.A., Kostevich V.A., Panasencko O.M., Sokolov A.V., Vasilyev V.B. Activated producing HOCL neutrophils revealed by flow cytometry and confocal microscopy with celestine blue B. *Acta Biomedica Scientifica* 2016; 1 (3(2)): 86–91. (In Russ.)].
29. Metzler K.D., Goosmann C., Lubojemska A., Zychlinsky A., Papayannopoulos V. A Myeloperoxidase-Containing Complex Regulates Neutrophil Elastase Release and Actin Dynamics during NETosis. *Cell Rep* 2014; 8: 883–96. DOI: 10.1016/j.celrep.2014.06.044
30. Martinod K., Witsch T., Farley K., Gallant M., Remold-O'Donnell E., Wagner D.D. Neutrophil Elastase-Deficient Mice Form Neutrophil Extracellular Traps in an Experimental Model of Deep Vein Thrombosis. *J Thromb Haemost* 2016; 14 (3): 551–8. DOI: 10.1111/jth.13239
31. El-Benna J., Hurtado-Nedelec M., Marzaioli V., Marie J.-C., Gougerot-Pocidalo M.-A., Dang P.M.-C. Priming of the Neutrophil Respiratory Burst: Role in Host Defense and Inflammation. *Immunol Rev* 2016; 273: 180–93. DOI: 10.1111/imr.12447
32. Soehnlein O., Lindbom L., Weber C. Mechanisms Underlying Neutrophil-Mediated Monocyte Recruitment. *Blood* 2009; 114: 4613–23. DOI: 10.1182/blood-2009-06-221630
33. Prince L.R., Whyte M.K., Sabroe I., Parker L.C. The Role of TLRs in Neutrophil Activation. *Curr Opin Pharmacol* 2011; 11: 397–403. DOI: 10.1016/j.coph.2011.06.007
34. Liu X., Arfman T., Wichapong K., Reutelingsperger C.P.M., Voorberg J., Nicolaes G.A.F. PAD4 Takes Charge during Neutrophil Activation: Impact of PAD4 Mediated NET Formation on Immune-mediated Disease. *J Thromb Haemost* 2021; 19: 1607–17. DOI: 10.1111/jth.15313
35. An Z., Li J., Yu J., Wang X., Gao H., Zhang W., et al. Neutrophil Extracellular Traps Induced by IL-8 Aggravate Atherosclerosis via Activation NF- κ B Signaling in Macrophages. *Cell Cycle* 2019; 18: 2928–38. DOI: 10.1080/15384101.2019.1662678
36. Garratt L.W. Current Understanding of the Neutrophil Transcriptome in Health and Disease. *Cells* 2021; 10: 2406. DOI: 10.3390/cells10092406
37. Thompson A.A.R., Elks P.M., Marriott H.M., Eamsamrongs S., Higgins K.R., Lewis A., et al. Hypoxia-Inducible Factor 2 α Regulates Key Neutrophil Functions in Humans, Mice, and Zebrafish. *Blood* 2014; 123: 366–76. DOI: 10.1182/blood-2013-05-500207
38. Yang M., Chen Q., Mei L., Wen G., An W., Zhou X., et al. Neutrophil Elastase Promotes Neointimal Hyperplasia by Targeting Toll-like Receptor 4 (TLR4) – NF- κ B Signaling. *Br J Pharmacol* 2021; 178: 4048–68. DOI: 10.1111/bph.15583
39. Douda D.N., Khan M.A., Grasmann H., Palaniyar N. SK3 Channel and Mitochondrial ROS Mediate NADPH Oxidase-Independent NETosis Induced by Calcium Influx. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015; 112: 2817–22. DOI: 10.1073/pnas.1414055112
40. Huang J., Hong W., Wan M., Zheng L. Molecular Mechanisms and Therapeutic Target of NETosis in Diseases. *MedComm* (2020) 2022; 3: e162. DOI: 10.1002/mco2.162
41. Liu Y.-L., Lee C.-Y., Huang Y.-N., Chen H.-Y., Liu G.-Y., Hung H.-C. Probing the Roles of Calcium-Binding Sites during the Folding of Human Peptidylarginine Deiminase 4. *Sci Rep* 2017; 7: 2429. DOI: 10.1038/s41598-017-02677-1
42. Arita K., Hashimoto H., Shimizu T., Nakashima K., Yamada M., Sato M. Structural Basis for Ca²⁺-Induced Activation of Human PAD4. *Nat Struct Mol Biol* 2004; 11: 777–83. DOI: 10.1038/nsmb799
43. Vorobjeva N., Galkin I., Pletjushkina O., Golyshev S., Zinovkin R., Prikhodko A. et al. Mitochondrial Permeability Transition Pore Is Involved in Oxidative Burst and NETosis of Human Neutrophils. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 2020; 1866: 165664. DOI: 10.1016/j.bbdis.2020.165664
44. Chen T., Li Y., Sun R., Hu H., Liu Y., Herrmann M., et al. Receptor-Mediated NETosis on Neutrophils. *Front Immunol* 2021; 12: 775267.
45. Damgaard D., Bjørn M.E., Jensen P.Ø., Nielsen C.H. Reactive Oxygen Species Inhibit Catalytic Activity of Peptidylarginine Deiminase. *J Enzyme Inhib Med Chem* 2017; 32: 1203–8. DOI: 10.1080/14756366.2017.1368505
46. Damgaard D., Bjørn M.E., Steffensen M.A., Puijn G.J.M., Nielsen C.H. Reduced Glutathione as a Physiological Co-Activator in the Activation of Peptidylarginine Deiminase. *Arthritis Res Ther* 2016; 18: 102. DOI: 10.1186/s13075-016-1000-7
47. Schoenwaelder S.M., Ruggeri Z.M., Westein E., Kaplan Z.S., Jackson S.P., Ashworth K.J., et al. The CXCR1/2 Ligand NAP-2 Promotes Directed Intravascular Leukocyte Migration through Platelet Thrombi. *Blood* 2013; 121: 4555–66. DOI: 10.1182/blood-2012-09-459636
48. Rajagopalan L., Rajarathnam K. Ligand Selectivity and Affinity of Chemokine Receptor CXCR1: ROLE OF N-TERMINAL DOMAIN*. *J Biol Chem* 2004; 279: 30000–8. DOI: 10.1074/jbc.M313883200
49. Woulfe D., Jiang H., Mortensen R., Yang J., Brass L.F. Activation of Rap1B by Gi Family Members in Platelets. *J Biol Chem* 2002; 277: 23382–90. DOI: 10.1074/jbc.M202212200
50. Eckly A., Rinkel J.Y., Proamer F., Ulas N., Joshi S., Whiteheart S.W., Gachet C. Respective Contributions of Single and Compound Granule Fusion to Secretion by Activated Platelets. *Blood* 2016; 128: 2538–49. DOI: 10.1182/blood-2016-03-705681
51. Kannan S. Role of Protease-Activated Receptors in Neutrophil Degranulation. *Med Hypotheses* 2002; 59: 266–7. DOI: 10.1016/S0306-9877(02)00214-1
52. Futosi K., Fodor S., Mócsai A. Neutrophil Cell Surface Receptors and Their Intracellular Signal Transduction Pathways. *Int Immunopharmacol* 2013; 17: 638–50. DOI: 10.1016/j.intimp.2013.06.034
53. Zarubin T., Han J. Activation and Signaling of the P38 MAP Kinase Pathway. *Cell Res* 2005; 15: 11–8. DOI: 10.1038/sj.cr.7290257
54. Anerillas C., Abdelmohsen K., Gorospe M. Regulation of Senescence Traits by MAPKs. *GeroScience* 2020; 42: 397–408. DOI: 10.1007/s11357-020-00183-3
55. Teixeira A., Garasa S., Ochoa M.D.C., Cirella A., Olivera I., Glez-Vaz J., et al. Differential Interleukin-8 Thresh-

- olds for Chemotaxis and Netosis in Human Neutrophils. *Eur J Immunol* 2021; 51: 2274–80. DOI: 10.1002/eji.202049029
56. Raad H., Mouawia H., Hassan H., El-Seblani M., Arabi-Derkawi R., Boussetta T., et al. The Protein Kinase A Negatively Regulates Reactive Oxygen Species Production by Phosphorylating Gp91phox/NOX2 in Human Neutrophils. *Free Radic Biol Med* 2020; 160: 19–27. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2020.07.021
 57. Chhatar S., Lal G. Role of Adrenergic Receptor Signalling in Neuroimmune Communication. *Curr Res Immunol* 2021; 2: 202–17. DOI: 10.1016/j.crimmu.2021.11.001
 58. Mócsai A., Walzog B., Lowell C.A. Intracellular Signalling during Neutrophil Recruitment. *Cardiovasc Res* 2015; 107: 373–85. DOI: 10.1093/cvr/cvv159
 59. Cappenberg A., Kardell M., Zarbock A. Selectin-Mediated Signaling—Shedding Light on the Regulation of Integrin Activity in Neutrophils. *Cells* 2022; 11: 1310. DOI: 10.3390/cells11081310
 60. Канева В.Н., Мартыанов А.А., Морозова Д.С., Пантелеев М.А., Свешникова А.Н. Механизмы активации и кластеризации тромбоцитарных интегринов $\alpha\text{IIb}\beta 3$ и их роль в гетерогенности структуры тромба. *Биологические мембраны* 2019; 36 (1): 15–31. DOI: 10.1134/S0233475519010031 [Kaneva V.N., Martyanov A.A., Morozova D.S., Panteleev M.A., Sveshnikova A.N. The mechanisms of activation and clustering of platelet integrins $\alpha\text{IIb}\beta 3$ and their role in thrombus structural heterogeneity. *Biological membranes* 2019; 36 (1): 15–31. (In Russ.)].
 61. Moroi A.J., Watson S.P. Impact of the PI3-Kinase/Akt Pathway on ITAM and hemITAM Receptors: Haemostasis, Platelet Activation and Antithrombotic Therapy. *Biochem Pharmacol* 2015; 94: 186–94. DOI: 10.1016/j.bcp.2015.02.004
 62. Lu Y.-C., Yeh W.-C., Ohashi P.S. LPS/TLR4 Signal Transduction Pathway. *Cytokine* 2008; 42: 145–51. DOI: 10.1016/j.cyt.2008.01.006
 63. Vogel S., Bodenstein R., Chen Q., Feil S., Feil R., Rheinlaender J., et al. Platelet-Derived HMGB1 Is a Critical Mediator of Thrombosis. *J Clin Invest* 2015; 125 (12): 4638–54. DOI: 10.1172/JCI81660DS1
 64. Lin H.-R., Wu Y.-H., Yen W.-C., Yang C.-M., Chiu D.T.-Y. Diminished COX-2/PGE2-Mediated Antiviral Response Due to Impaired NOX/MAPK Signaling in G6PD-Knockdown Lung Epithelial Cells. *PLoS One* 2016; 11: e0153462. DOI: 10.1371/journal.pone.0153462
 65. Мартыанов А.А., Балабин Ф.А., Майоров А.С., Шамова Е.В., Пантелеев М.А., Свешникова А.Н. Компьютерное моделирование внутриклеточной сигнализации при активации тромбоцитов крови фукоиданом. *Биологические мембраны* 2018; 35: 364–75. DOI: 10.1134/S0233475518040102. [Martyanov A.A., Balabin F.A., Mayorov A.S., Shamova E.V., Panteleev M.A., Sveshnikova A.N. Computer Modelling of Intracellular Signaling in Platelet Activation by Fucoidan. *Biological membranes* 2018; 35: 364–75. (In Russ.)].
 66. Taylor P.R., Roy S., Leal S.M., Sun Y., Howell S.J., Cobb B.A., et al. Activation of Neutrophils by Autocrine IL-17A–IL-17RC Interactions during Fungal Infection Is Regulated by IL-6, IL-23, ROR γ t and Dectin-2. *Nat Immunol* 2014; 15: 143–51. DOI: 10.1038/ni.2797
 67. Bao Y., Ledderose C., Seier T., Graf A.F., Brix B., Chong E., Junger W.G. Mitochondria Regulate Neutrophil Activation by Generating ATP for Autocrine Purinergic Signaling. *J Biol Chem* 2014; 289: 26794–803. DOI: 10.1074/jbc.M114.572495
 68. Fletcher D.A., Mullins R.D. Cell Mechanics and the Cytoskeleton. *Nature* 2010; 463: 485–92. DOI: 10.1038/nature08908
 69. Kenny E.F., Herzig A., Krüger R., Muth A., Mondal S., Thompson P.R., et al. Diverse Stimuli Engage Divergent Neutrophil Extracellular Trap Pathways. *Elife* 2017; 6: e24437. DOI: 10.7554/eLife.24437
 70. Metzler K.D., Fuchs T.A., Nauseef W.M., Reumaux D., Roesler J., Schulze I., et al. Myeloperoxidase Is Required for Neutrophil Extracellular Trap Formation: Implications for Innate Immunity. *Blood* 2011; 117: 953–9. DOI: 10.1182/blood-2010-06-290171
 71. Neubert E., Meyer D., Rocca F., Günay G., Kwaczala-Tessmann A., Grandke J., et al. Chromatin Swelling Drives Neutrophil Extracellular Trap Release. *Nat Commun* 2018; 9: 3767. DOI: 10.1038/s41467-018-06263-5
 72. Chatfield S.M., Grebe K., Whitehead L.W., Rogers K.L., Nebl T., Murphy J.M., Wicks I.P. Monosodium Urate Crystals Generate Nuclease-Resistant Neutrophil Extracellular Traps via a Distinct Molecular Pathway. *J Immunol* 2018; 200: 1802–16. DOI: 10.4049/jimmunol.1701382
 73. Sprenkeler E.G.G., Tool A.T.J., Henriët S.S.V., van Bruggen R., Kuijpers T.W. Formation of Neutrophil Extracellular Traps Requires Actin Cytoskeleton Rearrangements. *Blood* 2022; 139: 3166–80. DOI: 10.1182/blood.2021013565
 74. Neubert E., Meyer D., Kruss S., Erpenbeck L. The Power from within – Understanding the Driving Forces of Neutrophil Extracellular Trap Formation. *J Cell Sci* 2020; 133: jcs241075. DOI: 10.1242/jcs.241075
 75. Ogino T., Packer L., Maguire J.J. Neutrophil Antioxidant Capacity During the Respiratory Burst: Loss of Glutathione Induced by Chloramines. *Free Radic Biol Med* 1997; 23: 445–52. DOI: 10.1016/S0891-5849(97)00115-9
 76. Reshetnikov V., Hahn J., Maueröder C., Czegley C., Munoz L.E., Herrmann M., et al. Chemical Tools for Targeted Amplification of Reactive Oxygen Species in Neutrophils. *Front Immunol* 2018; 9: 1827. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01827
 77. Chamardani T.M., Amiravassoli S. Inhibition of NETosis for Treatment Purposes: Friend or Foe? *Mol Cell Biochem* 2022; 477: 673–688. DOI: 10.1007/s11010-021-04315-x
 78. Hallberg L.A.E., Barlous K., Hawkins C.L. Antioxidant Strategies to Modulate NETosis and the Release of Neutrophil Extracellular Traps during Chronic Inflammation. *Antioxidants* 2023; 12: 478. DOI: 10.3390/antiox12020478
 79. Papayannopoulos V. Neutrophil Extracellular Traps in Immunity and Disease. *Nat Rev Immunol* 2018; 18: 134–47. DOI: 10.1038/nri.2017.105
 80. Stevens M.P., Galyov E.E. Exploitation of Host Cells by *Burkholderia pseudomallei*. *Int J Med Microbiol* 2004; 293: 549–55. DOI: 10.1078/1438-4221-00292
 81. Vong L., Lorentz R.J., Assa A., Glogauer M., Sherman P.M. Probiotic *Lactobacillus Rhamnosus* Inhibits the Formation of Neutrophil Extracellular Traps. *J Immunol* 2014; 192: 1870–7. DOI: 10.4049/jimmunol.1302286
 82. Fuchs T.A., Abed U., Goosmann C., Hurwitz R., Schulze I., Wahn V., et al. Novel Cell Death Program Leads to Neutrophil Extracellular Traps. *J Cell Biol* 2007; 176: 231–41. DOI: 10.1083/jcb.200606027
 83. Azzouz D., Palaniyar N. ApoNETosis: Discovery of a Novel Form of Neutrophil Death with Concomitant Apoptosis and NETosis. *Cell Death Dis* 2018; 9: 1–3. DOI: 10.1038/s41419-018-0846-9
 84. Khan M.A., Palaniyar N. Transcriptional Firing Helps to Drive NETosis. *Sci Rep* 2017; 7: 41749. DOI: 10.1038/srep41749