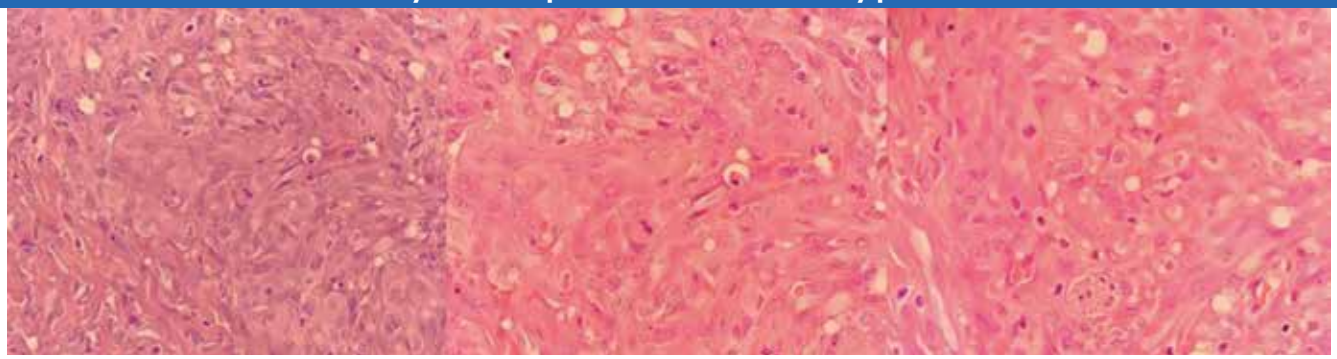
16+

ISSN 1726-1708 Print
ISSN 2414-9314 Online

Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии

№ 2 | 24 | 2025

научно-практический журнал



Гистологическая картина саркомы Капоши. Из статьи М.А. Лемешева и соавт., с. 116

14
Доклиническая разработка протокола производства анти-CD5 CAR-T-лимфоцитов для терапии Т-линейных острых лимфобластных лейкозов и лимфом
Preclinical development of a protocol for the manufacturing of anti-CD5 CAR-T lymphocytes for the treatment of T-lineage acute lymphoblastic leukemia and lymphoma

38
Посттрансплантационный циклофосфамид, абатацепт и ведолизумаб в профилактике реакции «трансплантат против хозяина» после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток у детей с острым лейкозом: результаты проспективного исследования
Post-transplant cyclophosphamide, abatacept, and vedolizumab for the prevention of graft-versus-host disease after hematopoietic stem cell transplantation in children with acute leukemia: results of a prospective study

55
Результаты трансплантаций гемопоэтических стволовых клеток у детей с приобретенной апластической анемией с использованием мелфаланосодержащих режимов кондиционирования
Outcomes of hematopoietic stem cell transplantation using melphalan-based conditioning in children with acquired aplastic anemia

НАУКА — ДЕТЯМ

www.hemoncim.com

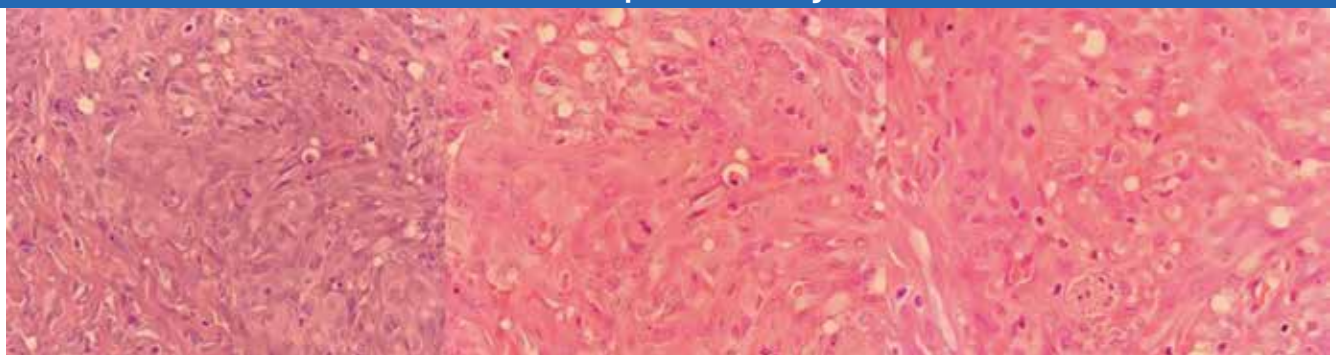
16+

ISSN 1726-1708 Print
ISSN 2414-9314 Online

Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology

№ 2 | 24 | 2025

scientific and practical journal



Histological findings of Kaposi's sarcoma.
From the article by M.A. Lemeshev et al., p. 116

14
Preclinical development of a protocol for the manufacturing of anti-CD5 CAR-T lymphocytes for the treatment of T-lineage acute lymphoblastic leukemia and lymphoma

38
Post-transplant cyclophosphamide, abatacept, and vedolizumab for the prevention of graft-versus-host disease after hematopoietic stem cell transplantation in children with acute leukemia: results of a prospective study

55
Outcomes of hematopoietic stem cell transplantation using melphalan-based conditioning in children with acquired aplastic anemia

НАУКА – ДЕТЯМ

www.hemoncim.com

Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology

ISSN 1726-1708 Print
ISSN 2414-9314 Online

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 © 2025 by «Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology» («D. Rogachev NMRCPHOI»). 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

Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии

ISSN 1726-1708 Print
ISSN 2414-9314 Online

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
© 2025 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 NMRCPHOI,
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
ART LTD.
Address: 17 Bagaeva St., room 116, Ivanovo 153000

Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology. 2025
Vol. 24. No.2. Date of publication 30.06.2025
The circulation is 3000 copies. The price is free.

16+

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 «АРТ».
Адрес: 153000, Иваново, ул. Багаева, 17, оф. 116

Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. 2025.
Том 24. №2. Дата выхода 30.06.2025
Тираж 3000 экз. Цена свободная.

16+

ВОПРОСЫ ГЕМАТОЛОГИИ/ОНКОЛОГИИ И ИММУНОПАТОЛОГИИ В ПЕДИАТРИИ

Научно-практический журнал

№ 2 | том 24 | 2025

НАУКА — ДЕТЯМ

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

Ахаладзе Дмитрий Гурамович
доктор медицинских наук, Москва, Россия

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

Жарков Павел Александрович
доктор медицинских наук, Москва, Россия

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

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

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

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

Вельте К.
профессор, Тюбинген, Германия

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

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

Кит О.И.
доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, Ростов-на-Дону, Россия

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

Окс Г.
профессор, Сиэтл, США

Решетов И.В.
доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, Москва, Россия

Родригес-Галиндо К.
профессор, Мемфис, США

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

Хенце Г.
профессор, Берлин, Германия

Журнал включен в Перечень ведущих рецензируемых журналов и изданий ВАК, в которых должны быть опубликованы основные результаты диссертаций на соискание ученых степеней доктора и кандидата наук

PEDIATRIC HEMATOLOGY/ONCOLOGY AND IMMUNOPATHOLOGY

Scientific and practical journal

№ 2 | vol. 24 | 2025

НАУКА — ДЕТЯМ

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 G. Akhaladze
MD, DSc, Moscow, Russian Federation

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

Pavel A. Zharkov
MD, DSc, Moscow, 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

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

Welte K.
Professor, Tübingen, Germany

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

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

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

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

Ochs H.
Professor, Seattle, USA

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

Rodriguez-Galindo C.
Professor, Memphis, USA

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

Henze G.
Professor, Berlin, Germany

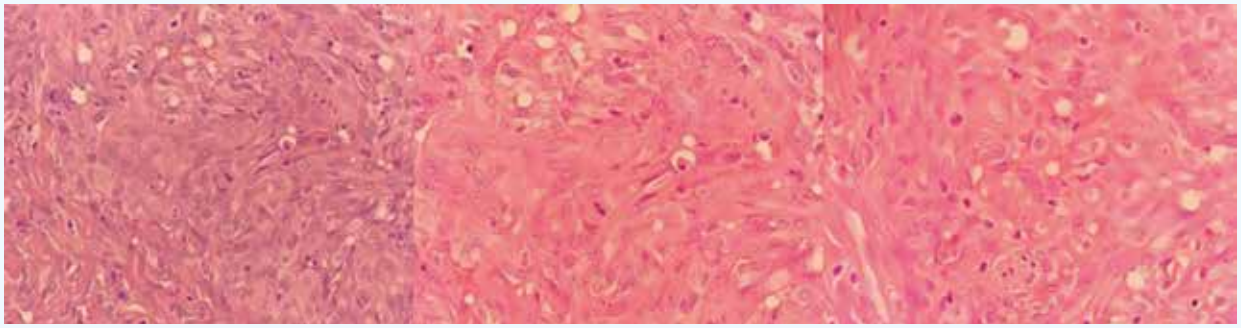
Chernov V.M.
MD, DSc, Professor, Moscow, Russia

The journal is included in the List of the leading peer-reviewed journals and publications of the Higher Attestation Commission, where main scientific findings of PhD and DSc theses are to be published

Содержание

© 2025 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, 2025, 24 (2)

Оформление обложки:



Гистологическая картина саркомы Капоши.
Из статьи М.А. Лемешева и соавт., с. 116

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Доклиническая разработка протокола производства анти-CD5 CAR-T-лимфоцитов для терапии Т-линейных острых лимфобластных лейкозов и лимфом 14
Э.Я. Мусаева, Е.А. Малахова, В.А. Ведмедская, А.А. Дудорова, Д.С. Осипова, Д.В. Волков, А.С. Чернов, А.С. Федорова, М.С. Фадеева, О.Б. Лодоева, Е.А. Кулаковская, Т.А. Созонова, А.В. Степанов, Д.Е. Першин, М.А. Масчан

Опыт разработки и масштабирования протокола производства клеточного продукта, обогащенного НК-лимфоцитами, для клинического применения 27
Е.А. Кулаковская, В.Е. Бельчиков, В.А. Ведмедская, М.С. Фадеева, Е.А. Малахова, Э.Я. Мусаева, О.Б. Лодоева, С.С. Ларин, М.И. Лукашина, А.В. Кибардин, М.Д. Моллаев, Я.О. Музалевский, А.С. Казаченок, А.К. Мелькова, Т.Ю. Завидный, П.Е. Трахтман, Л.Н. Шелихова, Д.Е. Першин, М.А. Масчан

Посттрансплантационный циклофосфамид, абатацепт и ведолизумаб в профилактике реакции «трансплантат против хозяина» после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток у детей с острым лейкозом: результаты проспективного исследования 38
М.Е. Перминова, Л.Н. Шелихова, М.А. Климентова, Д.А. Шашелева, Р.Д. Хисматуллина, М.А. Дунайкина, С.К. Аракелян, Ю.В. Скворцова, Д.Н. Балашов, А.А. Масчан, М.А. Масчан

Функция гонад у мальчиков после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток: сравнение воздействия треосульфана и тотального облучения тела в кондиционировании 46
Э.Р. Султанова, Е.Ю. Ильина, Д.А. Шашелева, А.А. Винокуров, А.В. Процветкина, В.М. Делягин, Ю.В. Скворцова

Результаты трансплантаций гемопоэтических стволовых клеток у детей с приобретенной апластической анемией с использованием мелфалансодержащих режимов кондиционирования 55
Е.В. Скоробогатова, Е.Б. Мачнева, Л.В. Ольхова, Ю.А. Николаева, М.М. Антошин

Результаты терапии детей с острым миелоидным лейкозом промежуточного риска, получивших аллогенную трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток с кондиционированием высокими дозами треосульфана от геноидентичного родственного донора в первой клинико-гематологической ремиссии 62
И.И. Калинина, Л.Н. Шелихова, М.А. Илюшина, Г.О. Бронин, М.М. Антошин, Е.В. Скоробогатова, М.А. Масчан, Г.А. Новичкова, А.А. Масчан

Дефицит фактора свертывания XIII у детей: особенности диагностики, клинического течения и опыт проведения заместительной терапии 74
Д.Б. Флоринский, А.В. Пшонкин, А.В. Полетаев, Е.А. Серегина, П.А. Жарков

Цитофлуориметрический анализ свойств эритроцитной взвеси: результаты пилотного исследования 80
И.А. Чабин, Н.А. Подоплелова, Е.О. Артеменко, Н.Н. Старостин, П.Е. Трахтман, Н.С. Сметанина, М.А. Пантелеев

Влияние двух стратегий трансфузии эритроцитсодержащих компонентов крови на исходы и частоту анемии после выписки у недоношенных детей с экстремально низкой массой тела при рождении 86
Д.Р. Шарафутдинова, Е.Н. Балашова, А.А. Пучкова, А.В. Дегтярева, А.Р. Киртбая, Р.А. Лутфуллина, Т.К. Цечоева, А.А. Козловская, О.В. Ионов

Морфология чистой популяции гематогонов, изолированной из нормального и обогащенного гематогонами костного мозга 96
А.О. Закирова, М.В. Кормилицина, О.С. Федянина, А.Н. Хвастунова, А.В. Филатов, С.А. Кузнецова

Детекция фосфатидилсерин-экспрессирующих эритроцитов в цельной крови 104
И.А. Чабин, Н.А. Подоплелова, Е.М. Кольцова, К.Р. Бутов, С.И. Обыденный, Н.С. Сметанина, М.А. Пантелеев

КЛИНИЧЕСКИЕ НАБЛЮДЕНИЯ

Тяжелая гиперхолестеринемия на фоне холестатической формы острой реакции «трансплантат против хозяина» с поражением печени у ребенка после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток 111
А.Д. Шутова, С.К. Аракелян, Э.И. Людовских, Е.И. Гутовская, А.П. Васильева, С.Н. Козловская, И.П. Шипицына, Ю.В. Скворцова, Д.Н. Балашов

Диссеминированная саркома Капоши у ребенка после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток 116
М.А. Лемешев, А.П. Васильева, С.А. Радыгина, Д.С. Абрамов, Л.А. Хачатрян, З.А. Абашидзе, С.Н. Козловская, Ю.В. Скворцова, Д.Н. Балашов, А.А. Масчан

ВИЗУАЛИЗАЦИЯ В КЛИНИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЕ

Кожная манифестация инфекции *Stenotrophomonas maltophilia* у пациента после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток 123
Э.И. Людовских, С.Н. Козловская, Н.В. Суворова, О.Н. Пинегина, Ю.В. Скворцова, Г.Г. Солопова, Д.Н. Балашов

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Пролонгированная гипогаммаглобулинемия после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток у детей 124
С.К. Аракелян, Ю.В. Скворцова

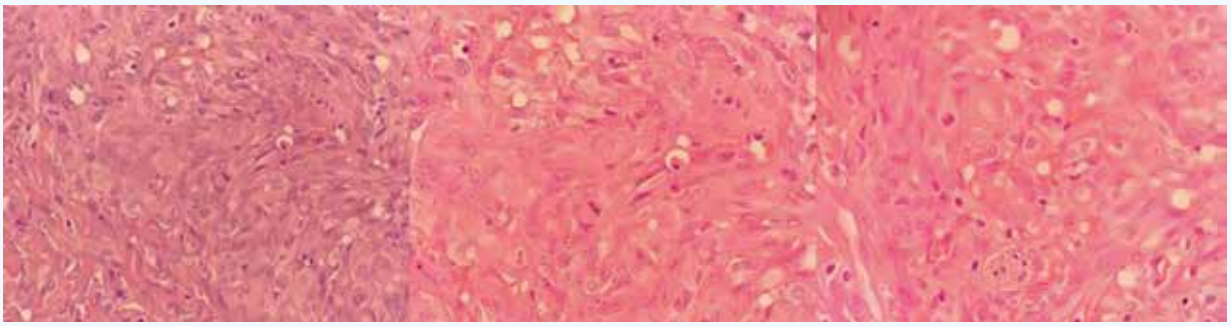
Врожденные дизэритропоэтические анемии 130
В.В. Клюхин, Н.С. Сметанина

Новые терапевтические опции для лечения трансфузионно-зависимой формы анемии Даймонда–Блекфена 140
А.С. Батаев, В.В. Клюхин, Н.С. Сметанина

Content

© 2025 «D. Rogachev NMRCPHOI», 2025, 24 (2)

Cover design:



Histological findings of Kaposi's sarcoma.
From the article by M.A. Lemeshev et al., p. 116

ORIGINAL ARTICLE

Preclinical development of a protocol for the manufacturing of anti-CD5 CAR-T lymphocytes for the treatment of T-lineage acute lymphoblastic leukemia and lymphoma 14
E.Ya. Musaeva, E.A. Malakhova, V.A. Vedmedskaia, A.A. Dudorova, D.S. Osipova, D.V. Volkov, A.S. Chernov, A.S. Fedorova, M.S. Fadeeva, O.B. Lodoeva, E.A. Kulakovskaya, T.A. Sozonova, A.V. Stepanov, D.E. Pershin, M.A. Maschan

Experience in developing and scaling a protocol for NK lymphocyte enriched cellular product manufacturing for clinical application 27
E.A. Kulakovskaya, V.E. Belchikov, V.A. Vedmedskaia, M.S. Fadeeva, E.A. Malakhova, E.Ya. Musaeva, O.B. Lodoeva, S.S. Larin, M.I. Lukashina, A.V. Kibardin, M.D. Mollaev, Ya.O. Muzalevskii, A.S. Kazachenok, A.K. Melkova, T.Yu. Zavidnyi, P.E. Trakhtman, L.N. Shelikhova, D.E. Pershin, M.A. Maschan

Post-transplant cyclophosphamide, abatacept, and vedolizumab for the prevention of graft-versus-host disease after hematopoietic stem cell transplantation in children with acute leukemia: results of a prospective study 38
M.E. Perminova, L.N. Shelikhova, M.A. Klimentova, D.A. Shasheleva, R.D. Khismatullina, M.A. Dunaykina, S.K. Arakelyan, Yu.V. Skvortsova, D.N. Balashov, A.A. Maschan, M.A. Maschan

Gonadal function in male pediatric patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a comparison of the effects of treosulfan- and total body irradiation-based conditioning 46
E.R. Sultanova, E.Yu. Ilyina, D.A. Shasheleva, A.A. Vinokurov, A.V. Protsvetkina, W.M. Delyagin, Yu.V. Skvortsova

Outcomes of hematopoietic stem cell transplantation using melphalan-based conditioning in children with acquired aplastic anemia 55
E.V. Skorobogatova, E.B. Machneva, L.V. Olkhova, Yu.A. Nikolaeva, M.M. Antoshin

Results of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation from a genoidentical sibling after high-dose treosulfan-based conditioning in children with intermediate-risk acute myeloid leukemia in first clinical and hematological remission 62
I.I. Kalinina, L.N. Shelikhova, M.A. Ilyushina, G.O. Bronin, M.M. Antoshin, E.V. Skorobogatova, M.A. Maschan, G.A. Novichkova, A.A. Maschan

Hereditary factor XIII deficiency in children: diagnostic and clinical features and clinical experience with replacement therapy 74
D.B. Florinskiy, A.V. Pshonkin, A.V. Poletaev, E.A. Seregina, P.A. Zharkov

Cytofluorometry analysis of red blood cell suspension properties: results of a pilot study 80
I.A. Chabin, N.A. Podoplelova, E.O. Artemenko, N.N. Starostin, P.E. Trakhtman, N.S. Smetanina, M.A. Panteleev

The effect of two red-cell transfusion strategies on outcomes and incidence of anemia after discharge in premature infants with extremely low birth weight 86
D.R. Sharafutdinova, E.N. Balashova, A.A. Puchkova, A.V. Degtyareva, A.R. Kirtbaya, R.A. Lutfullina, T.K. Tsechoeva, A.A. Kozlovskaya, O.V. Ionov

Morphology of a pure hematogone population isolated from normal and hematogone-rich bone marrow 96
A.O. Zakirova, M.V. Kormilitsina, O.S. Fedyanina, A.N. Khvastunova, A.V. Filatov, S.A. Kuznetsova

Detection of phosphatidylserine-expressing red blood cells in whole blood 104
I.A. Chabin, N.A. Podoplelova, E.M. Koltsova, K.R. Butov, S.I. Obydennyi, N.S Smetanina, M.A. Panteleev

CLINICAL OBSERVATION

Severe hypercholesterolemia due to the cholestatic form of acute graft-versus-host disease with liver damage in a child following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation 111
A.D. Shutova, S.K. Arakelyan, E.I. Lyudovskikh, E.I. Gutovskaya, A.P. Vasilieva, S.N. Kozlovskaya, I.P. Shipitsyna, Yu.V. Skvortsova, D.N. Balashov

Disseminated Kaposi's sarcoma in a child treated with allogeneic hematopoietic stem cell transplantation 116
M.A. Lemeshev, A.P. Vasilieva, S.A. Radygina, D.S. Abramov, L.A. Khachatryan, Z.A. Abashidze, S.N. Kozlovskaya, Yu.V. Skvortsova, D.N. Balashov, A.A. Maschan

VISUALIZATION IN CLINICAL MEDICINE

A cutaneous manifestation of *Stenotrophomonas maltophilia* infection in a patient previously treated with allogeneic haematopoietic stem cell transplantation 123
E.I. Lyudovskikh, S.N. Kozlovskaya, N.V. Suvorova, O.N. Pinegina, Yu.V. Skvortsova, G.G. Solopova, D.N. Balashov

LITERATURE REVIEW

Prolonged hypogammaglobulinemia in children after allogeneic hemopoietic stem cell transplantation 124
S.K. Arakelyan, Yu.V. Skvortsova

Congenital dyserythropoietic anemias 130
V.V. Klyukhin, N.S Smetanina

New therapeutic options for the treatment of transfusion-dependent Diamond–Blackfan anemia 140
A.S. Bataev, V.V. Klyukhin, N.S. Smetanina

Памяти Елены Владимировны САМОЧАТОВОЙ

10 июня 2025 года не стало Елены Владимировны Самочатовой.

Елена Владимировна начала свою карьеру исследователя-гематолога еще в конце 1960-х годов, однако ее расцвет пришелся на период после 1987 года, когда в Российской детской клинической больнице было создано отделение гематологии. Елена Владимировна по призыву Александра Григорьевича Румянцева, по существу, возглавила это отделение, которое вскоре стало ведущим в тогда еще Советском Союзе и из которого в дальнейшем вырос Научно-исследовательский институт детской гематологии и далее нынешний Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева. Тогда, когда умирали почти все дети с острыми лейкозами, в условиях интеллектуального вакуума и тотального материального дефицита Елена Владимировна выполняла непростую роль наставника для молодых врачей отделения, обучая, защищая, а иногда и попросту подкармливая их.

После открытия страны для широких международных контактов Елена Владимировна стала активным участником программы организации спонсируемых «КЭР-Германией» передовых центров детской гематологии и онкологии в стране. Она объехала всю страну и внесла огромный вклад в организацию отделений, сыгравших ключевую роль в революции в результатах лечения острых лейкозов. Кроме того, с начала 1990-х годов Елена Владимировна была куратором учебной программы методистской церкви штата Теннесси, благодаря которой более 100 российских врачей прошли стажировки в лучшем детском онкологическом центре мира – госпитале St. Jude.

Будучи исключительно одаренным исследователем, Елена Владимировна внесла большой вклад в изучение многих разделов детской гематологии/онкологии, но особый интерес она испытывала к проблеме злокачественных лимфом у детей. Именно благодаря ее подвижническим усилиям в середине 1990-х в лечении лимфом у детей произошел огромный прорыв, а «серые» и «розовые» методички по лечению лимфом до недавнего времени оставались «Новым заветом» для детских гематологов.

Елена Владимировна была не только прекрасным учителем и верным соратником, она была ярким и интересным человеком, щедро дающим душевное тепло каждому, кто оказался рядом. На «Сиреневые балы» на ее даче каждый год съезжались десятки коллег – и это тоже навсегда останется в нашей памяти. Уникальный жизненный опыт и дар рассказчика делал ее появление желанным в любой компании, она при жизни стала настоящей легендой, героем профессионального эпоса и исторических анекдотов.

Елена Владимировна ушла, выполнив свое жизненное задание, и мы, благодарные, остаемся со светлой и чистой памятью о ней.

Коллеги, друзья и сотрудники
ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России

DOI: 10.24287/1726-1708-2025-24-2-14-26

© 2025 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России

Поступила 05.06.2025
Принята к печати 26.06.2025

EDN: BTJSEB

Доклиническая разработка протокола производства анти-CD5 CAR-T-лимфоцитов для терапии Т-линейных острых лимфобластных лейкозов и лимфом

Э.Я. Мусаева[1], Е.А. Малахова[1, 2], В.А. Ведмедская[1], А.А. Дудорова[1], Д.С. Осипова[1], Д.В. Волков[3], А.С. Чернов[3], А.С. Федорова[1], М.С. Фадеева[1], О.Б. Лодоева[1], Е.А. Кулаковская[1], Т.А. Созонова[1], А.В. Степанов[1], Д.Е. Першин[1], М.А. Масчан[1]

[1]ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, Москва
[2]ФГБУН Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук, Пущино
[3]ФГБУН ГНЦ РФ Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва

Контактная информация:
Мусаева Эльвира Яшаровна, врач клинической лабораторной диагностики лаборатории трансплантационной иммунологии и иммунотерапии гемобластозов ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России
Адрес: 117997, Москва, ул. Саморы Машела, 1
E-mail: elvira.musaeva@dgoi.ru

Разработка методов клеточной терапии Т-линейного острого лимфобластного лейкоза является актуальной задачей. В настоящем исследовании представлен доклинический этап разработки анти-CD5 CAR-T-лимфоцитов в условиях отсутствия дополнительных генетических модификаций за счет естественной down-регуляции маркера CD5. Полученные клеточные продукты продемонстрировали удовлетворительные показатели кратности экспансии и доли CAR-экспрессирующих клеток, преобладание Tem-фенотипа ($CD197^-CD45RA^-$), низкие уровни экспрессии маркеров истощения (PD-1, CD57, TIGIT). Функциональная активность была продемонстрирована как *in vitro* посредством оценки дегрануляции, синтеза цитокинов и цитотоксичности в отношении клеточной линии Jurkat, так и *in vivo* посредством исследования элиминации $CD5^+$-лейкоза на мышиной модели. Полученные данные могут быть использованы для формирования клинического протокола производства анти-CD5 CAR-T-лимфоцитов. Исследование одобрено независимым этическим комитетом и утверждено решением ученого совета НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева.
Ключевые слова: *острый лимфобластный лейкоз, иммунотерапия, CAR-T-клеточная терапия*

Мусаева Э.Я. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2025; 24 (2): 14–26. DOI: 10.24287/1726-1708-2025-24-2-14-26

© 2025 by «D. Rogachev NMRCPHOI»

Received 05.06.2025
Accepted 26.06.2025

Preclinical development of a protocol for the manufacturing of anti-CD5 CAR-T lymphocytes for the treatment of T-lineage acute lymphoblastic leukemia and lymphoma

E.Ya. Musaeva[1], E.A. Malakhova[1, 2], V.A. Vedmedskaia[1], A.A. Dudorova[1], D.S. Osipova[1], D.V. Volkov[3], A.S. Chernov[3], A.S. Fedorova[1], M.S. Fadeeva[1], O.B. Lodoeva[1], E.A. Kulakovskaya[1], T.A. Sozonova[1], A.V. Stepanov[1], D.E. Pershin[1], M.A. Maschan[1]

[1]The Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology of Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow
[2]Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino
[3]The Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow

Correspondence:
Elvira Ya. Musaeva, MD in Clinical Laboratory Medicine 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: elvira.musaeva@dgoi.ru

The development of cell therapy methods for T-lineage acute lymphoblastic leukemia remains a relevant clinical challenge. The current study presents a preclinical stage of anti-CD5 CAR-T cell development without the use of additional genetic modifications, relying on down-regulation of CD5. The resulting cell products demonstrated sufficient expansion rates and CAR expression levels, the predominance of the Tem phenotype ($CD197^-CD45RA^-$) and low expression of exhaustion markers (PD-1, CD57, TIGIT). The antitumor function was confirmed both *in vitro* through the assessment of degranulation, cytokine production, and cytotoxicity against the Jurkat cell line, and *in vivo* through the evaluation of $CD5^+$ leukemia elimination in a murine model. The data obtained may serve as a basis for the development of a clinical manufacturing protocol for anti-CD5 CAR-T cells. 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: *acute lymphoblastic leukemia, immunotherapy, CAR T-cell therapy*

Musaeva E.Ya., et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology 2025; 24 (2): 14–26. DOI: 10.24287/1726-1708-2025-24-2-14-26

Т-линейный острый лимфобластный лейкоз (Т-ОЛЛ) составляет 10–15% всех случаев острых лимфобластных лейкозов у детей и характеризуется достаточно высокой частотой развития рефрактерного течения и рецидивов [1]. Результаты терапии при рефрактерном течении, даже при использовании трансплантации гемопоэтических стволовых клеток, остаются неудовлетворительными [2].

На текущий момент выбор препаратов с селективным действием в отношении Т-клеточных предшественников для пациентов с рефрактерными формами или рецидивами Т-ОЛЛ ограничен примене-

нием неларабина [3–5]. В то же время в терапии В-линейных лейкозов хорошо зарекомендовала себя CAR-T (chimeric antigen receptor) клеточная терапия, представляющая собой производство генно-модифицированных Т-лимфоцитов с цитотоксической активностью в отношении CD19 или других антигенов, специфичных для В-клеточной линии дифференцировки [6–10].

Одной из перспективных мишеней для таргетной иммунотерапии является поверхностный антиген CD5, широко экспрессируемый опухолевыми клетками при Т-ОЛЛ, однако использование его при разработке клеточной терапии сопряжено с рядом трудностей ввиду наличия экспрессии маркера на здоровых Т-лимфоцитах, тимоцитах, а также ряде В-клеток [11, 12]. В частности, потенциальными проблемами являются как аутоагрессия (так называемый фратрицид) в процессе производства анти-CD5 CAR-T-лимфоцитов, так и элиминация нормальных клеток иммунной системы наравне с бластными у пациентов с Т-ОЛЛ при применении данной терапии [13].

В процессе производства CAR-T-лимфоцитов проблема фратрицида может быть решена несколькими путями: включением этапа генетического редактирования с использованием технологии CRISPR/Cas9, подразумевающего нокаут гена, кодирующего CD5, включением в конструкцию белкового модуля, опосредующего внутриклеточную деградацию либо блокирующего экспрессию белка CD5, а также культивированием в присутствии ингибиторов тирозинкиназы, снижающих эффекты фратрицида у трансдуцированных Т-лимфоцитов [14–16]. Однако использование данных методик может быть сопряжено со снижением показателей жизнеспособности и общей клеточности финального продукта, что может создавать трудности в достижении необходимых для клинического применения количественных показателей.

В настоящее время в литературе имеются данные об эффекте снижения экспрессии CD5 Т-лимфоцитами в случае трансдукции их анти-CD5 CAR-вектором. Данный биологический феномен позволяет производить анти-CD5 CAR-T-лимфоциты без дополнительных генетических модификаций, позволяя получить биомедицинский клеточный продукт (БМКП) с необходимыми клеточностью и фенотипом [17, 18].

Целью настоящей работы являлось проведение доклинических исследований для последующего формирования клинического протокола производства анти-CD5 CAR-T-лимфоцитов в условиях НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

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

Производство и характеристика вирусного вектора

Ретровирусный вектор MM25b, содержащий ген *CAR* и пакующий сигнал (ψ) вируса мышиного лейкоза Молони, был получен в дар от доктора М.А. Мамонкина (Baylor College of Medicine Houston, Техас, США). CAR содержит одноцепочечный вариабельный фрагмент из моноклонального антитела H65 к CD5 [19], шарнирную область из человеческого иммуноглобулина G4, трансмембранный и внутриклеточный домены из человеческого CD28, сигнальный домен из человеческого CD3z.

Ретровирусный вектор был получен с использованием упаковочной клеточной линии 293Vec-Galv (Biovec pharma). Клеточную культуру культивировали на двухслойной клеточной фабрике (NEST) с использованием среды StemMacs (Miltenyi Biotec) при стандартных условиях (37ºC, 5% CO_2). Конфлюэнтность монослоя (80 ± 5%) оценивали с помощью микроскопии. Трансфекцию осуществляли с использованием комплексов плазмидной ДНК с линейным PEI (PolyPlus) в соотношении 1:4 в бессывороточной среде Opti-MEM (Gibco). Через 24 ч проводили полную замену среды. Вируссодержащий супернатант собирали через 48 ч после трансфекции, центрифугировали при 500g в течение 10 мин и пропускали через фильтр 0,45μm PES. Аликвоты вирусного вектора хранили при –80ºC.

Для определения титра вирусный вектор обрабатывали бензоназой (DiaGene, Россия) в концентрации 50 Ед/мл. Вирусную РНК выделяли с помощью набора HiPure Viral RNA kit (Magen, Китай), затем обрабатывали ДНКазой (DNase I, New England Biolabs, Великобритания) и проводили обратную транскрипцию с использованием набора Реверта-L (AmpliSens, Россия). Подсчет вирусных геномных копий выполняли методом цифровой капельной полимеразной цепной реакции (ПЦР) на системе QX200 ddPCR System (Bio-Rad Technologies, США) с применением специфических праймеров (F-5'-CTCCGATTGACTGAGTCGC-3'; R-5'-GAACAGCGAGACCACAAGT-3') и зонда (FAM-5'-ACCCGTGTATCCAATAAACCCTCTTGC-3') к LTR-элементу ретровируса. Титр рассчитывали по формуле:

$$T = \frac{R \times C \times D \times 1000}{V},$$

где T – титр (геномные копии/мл); R – объем ПЦР (20 мкл); C – концентрация (копий/мкл); D – коэффициент разведения вируса; V – объем образца в реакции (8 мкл).

Процесс производства анти-CD5 CAR-T-лимфоцитов

В день 0 осуществляли взятие периферической крови здорового донора в пробирки CPT (Becton

Dickinson, США) с последующим выделением мононуклеарных клеток согласно протоколу производителя. Фракции $CD4^+$-и $CD8^+$-клеток сортировали на приборе MACSQuant Tyto (Miltenyi Biotec) с использованием антител CD4-VioBlue human GMP (Miltenyi Biotec) и CD8-APC human GMP (Miltenyi Biotec). Из полученной фракции 5×10^6 клеток вносили в 6-луночный биореактор G-Rex (Wilson Wolf Manufacturing, 80240M) в среде TexMacs (Miltenyi Biotec), содержащей цитокины интерлейкин (IL)-7 и IL-15 (Miltenyi Biotec) в концентрации 12,5 нг/мл, активировали с помощью реагента TransAct (Miltenyi Biotec).

Через 24 ч к активированным Т-лимфоцитам добавляли ретровирусный анти-CD5-вектор и реагент Vectofusin-1 (Miltenyi Biotec) в концентрации 10 мкг/мл. Далее клетки культивировали в течение 13 дней с полной оценкой фенотипа и функциональной активности продукта на +9-й и +14-й дни. Доливку среды осуществляли на +3-й день, замену – на +7-й и +10-й дни.

Оценка клеточного состава, фенотипа и экспрессии CAR методом проточной цитометрии

Исследование экспрессии CD5 проводилось в дни 0, +7, +9 и +14 посредством инкубации клеточной суспензии с моноклональными антителами 7-AAD-PerCP (Beckman Coulter), CD3-APC (клон UCHT1, Invitrogen), CD5-PC7 (клон BL1a, Beckman Coulter). Оценивалось относительное количество $CD5^+$-клеток в регионе 7AAD-$CD3^+$-клеток.

В целях оценки фенотипа клеточного продукта клетки инкубировали с моноклональными антителами CD4-Pacific Blue (клон 13B8.2, Beckman Coulter), CD8-Pacific Orange (клон MEM-31, Exbio Diagnostics), CD279-FITC (клон EH12.2h7, Exbio Diagnostics), tigit-ECD (клон A15153G, BioLegend), 7-AAD-PerCP (Beckman Coulter), CD197-PC7 (клон REA108, Miltenyi Biotec), CD3-APC (клон UCHT1, Invitrogen), CD45RA-APC-A700 (клон 2H4, Beckman Coulter), CD57-APC-A750 (клон REA769, Miltenyi Biotec). Оценивали экспрессию маркеров истощения, а также следующие популяции Т-лимфоцитов: наивные ($CD197^+CD45RA^+$), центральные ($CD197^+CD45RA^-$), эффекторные ($CD197^-CD45RA^-$) и терминально дифференцированные ($CD197^-CD45RA^+$).

Уровень экспрессии CAR оценивался посредством инкубации клеток с реагентом CD5 CAR-detection FITC (Acro Biosystems), антителами CD45-VioBlue (клон 5B1, Miltenyi Biotec), CD4-VioGreen (клон REA623, Miltenyi Biotec), CD3-APC (клон UCHT1, Invitrogen), 7AAD-Per-CP (Beckman Coulter), CD8-APC-Vio770 (клон REA734, Miltenyi Biotec).

Образцы анализировали на проточном цитометре CytoFLEX (Beckman Coulter), данные обрабатывали с помощью программы CytExpert 2.3.

Определение числа копий вектора

Для определения числа копий вектора (vector copy number, VCN) клеточный продукт обрабатывали бензоназой (DiaGene, Россия). ДНК выделяли набором ExtractDNA Blood & Cells (Евроген, Россия). Подсчет VCN выполняли методом цифровой капельной ПЦР на системе QX200 ddPCR System (Bio-Rad Technologies, США) с применением специфичных праймеров и зонда к LTR-элементу ретровируса и к референсному гену RPP30 (F-5'-GATTTGGACCTGCGAGCG-3'; R-5'- GCGGCTGTCTCCACAAGT-3'; HEX-5'-CTGACCTGAAGGCTCT-3'). VCN рассчитывали по формуле:

$$VCN = 2 \times \frac{\text{число копий } LTR}{\text{число копий } RPP30}.$$

Функциональная оценка цитотоксичности, продукции цитокинов и дегрануляции

Для функциональной оценки полученных клеточных продуктов использовали CD5-экспрессирующие клеточные линии Jurkat и Jeko-1, в качестве отрицательного контроля – линию K562. В целях оценки цитотоксичности клеточные линии были трансдуцированы реагентом Incucyte Nuclight Red Lentivirus Reagent (EF1a, Puro, Essen BioScience) и селектированы в присутствии пуромицина в концентрации 1 мкг/мл.

Для проведения функциональных тестов из продукта производства в дни +9 и +14 отбирали 10 млн клеток, вносили в среду TexMacs (Miltenyi Biotec) при отсутствии цитокинов IL-7 и IL-15, инкубировали в течение суток в стандартных условиях.

Цитотоксичность оценивали посредством инкубации 3×10^4 клеток продукта производства с трансдуцированными клеточным линиями в соотношении 1:1 при 37°C и 5% CO_2. С помощью прибора для визуализации клеток Incucyte (Sartorius) фиксировали изображения клеток каждый час в течение 48 ч. Далее анализировали количество красных объектов в зависимости от времени инкубации, рассчитывали значения площади под кривой (Area Under the Curve, AUC).

Оценка дегрануляции и продукции цитокинов проводилась с клеточной линией Jurkat в соотношении 1:1. Для оценки секреции цитокинов дополнительно вносили ингибитор трансмембранного транспорта белков (GolgiPlug, BD) и инкубировали в течение 3 ч. В целях исследования дегрануляции клетки инкубировали с клеточной линией в присутствии антитела CD107a (клон H4A3, Elabscience) в течение 2 ч. Далее инкубировали с антителами к поверхностным маркерам CD5-Pacific Blue (клон BL1a, Beckman Coulter), CD4-Pacific Orange (клон MEM-241, Exbio Diagnostics), 7AAD-Per-CP (Beckman Coulter), CD3-APC (клон UCHT1, Invitrogen),

CD8-APC-Vio770 (клон SK1, Becton Dickinson). Для оценки дегрануляции дополнительно использовали антитело CD107a (клон H4A3, Elabscience). Продукция цитокинов оценивалась посредством внутриклеточного окрашивания с антителами IFN-γ-PE (клон REA600, Miltenyi Biotec), TNF-α-PE-Vio-770 (клон Mab11, Invitrogen) с использованием набора Fix&Perm (Abcam). Анализ образцов проводили на проточном цитометре CytoFLEX (Beckman Coulter), оценивали количество фактор некроза опухоли- и интерферон-продуцирующих клеток, а также CD107α-экспрессирующих в регионе $CD3^+CD8^+$.

Для всех функциональных исследований параллельно с оценкой продукта производства были исследованы генетически немодифицированные Т-лимфоциты от идентичного донора (Mock-клетки). Эффект Mock-клеток вычитали из эффекта анти-CD5 CAR-Т-лимфоцитов. В целях сопоставимости результатов между собой все функциональные исследования проводились с пересчетом на процент CAR-экспрессирующих Т-клеток.

Оценка эффективности элиминации $CD5^+$-клеточной линии *in vivo*

Для эксперимента использовали самок мышей линии NCG (NOD.Cg-PrkdcscidIl2rgem1Smoc) в возрасте 6–8 недель, содержавшихся в стандартных условиях питомника лабораторных животных «Пущино» (уникальная научная установка «Био-модель» ИБХ РАН; Биоресурсная коллекция лабораторных грызунов SPF-категории для фундаментальных, биомедицинских и фармакологических исследований, при поддержке Министерства науки и высшего образования (075-15-2025-486)). Экспериментальные процедуры проводились в соответствии с рекомендациями по уходу за лабораторными животными.

Опухолевые клетки Jurkat модифицировали методом лентивирусной трансдукции для стабильной экспрессии ffluc (firefly luciferase, люцифераза светлячка). Далее клетки вводили в хвостовую вену в дозе по $2{,}5 \times 10^6$ на мышь. На 5-й день, по итогам визуализации опухолей, мышей разделяли на 3 экспериментальные группы и вводили в хвостовую вену эффекторные клетки. Первая группа получала терапию контрольными Т-клетками (Mock-T; $n = 5$), вторая и третья группы – анти-CD5 CAR-Т-клетками по $2{,}5 \times 10^6$ ($n = 7$) и 5×10^6 ($n = 7$) на мышь соответственно.

Для визуализации опухоли субстрат D-люциферин (GoldBio) еженедельно вводили интраперитонеально в концентрации 15 мг/мл. До и после введения субстрата мышей помещали в камеру для наркоза изофлураном в концентрации 1,5–2,5% в течение 5 мин. Через 10 мин после введения D-люциферина проводили детекцию люминесценции в системе IVIS Lumina III (PerkinElmer, США).

Для оценки персистенции CAR-Т-лимфоцитов в периферической крови мышей со дня введения клеточного продукта еженедельно осуществляли забор крови из ретроорбитального синуса.

На 26-й день от введения опухолевых клеток по одной мыши из каждой группы были забраны для проведения гистологического исследования тканей селезенки, легкого и печени.

Оценка персистенции анти-CD5 CAR-Т-лимфоцитов в образцах крови мышей

Образцы крови мышей инкубировали с реагентом CD5 CAR-detection (Acro Biosystems), антителами anti-Mouse CD45-PE (клон REA599, Sony Biotechnology), 7-AAD-PerCP (Beckman Coulter), CD5-PC7 (клон BL1a, Beckman Coulter), CD3-APC (клон UCHT1, Invitrogen), CD8-APC-Vio770 (клон SK1, Becton Dickinson), CD45-VioBlue (клон 5B1, Miltenyi Biotec), CD4-Pacific Orange (клон MEM-241, Exbio Diagnostics). Далее лизировали с помощью раствора ExCellLyse (Exbio). Каждый образец сопровождался пробиркой негативного контроля, в которую реагент CAR-detection не добавлялся. Анализ образцов проводили на проточном цитометре CytoFLEX (Beckman Coulter), оценивали абсолютное количество человеческих $CD3^+$-клеток и относительное число $CD3^+CAR^+$ Т-лимфоцитов.

Гистологическое исследование

Аутопсийный материал от лабораторных мышей помещался в 10% нейтральный забуференный раствор формалина на 24 ч. Далее ткани помещались в гистологические кассеты. Гистологическая заливка осуществлялась с помощью станции HistoStar (Thermo Fisher Scientific, США). Для гистологической проводки материала использовались аппараты Sakura Tissue-Tek VIP 5 и Sakura Tissue-Tek Xpress X120. Изготовление срезов осуществлялось с использованием микротома Thermo Fisher Scientific Microm HM 355S.

С помощью иммуногистохимического метода исследования на срезах с парафиновых блоков образцов ткани определялось наличие экспрессии CD3 (Cell Marque, клон MRQ-39), CD5 (Cell Marque, клон SP19) с применением набора ultraView Universal DAB Detection Kit, VENTANA. Для проведения исследования использовалась система Ventana Bench-Mark Ultra с последующим докрашиванием гематоксилином и автоматическим накрыванием покровными стеклами с помощью системы Dako CoverStainer. Готовые препараты оценивались методом световой микроскопии.

Статистическая обработка

Для статистической обработки результатов исследования использовали программу GraphPad Prism 8.0.1 (GraphPad Software, США). Для всех показателей данные представлены в виде медианы и разброса. Уровень статистической значимости описывался как *, **, *** и **** для значений p <0,05, <0,01, <0,001 и <0,0001 соответственно. Для сравнения двух выборок применяли парный t-критерий Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Нами были проведены 5 процессов производства анти-CD5 CAR-T-БМКП с помощью неавтоматизированной платформы G-Rex.

В целях исследования эффекта снижения экспрессии маркера CD5 в процессе производства CAR-T-лимфоцитов нами проводилась оценка его экспрессии в дни 0, +7, +9 и +14. При оценке продукта сортинга в день 0 наблюдалась тотальная экспрессия CD5 полученными клетками. При оценке данного маркера на +7-е сутки отмечалось снижение экспрессии до медианного значения 4,1% (разброс 0–7%) с ее полным отсутствием к 9-му дню (*рисунок 1*).

В целях определения оптимальной длительности процесса производства анти-CD5 CAR-T-лимфоцитов полная оценка состава и функциональных свойств каждого продукта проводилась в дни +9 и +14.

Все 5 процессов демонстрировали удовлетворительную динамику экспансии общего количества $CD3^+$-клеток со значимым приростом к +14-му дню. В день +9 кратность экспансии составляла ×18,4 с медианой количества Т-лимфоцитов 92 (70–104) × 10^6. В день +14 общее количество Т-лимфоцитов возрастало в 47,6 раза с медианой 238 (192–271) × 10^6 (*рисунок 2А*). Экспрессия CAR была высокой как в день +9, так и в день +14 с медианой 88% (69–97%) и 92% (75–96%) соответственно, что демонстрировало статистически незначимую разницу (*рисунок 2Б*). Таким образом, к +14-му дню возможно получение значимо большего количества Т-лимфоцитов без потери доли CAR-экспрессирующих клеток. Медиана VCN полученных клеточных продуктов составляла 2,81 (2,72–5,6).

При оценке фенотипа Т-лимфоцитов в продукте производства отмечалось преобладание популяции $CD197^-CD45RA^-$ (Tem) (*рисунок 3*). Медиана их доли среди $CD4^+$-клеток составила 89,3% (82,4–92,6%) на +9-й день и 98,2% (94–99,1%) на +14-й день. Среди $CD8^+$-клеток – 79% (70,8–84,7%) и 97,4% (96–99,3%) соответственно. К +14-му дню отмечался статистически значимый их прирост (p < 0,01). Соотношение CD4:CD8 составляло 1,6 (1,4–2,5) на +9-й день и 1 (0,9–2,4) на +14-й день.

При этом экспрессия маркеров истощения значимо не менялась в зависимости от длительности процесса производства (*рисунок 4*). К +14-му дню экспрессия CD57 демонстрировала достаточно низкие значения: 0,9% (0,3–3,4%) среди $CD4^+$-клеток и 3,6% (2,4–8,3%) среди $CD8^+$-клеток. Маркер CD279 к +14-му дню экспрессировался на 11% (9,9–14%) $CD4^+$ и 3,7% (2,2–4,1%) $CD8^+$ Т-лимфоцитов. Аналогичным образом экспрессия TIGIT составляла 7% (5,2–12,3%) и 12,5% (8,1–16,8%) соответственно.

Инкубация полученных CAR-T-лимфоцитов с CD5-экспрессирующей клеточной линией демонстрировала высокие показатели дегрануляции и экспрессии цитокинов (*рисунок 5*). Медиана экспрессии CD107a цитотоксическими Т-лимфоцитами при оценке на +9-й день составила 50% (26–68%), на +14-й день – 63% (38–74%) (p < 0,01).

Рисунок 1
Дот-плоты, отражающие кинетику процесса снижения экспрессии CD5

Figure 1
Dot-plots reflecting the kinetics of CD5 down-regulation

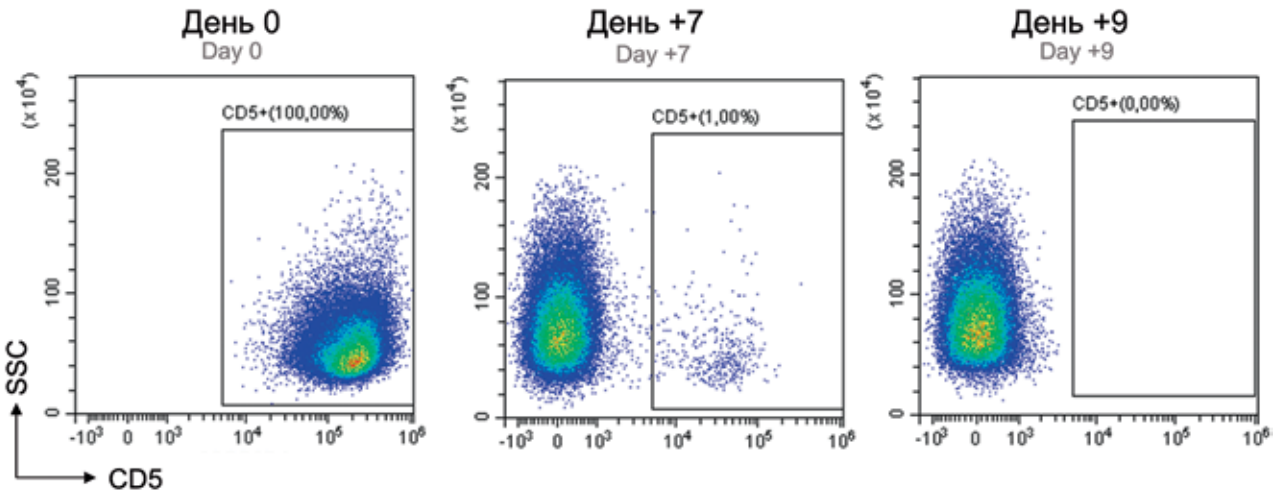


Рисунок 2
А – динамика темпов экспансии анти-CD5 CAR-T-клеточных продуктов в течение 14-дневного цикла культивации; Б – доля CAR-экспрессирующих Т-лимфоцитов в продукте производства
На графике представлены индивидуальные значения с указанием медианы в дни +9 и +14 и статистической значимости разницы между показателями

Figure 2
A – the changes in the expansion of anti-CD5 CAR-T cell products during a 14-day cultivation process; B – the percentage of CAR-positive T-cells in the product
The graph shows individual values with a median on days +9 and +14 and statistical significance between the values

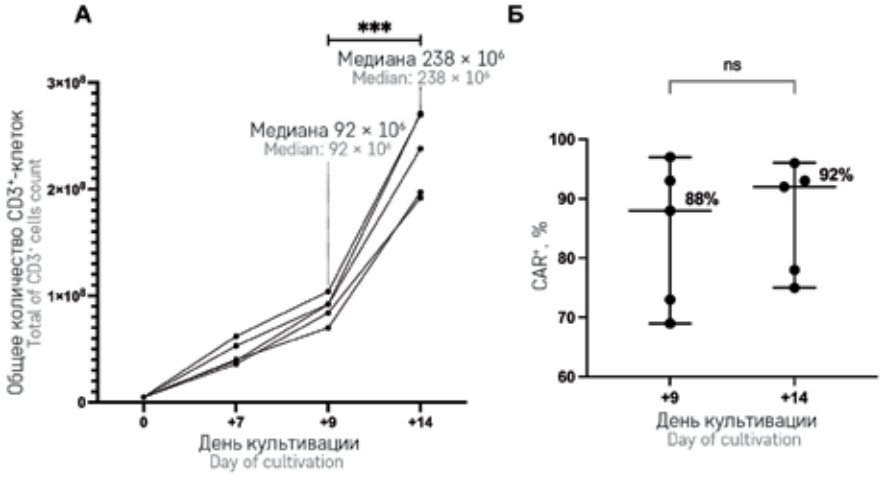


Рисунок 3
Фенотип CAR-T-лимфоцитов в зависимости от длительности процесса производства
А – индивидуальные значения с указанием медианы и статистической значимости; Б – дот-плоты, отражающие экспрессию CD197 и CD45RA CD4⁺- и CD8⁺-клетками на +9-й день

Figure 3
The phenotype of CAR-T lymphocytes depending on the duration of cultivation
A – individual values with a median and statistical significance; Б – Dot-plots representing CD197 and CD45RA expression by CD4⁺ and CD8⁺ cells on day +9

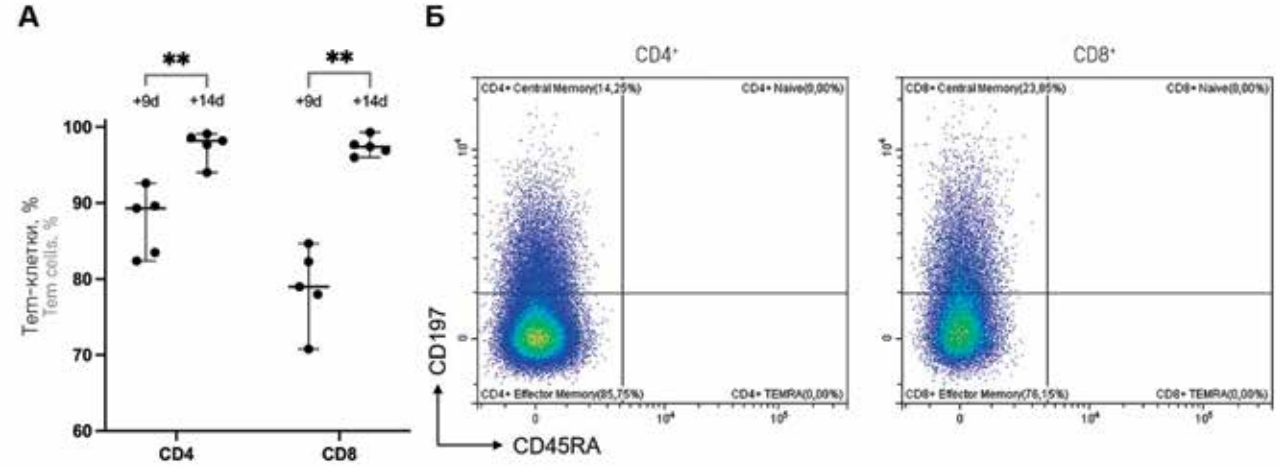
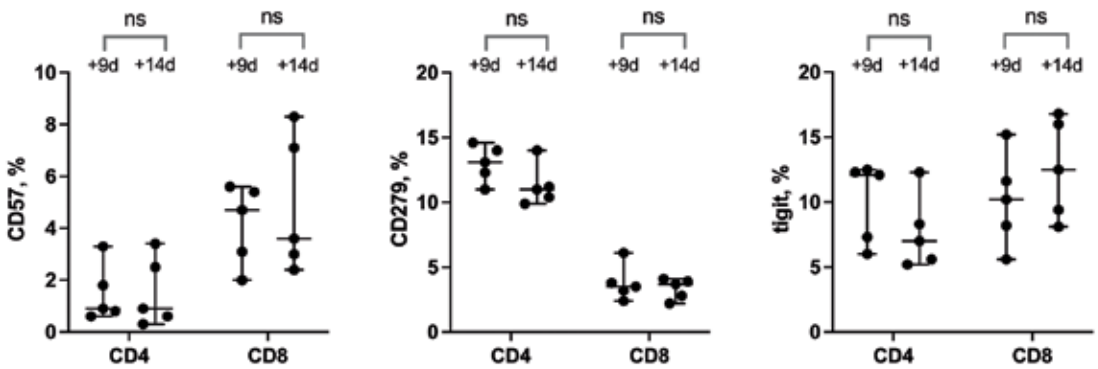


Рисунок 4
Оценка экспрессии маркеров истощения

Figure 4
The assessment of the expression of T cell exhaustion markers



Продукция фактора некроза опухоли также статистически значимо увеличивалась с 42% (12,2–68,3%) до 48% (14–73,9%) ($p < 0,01$). Экспрессия интерферона-γ значимо не изменялась.

Оценка цитотоксичности анти-CD5 CAR-T-лимфоцитов проводилась в отношении клеточной линии Jurkat, которая служила моделью CD5⁺ T-линейного лейкоза. Дополнительно цитотоксичность оценивали в отношении CD5⁺ B-клеточной линии Jeko-1. В качестве отрицательного контроля использовали линию K562, не имеющую на своей поверхности маркера CD5. Оценка цитотоксичности в системе визуализации IncuCyte показала успешную элиминацию CD5⁺-линий в течение 48 ч. CD5-негативная линия не была элиминирована, отмечалось нарастание количества клеток, схожее по темпам с эффектом Mock-клеток (*рисунок 6А*).

Для всех 5 процессов производства исследование специфичной цитотоксичности в отношении линии Jurkat проводилось в дни +9 и +14 в соотношениях эффекторных клеток к таргетным 1:1 и 0,5:1. Во всех случаях также наблюдалась успешная элиминация опухолевых клеток (*рисунок 6Б, В*). Эффект оценивали путем расчета разницы в значениях AUC, полученных при исследовании Mock-T-клеток и CAR-T-лимфоцитов от идентичных доноров. Статистически значимых различий в показателях в зависимости от длительности культивации получено не было.

В целях оценки эффективности элиминации CD5⁺ T-клеточного лейкоза *in vivo* нами был проведен эксперимент на мышиной модели с использованием клеточной линии Jurkat-ffluc. Учитывая более высокие показатели кратности экспансии и экспрессии CAR-рецептора при длительности процесса 14 дней, данный протокол был выбран для производства анти-CD5 CAR-T-лимфоцитов для оценки эффективности на мышиной модели.

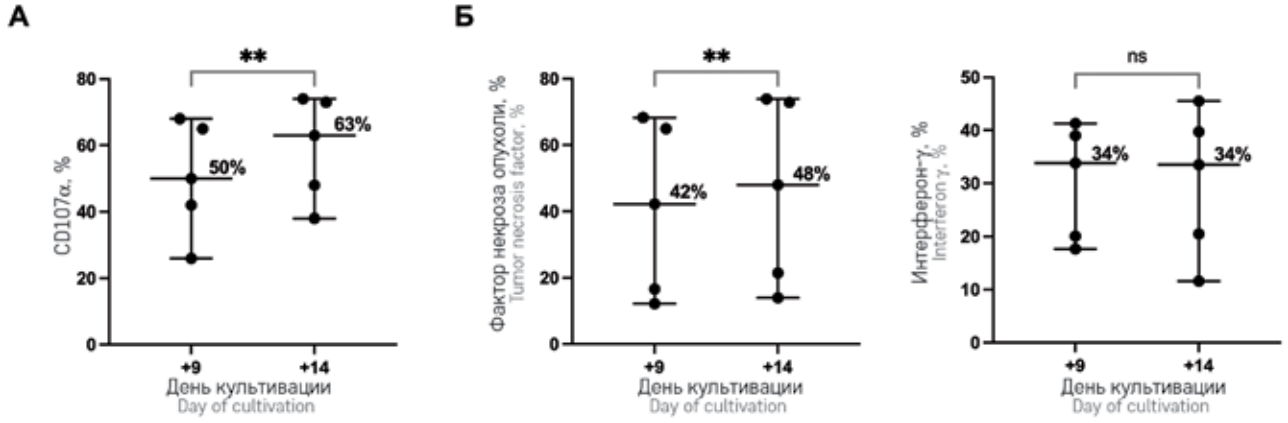
В полученном продукте, аналогично с полученными раннее данными, доля CAR-экспрессирующих клеток была достаточно высокой и составляла 91%. Дозу клеточного продукта на мышь рассчитывали с пересчетом на долю CAR-экспрессирующих клеток (*таблица*).

На 4-й день от введения клеток Jurkat-ffluc опухоль визуализировалась у всех 19 экспериментальных мышей (*рисунок 7А*). На 5-й день животным вводились эффекторные клетки в соответствии с распределением на группы. Наиболее высокие уровни люминесценции при последующем наблюдении отмечались в контрольной группе, получившей Mock-T-клетки, что выражалось в более низких показателях выживаемости (*рисунок 7Б, В*). В группах мышей, получивших CAR-T-клетки в различных дозах, прогрессия опухолевого роста была менее выражена. Однако было отмечено, что доза 5 млн CAR-T-клеток более эффективно сдерживает опухолевый рост, что также подтверждается при анализе кривых выживаемости: наблюдается статистически значимая разница между группами с дозами 2,5 млн и 5 млн CAR-T-клеток на мышь ($p < 0,01$). При длительности наблюдения 61 день в группе мышей, получившей бóльшую дозу CAR-T-клеток, прогрессия опухоли наблюдалась лишь у одной мыши, в то время как в группе, получившей дозу 2,5 млн, за время наблюдения полного сдерживания опухолевого роста ни у одной мыши достигнуто не было.

Помимо визуализации опухоли в каждую точку наблюдения проводился забор периферической крови мышей в целях оценки персистенции человеческих T-лимфоцитов и доли CAR-экспрессирующих клеток. За время наблюдения человеческие T-лим-

Рисунок 5
Функциональная оценка продукта производства на +9-й и +14-й дни: оценка дегрануляции (А) и секреции (Б) цитокинов цитотоксическими T-лимфоцитами после инкубации с CD5-экпрессирующей клеточной линией Jurkat

Figure 5
Functional assay of CAR-T cells on +9 and +14 days of cultivation: degranulation assay (A) and cytokines production (Б) by CD8⁺ T-cells after coculture with CD5-expressing Jurkat cell line



фоциты детектировались у всех экспериментальных животных. Наиболее активная пролиферация отмечалась в группах мышей, получивших Mock-T-клетки и CAR-T-лимфоциты в дозе 5 млн клеток на мышь, что, вероятно, связано с изначальной инфузией большего количества клеток.

У мышей, получивших CAR-T, во все точки наблюдения детектировались CAR⁺-клетки (*рисунок 8*). Наиболее длительная персистенция (весь период наблюдения) отмечалась у мышей, получивших дозу 5 млн CAR-T на мышь.

По данным иммуногистохимического исследования, проведенного на 26-й день от введения опухолевых клеток, в тканях животных, получивших Mock-T-клетки, отмечалась выраженная инфильтрация человеческими CD3⁺ и CD5⁺ T-лимфоцитами. В то же время в группах мышей, получивших CAR-T-клетки, данная инфильтрация практически отсутствовала (*рисунок 9*).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Разработка новых подходов к терапии Т-линейных лейкозов, в частности в области клеточных технологий, на текущий момент остается актуальной задачей [20–22].

Учитывая успехи CAR-T-клеточной терапии в лечении пациентов с В-линейным острым лимфобластным лейкозом, большой интерес представляет ее использование в контексте Т-линейных лейкозов. Однако экспрессия опухолевыми клетками при Т-ОЛЛ большинства маркеров зрелых Т-лимфоцитов создает

Рисунок 6
Оценка цитотоксичности анти-CD5 CAR-T-лимфоцитов на +14-й день культивации: А – в отношении CD5-экспрессирующих линий Jurkat и Jeko-1 и клеточной линии K562 (отрицательный контроль); Б – в отношении клеточной линии Jurkat в различных соотношениях эффекторных клеток к таргетным (1:1 и 0,5:1); В – суммарные данные полученных значений AUC, рассчитанных как разница между AUC лунок Mock-T:Jurkat и CAR-T:Jurkat в соотношении 1:1
Данные представлены в виде индивидуальных значений с указанием медианы, разброса и статистической значимости

Figure 6
A – cytotoxicity assay of anti-CD5 CAR-T lymphocytes after coculture with CD5-expressing Jurkat and Jeko-1 cell lines and K562 cell line (negative control) on day +14 of cultivation; Б – cytotoxicity assay with the Jurkat cell line with different effector:target ratios (1:1 and 0.5:1) on day +14 of cultivation; B – the comprehensive data on the total area under the curve (AUC) values calculated as the difference between the AUC values for Mock-T:Jurkat and CAR-T:Jurkat wells at a 1:1 ratio
The data is shown as individual values with a median, range, and statistical significance

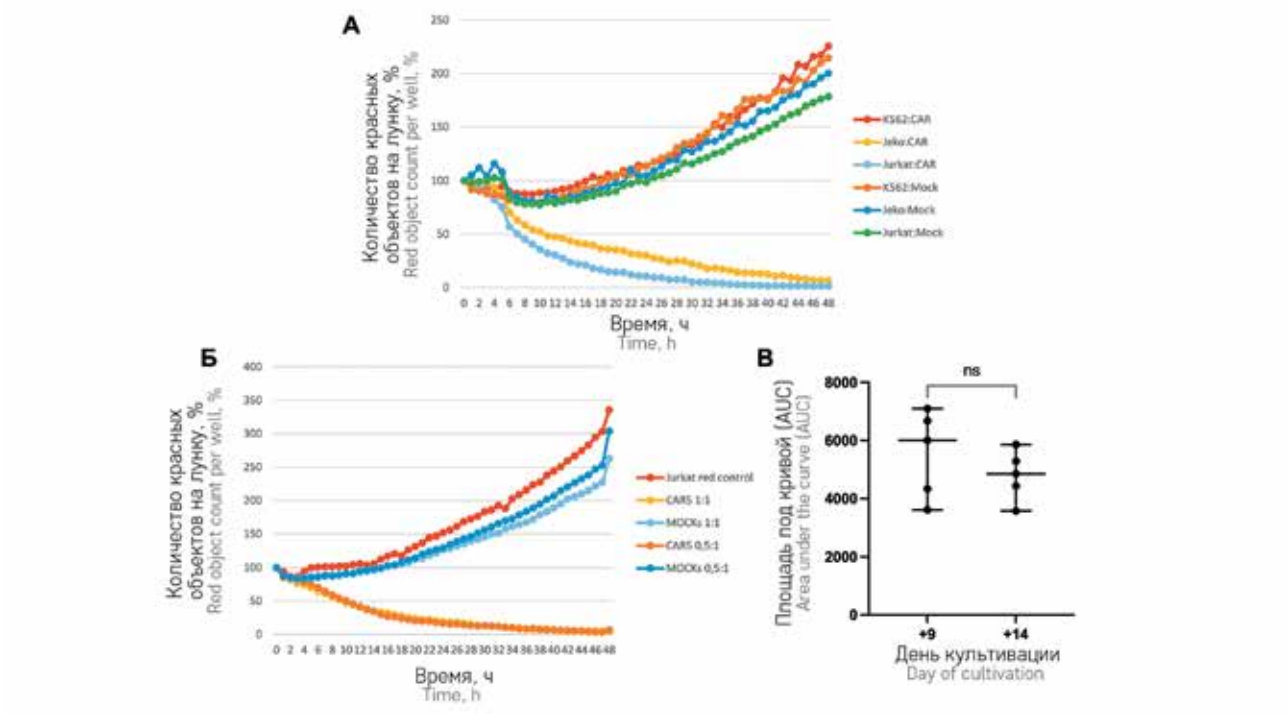


Таблица
Характеристика экспериментальных групп мышей

Table
Characteristics of the experimental cohorts of mice

Группа Group	Доза CAR⁺-клеток на мышь, ×10⁶ The dosage of CAR⁺ cells per mouse, ×10⁶	Общее количество CD3⁺-клеток на мышь, ×10⁶ Total CD3⁺ cell count per mouse, ×10⁶
Mock-T		5,5
CAR-T 1:1	2,5	2,7
CAR-T 2:1	5	5,5

Рисунок 7
А – визуализация опухоли посредством детекции люминесценции в 3 экспериментальных группах мышей (Mock-T, 2,5 × 10^6 и 5 × 10^6 CAR-T на мышь) в зависимости от времени введения опухолевых (Jurkat-ffluc) клеток. Звездочкой обозначены мыши, взятые для проведения гистологического исследования на 26-е сутки; Б – динамика изменения люминесценции в среднем по 3 группам; В – сравнительный анализ выживаемости мышей в соответствии с экспериментальной группой с указанием статистических различий

Figure 7
A – tumor burden assessment by luminescence detection in 3 experimental cohorts of mice (Mock T, 2.5 × 10^6 and 5 × 10^6 CAR-T per mouse) depending on the time post tumor cell (Jurkat-ffluc) infusion. The stars indicate the mice, taken for histological assessment on day 26; Б – the average changes in luminescence in three groups; B – a comparative survival analysis of the mice in accordance with the experimental group, the statistical significance is indicated

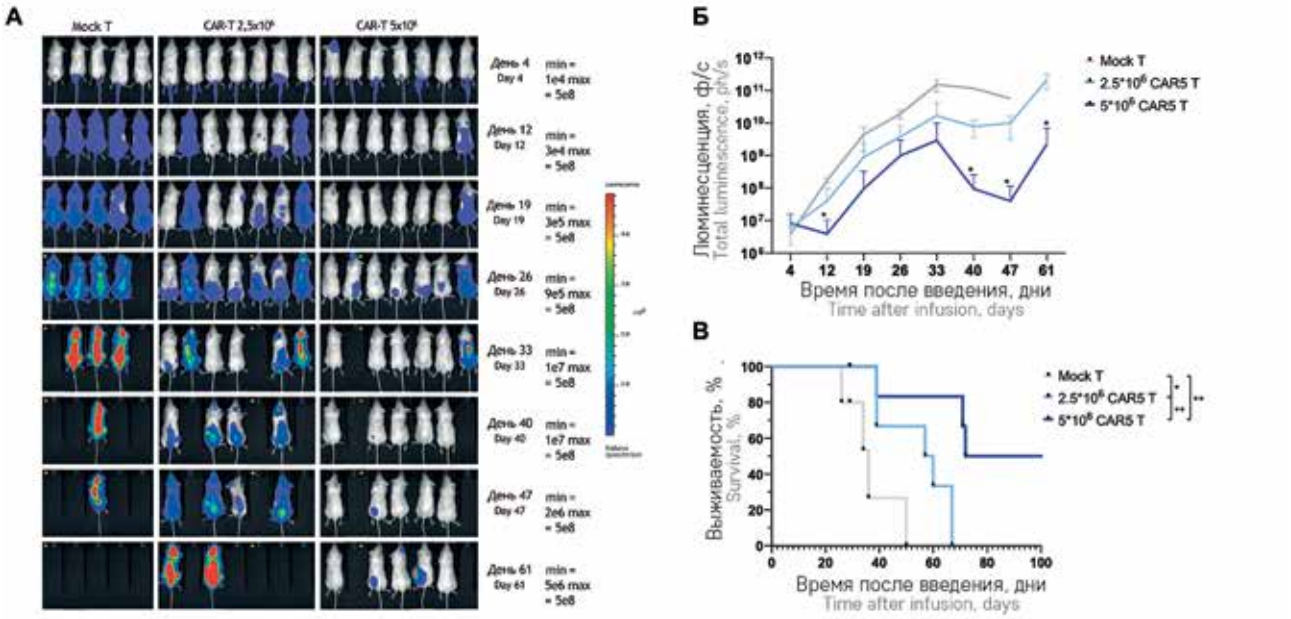
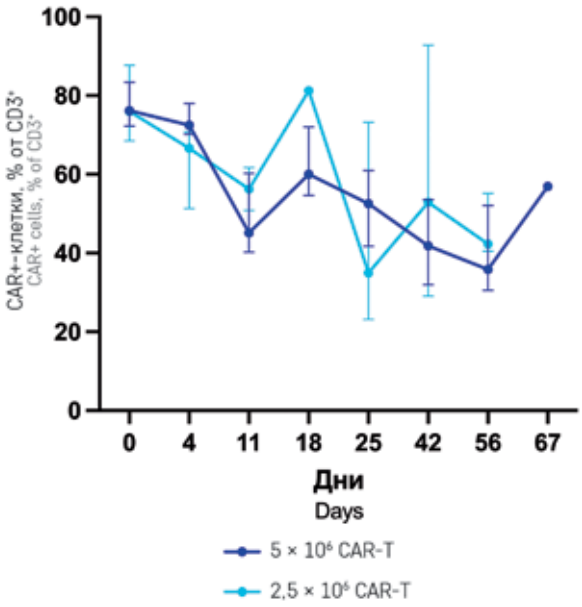


Рисунок 8
Персистенция CAR-экспрессирующих клеток в периферической крови мышей
День 0 – дата введения эффекторных клеток. Данные представлены в виде медианы с указанием разброса

Figure 8
Human CAR+ cell persistence in the peripheral blood of the mice
Day 0 – day of effector cell infusion. The data is shown as a median with a range



трудности в производстве CAR-T-лимфоцитов, в частности ввиду потенциального фратрицида в процессе производства [13].

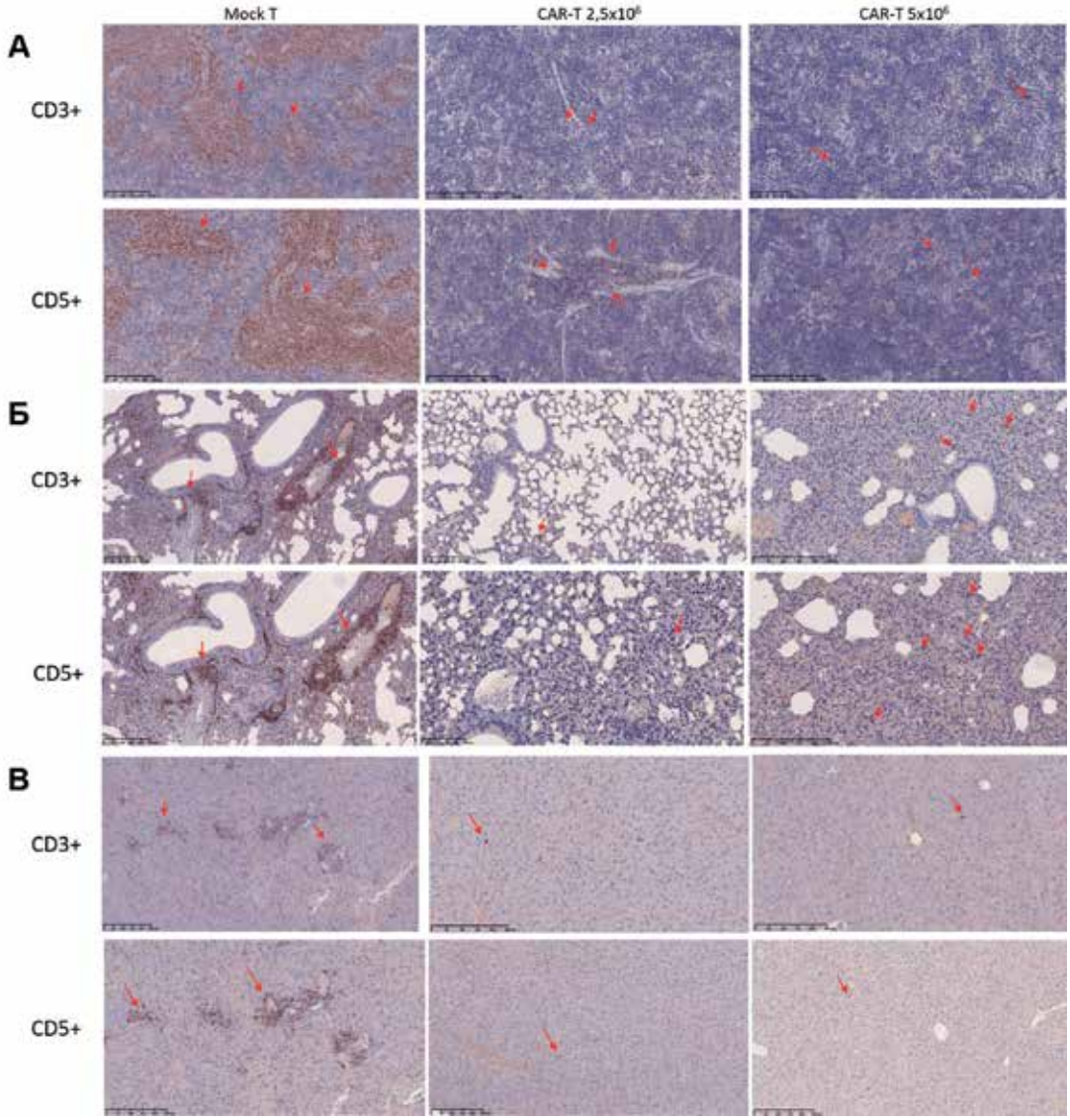
Данные литературы свидетельствуют о том, что экспрессия CAR к Т-клеточным маркерам способна приводить к интернализации соответствующих белков. Так, например, данный феномен описан при таргетировании широко экспрессируемых Т-лимфоцитами CD5 и CD7. Однако данный процесс не всегда может быть достаточным для обеспечения устойчивости к аутоагрессии [23, 24]. В случае с CD5 экспрессия CAR приводит к интернализации и полной деградации данного маркера, что создает условия для экспансии CAR-T-клеток в отсутствие выраженных эффектов фратрицида [24]. В связи с этим данный маркер является выгодной мишенью для таргетирования при разработке клеточной терапии для пациентов с Т-линейными лейкозами.

В настоящей работе была оптимизирована методика производства анти-CD5 CAR-T-лимфоцитов в условиях естественного снижения экспрессии поверхностного маркера CD5 трансдуцированными Т-клетками.

По данным литературы, период фратрицида CAR-T-лимфоцитами в случае снижения экспрессии CD5 не является длительным ввиду его быстрой интернализации [25]. Результаты

Рисунок 9
Иммуногистохимическое окрашивание тканей селезенки (А), легкого (Б) и печени (В) мышей на маркеры CD3 (верхний ряд) и CD5 (нижний ряд)
Стрелками обозначены участки инфильтрации $CD3^+$- и $CD5^+$-клетками

Figure 9
Immunohistochemical staining of the spleen (A), lung (Б), and liver (B) of the mice for CD3 (top row) and CD5 (bottom row) markers
The arrows indicate the sites of infiltration by $CD3^+$ and $CD5^+$ cells



нашего исследования также подтверждают данное наблюдение: во всех проведенных процессах производства наблюдались удовлетворительные показатели кратности экспансии со значительным приростом абсолютного количества Т-клеток к +14-му дню и выраженным снижением экспрессии CD5 к +7-му дню.

Эффективность элиминации опухолевых клеток CAR-T-лимфоцитами определяется способностью полученных клеток к пролиферации и персистенции *in vivo*, что напрямую зависит от их фенотипа. CAR-T-лимфоциты с фенотипом центральных Т-клеток памяти обладают более высоким пролиферативным потенциалом и могут обеспечивать более длительную персистенцию [26]. В случае генерации CAR-T-клеток в условиях фратрицида дополнительная активация Т-клеток в процессе производства приводит к формированию более истощенного фенотипа финального продукта [17, 25]. В соответствии с этим полученные нами данные демонстрируют преобладание популяции Tem ($CD197^-CD45RA^-$) во всех полученных продуктах. Однако оценка экспрессии таких маркеров истощения, как CD279 (PD-1), CD57 и TIGIT, демонстрирует значения, сравнимые с таковыми у CAR-T-лимфоцитов, полученных в отсутствие фратрицида [27].

Помимо эффекта аутоагрессии формирование более эффекторного фенотипа может зависеть от ко-стимулирующего домена, используемого в конструкте химерного рецептора. Так, например

М.А. Мамонкин и соавт. исследовали возможность производства анти-CD5 CAR-T-клеток с ко-стимулирующими доменами из суперсемейства TNFR. Использование данных доменов сопровождалось формированием CAR-T-клеточного продукта с более «молодым» фенотипом центральных клеток памяти. Однако эффекты аутоагрессии в связи с усилением ими экспрессии молекул клеточной адгезии ICAM-1 (Inter-Cellular Adhesion Molecule 1) значительно увеличивались, что было связано с более активным формированием иммунологических синапсов. Использование ко-стимулирующего домена CD28 в данном исследовании приводило к формированию более эффекторного фенотипа, но при этом снижало эффекты аутоагрессии, позволяя получить клеточный продукт с удовлетворительными показателями кратности экспансии и функциональными свойствами, что также подтверждается результатами нашего исследования [25].

При исследовании функциональной активности полученных CAR-T-лимфоцитов были отмечены высокие значения дегрануляции и синтеза таких цитокинов, как фактор некроза опухоли и интерферон-γ. Оценка цитотоксичности также демонстрировала успешную элиминацию CD5-экспрессирующих клеточных линий Jurkat и Jeko-1.

Нами было проведено исследование элиминации $CD5^+$ Т-линейного лейкоза на мышиной модели. Введение 2,5 млн опухолевых клеток приводило к визуализации опухолевых клеток посредством детекции люминесценции у всех экспериментальных мышей. Последующая терапия мышей анти-CD5 CAR-T-лимфоцитами демонстрировала их способность элиминировать опухолевые клетки и способствовала лучшей выживаемости лабораторных животных.

При исследовании доз CAR-T-клеток в объеме 2,5 и 5 млн на мышь, бóльшая доза демонстрировала лучшие показатели сдерживания опухолевого роста и общей выживаемости. В данной группе также наблюдалась длительная персистенция человеческих CAR-T-клеток. При проведении иммуногистохимического исследования тканей животных наблюдалась более выраженная инфильтрация $CD3^+$- и $CD5^+$-клетками в контрольной группе. Сопоставление этих данных с результатами детекции люминесценции позволяет предположить опухолевую природу данной инфильтрации. Таким образом, полученные данные свидетельствуют об эффективности проводимой терапии и демонстрируют длительную персистенцию CAR-T-клеток, несмотря на их более эффекторный фенотип.

В целях определения оптимальной длительности процесса производства все полученные клеточные продукты были оценены на +9-й и +14-й дни. Более длительная культивация CAR-T-клеток приводила к значимому увеличению кратности экспансии, доля CAR-экспрессирующих клеток при этом не сокращалась, полученные показатели VCN были сопоставимы с данными литературы [18]. Фенотип Т-лимфоцитов отмечался более выраженным преобладанием популяции Tem без увеличения уровней экспрессии маркеров истощения и без потери функциональной активности в отношении клеточной линии Jurkat. Исследование более длительного протокола производства на мышиной модели также показало достаточно длительную персистенцию CAR-T-клеток. Таким образом, при разработке клинического протокола производства может быть использована как 9-, так и 14-дневная длительность культивации без значимого влияния на качество конечного клеточного продукта. Количественные показатели при этом будут определяться условиями клинического протокола.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анти-CD5 CAR-T-лимфоциты представляют собой перспективный подход в терапии пациентов с Т-ОЛЛ, сопровождающимися экспрессией маркера CD5. В настоящем исследовании нами был разработан и оптимизирован лабораторный протокол производства анти-CD5 CAR-T-лимфоцитов, показана их эффективность как *in vitro*, так и *in vivo* на мышиной модели. Полученные данные могут быть использованы для последующей разработки клинического протокола производства БМКП.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено в рамках государственного задания, регистрационный номер НИОКТР 1023022700111-4 «Разработка высокотехнологического лекарственного препарата для лечения острых Т-лимфобластных лейкозов у детей на основе технологии CAR-T и CAR-NK», работа Волкова Д.В. проведена при поддержке гранта Российского научного фонда №25-74-30002.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ORCID

Musaeva E.Ya. ORCID: https://orcid.org/0000-0003-0581-9472
Malakhova E.A. ORCID: https://orcid.org/0000-0002-7334-0706
Vedmedskaia V.A. ORCID: https://orcid.org/0000-0001-7247-4844
Dudorova A.A. ORCID: https://orcid.org/0000-0001-9444-4689
Osipova D.S. ORCID: https://orcid.org/0000-0002-9968-9332
Volkov D.V. ORCID: https://orcid.org/0000-0002-1800-999X
Chernov A.S. ORCID: https://orcid.org/0000-0001-5371-1656
Fedorova A.S. ORCID: https://orcid.org/0000-0002-4699-1730
Fadeeva M.S. ORCID: https://orcid.org/0000-0002-6553-2505
Lodoeva O.B. ORCID: https://orcid.org/0000-0002-2874-0014
Kulakovskaya E.A. ORCID: https://orcid.org/0000-0002-9639-2779
Sozonova T.A. ORCID: https://orcid.org/0009-0004-0057-2727
Stepanov A.V. ORCID: https://orcid.org/0000-0003-1616-4408
Pershin D.E. ORCID: https://orcid.org/0000-0002-6148-7209
Maschan M.A. ORCID: https://orcid.org/0000-0003-1735-0093

Литература / References

1. Шарапова Г.Р., Румянцева Ю.В., Бойченко Э.Г., Лагойко С.Н., Быданов О.И., Алейникова О.В. и др. Терапия Т-клеточного острого лимфобластного лейкоза у детей: опыт российско-белорусской кооперированной группы. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2015; 14 (1): 26–37. DOI: 10.24287/1726-1708-2015-14-1-26-37 [Sharapova G.R., Rumyantseva Yu.V., Boichenko E.G., Lagoiko S.N., Bydanov O.I., Aleinikova O.V., et al. Therapy of childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia: Experience gained by the Russian-Byelorussian cooperative group. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology 2015; 14 (1): 26–37. (In Russ.)].
2. Климентова М.А., Шелихова Л.Н., Илюшина М.А., Благов С.Л., Перминова М.Е., Попов А.М., и др. Результаты применения венетоклакса, даратумумаба и плериксафора в составе кондиционирования при химиорефрактерных формах острых лейкозов у детей. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2023; 22 (3): 14–27. DOI: 10.24287/1726-1708-2023-22-3-14-27 [Klimentova M.A., Shelikhova L.N., Ilushina M.A., Blagov S.L., Perminova M.E., Popov A.M., et al. The results of therapy with venetoclax, daratumumab and plerixafor as part of the conditioning regimen in chemotherapy-refractory acute leukemia in children. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology 2023; 22 (3): 14–27. (In Russ.)].
3. Dunsmore K.P., Winter S.S., Devidas M., Wood B.L., Esiashvili N., Chen Z., et al. Children's Oncology Group AALL0434: A Phase III Randomized Clinical Trial Testing Nelarabine in Newly Diagnosed T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. JCO 2020; 38: 3282–93. DOI: 10.1200/JCO.20.00256
4. Дьяконова Ю.Ю., Мякова Н.В., Литвинов Д.В., Шелихова Л.Н., Масчан М.А., Абугова Ю.Г. и др. Первые результаты исследования терапии рецидивов высокой группы риска у детей по пилотному протоколу ALL-REZ-2016. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2019; 18 (1): 12–21. DOI: 10.24287/1726-1708-2019-18-1-12-21 [Dyakonova Yu.Yu., Myakova N.V., Litvinov D.V., Shelikhova L.N., Maschan M.A., Abugova Yu.G., et al. First results of pilot protocol ALl-REZ-2016 for children with high risk groups of relapsed acute lymphoblastic leukemia. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology 2019; 18 (1):12–21. (In Russ.)].
5. Дьяконова Ю.Ю., Быданов О.И., Попов А.М., Ольшанская Ю.В., Бойченко Э.Г., Алейникова О.В. и др. Роль неларабина в лечении Т-клеточной острой лимфобластной-лейкемии: обзор литературы и результаты собственных исследований. Терапевтический архив 2018; 90: 37–50. DOI: 10.26442/terarkh201890738-50. [Dyakonova Yu.Yu., Bydanov O.I., Popov A.M., Olshanskaya Yu.V., Boichenko E.G., Aleynikova O.V., et al. The role of nelarabine in the treatment of T-cell acute lymphoblastic leukemia: literature review and own experience. Therapeutic Archive 2018; 90: 37–50. (In Russ.)].
6. Shah N.N., Lee D.W., Yates B., Yuan C.M., Shalabi H., Martin S., et al. Long-term follow-up of CD19-CAR T-cell therapy in children and young adults With B-ALL. J Clin Oncol 2021; 39 (15): 1650–9. DOI: 10.1200/JCO.20.02262
7. Молостова О.О., Шелихова Л.Н., Першин Д.Е., Попов А.М., Дубровина М.Е., Климентова М.А. и др. ЦНС-рецидив В-лимфобластной лимфомы после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток: терапия донорскими CD19-специфичными CAR-T-лимфоцитами. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2021; 20: 143–7. DOI: 10.24287/1726-1708-2021-20-2-143-147 [Molostova O.O., Shelikhova L.N., Pershin D.E., Popov A.M., Dubrovina M.E., Klimentova M.A., et al. CNS relapse of B-lymphoblastic lymphoma after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: therapy with donor CD19-specific CAR-T cells. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology 2021; 20: 143–7. (In Russ.)].
8. Литвинов Д.В., Тесаков И.П., Шелихова Л.Н., Хачатрян Л.А., Зеркаленкова Е.А., Ольшанская Ю.В. и др. Острый лимфобластный лейкоз с транслокацией t(17;19): надежда появилась! Описание случая мультимодальной иммунотерапии у ребенка 3 лет с рефрактерным течением заболевания. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2022; 21 (3): 100–114. DOI: 10.24287/1726-1708-2022-21-3-100-114 [Litvinov D.V., Tesakov I.P., Shelikhova L.N., Khachatryan L.A., Zerkalenkova E.A., Olshanskaya Yu.V., et al. Acute lymphoblastic leukemia with the t(17;19) translocation: hope has appeared! Multimodal immunotherapy in a 3-year-old child with refractory disease: a case report. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology 2022; 21 (3): 100–114. (In Russ.)].
9. Schultz L.M., Jeyakumar N., Kramer A.M., Sahaf B., Srinagesh H., Shiraz P., et al. CD22 CAR T cells demonstrate high response rates and safety in pediatric and adult B-ALL: Phase 1b results. Leukemia 2024; 38: 963–8. DOI: 10.1038/s41375-024-02220-y
10. 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: 7200. DOI: 10.1038/s41467-021-27312-6
11. Semchenkova A., Mikhailova E., Demina I., Roumiantseva J., Karachunskiy A., Novichkova G., et al. Analysis of antigen expression in T-cell acute lymphoblastic leukemia by multicolor flow cytometry: implications for the detection of measurable residual disease. IJMS 2025; 26: 2002. DOI: 10.3390/ijms26052002
12. Burgueño-Bucio E., Mier-Aguilar C.A., Soldevila G. The multiple faces of

CD5. J Leuk Biol 2019; 105: 891–904. DOI: 10.1002/JLB.MR0618-226R
13. Lamble A.J., Gardner R. CAR T cells for other pediatric non–B-cell hematologic malignancies. Hematology 2020; 2020: 494–500. DOI: 10.1182/hematology.2020000134
14. Dai Z., Mu W., Zhao Y., Jia X., Liu J., Wei Q., et al. The rational development of CD5-targeting biepitopic CARs with fully human heavy-chain-only antigen recognition domains. Mol Ther 2021; 29: 2707–22. DOI: 10.1016/j.ymthe.2021.07.001
15. Raikar S.S., Fleischer L.C., Moot R., Fedanov A., Paik N.Y., Knight K.A., et al. Development of chimeric antigen receptors targeting T-cell malignancies using two structurally different anti-CD5 antigen binding domains in NK and CRISPR-edited T cell lines. Oncoimmunology 2018; 7: e1407898. DOI: 10.1080/2162402X.2017.1407898
16. Hill L.C., Rouce R.H., Smith T.S., Boriskie B., Srinivasan M., Thakkar S.G., et al. Enhanced anti-tumor activity of CD5 CAR T cells manufactured with tyrosine kinase inhibitors in patients with relapsed/refractory T-ALL. JCO 2023; 41: 7002. DOI: 10.1200/JCO.2023.41.16_suppl.7002
17. Mamonkin M., Rouce R.H., Tashiro H., Brenner M.K. A T-cell–directed chimeric antigen receptor for the selective treatment of T-cell malignancies. Blood 2015; 126: 983–92. DOI: 10.1182/blood-2015-02-629527
18. Hill L.C., Rouce R.H., Wu M.J., Wang T., Ma R., Zhang H., et al. Antitumor efficacy and safety of unedited autologous CD5.CAR T cells in relapsed/refractory mature T-cell lymphomas. Blood 2024; 143: 1231–41. DOI: 10.1182/blood.2023022204
19. Kernan N.A., Knowles R.W., Burns M.J., Broxmeyer H.E., Lu L., Lee H.M., et al. Specific inhibition of *in vitro* lymphocyte transformation by an anti-pan T cell (gp67) ricin A chain immunotoxin. J Immunol 1984; 133: 137–46. DOI: 10.4049/jimmunol.133.1.137
20. Huang Y., Wan C.-L., Dai H., Xue S. Targeted therapy and immunotherapy for T cell acute lymphoblastic leukemia/lymphoma. Ann Hematol 2023; 102: 2001–13. DOI: 10.1007/s00277-023-05286-3
21. Wei W., Yang D., Chen X., Liang D., Zou L., Zhao X. Chimeric antigen receptor T-cell therapy for T-ALL and AML. Front Oncol 2022; 12: 967754. DOI: 10.3389/fonc.2022.967754
22. Ma J.-F., Yan C.-L., Jia X., Zhu H.-J., Yan J.-W., Liu M.-J., et al. Clinical outcomes and safety of CAR-T cells in treatment of T-Cell acute lymphoblastic leukemia/lymphoma. Ann Hematol 2024. doi: 10.1007/s00277-024-06132-w
23. Cooper M.L., Choi J., Staser K., Ritchey J.K., Devenport J.M., Eckardt K., et al. An “off-the-shelf” fratricide-resistant CAR-T for the treatment of T cell hematologic malignancies. Leukemia 2018; 32: 1970–83. DOI: 10.1038/s41375-018-0065-5
24. Ma R., Woods M., Burkhardt P., Crooks N., Van Leeuwen D.G., Shmidt D., et al. Chimeric antigen receptor-induced antigen loss protects CD5.CART cells from fratricide without compromising on-target cytotoxicity. Cell Rep Med 2024; 5: 101628. DOI: 10.1016/j.xcrm.2024.101628
25. Mamonkin M., Mukherjee M., Srinivasan M., Sharma S., Gomes-Silva D., Mo F., et al. Reversible transgene expression reduces fratricide and permits 4-1BB costimulation of CAR T cells directed to t-cell malignancies. Cancer Immunol Res 2018; 6: 47–58. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-17-0126
26. López-Cantillo G., Urueña C., Camacho B.A., Ramírez-Segura C. CAR-T cell performance: how to improve their persistence? Front Immunol 2022; 13: 878209. DOI: 10.3389/fimmu.2022.878209
27. 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; 26: 567–78. DOI: 10.1016/j.jcyt.2024.02.025

DOI: 10.24287/1726-1708-2025-24-2-27-37

Опыт разработки и масштабирования протокола производства клеточного продукта, обогащенного НК-лимфоцитами, для клинического применения

Е.А. Кулаковская, В.Е. Бельчиков, В.А. Ведмедская, М.С. Фадеева, Е.А. Малахова, Э.Я. Мусаева, О.Б. Лодоева, С.С. Ларин, М.И. Лукашина, А.В. Кибардин, М.Д. Моллаев, Я.О. Музалевский, А.С. Казаченок, А.К. Мелькова, Т.Ю. Завидный, П.Е. Трахтман, Л.Н. Шелихова, Д.Е. Першин, М.А. Масчан

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

© 2025 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России

Поступила 11.05.2025
Принята к печати 02.06.2025

EDN: CXKFLR

Применение НК-клеток является перспективным направлением клеточной терапии при гемобластозах. Разработка протокола экспансии обогащенного НК-лимфоцитами биомедицинского клеточного продукта – актуальная задача клинической биотехнологии. На основе массива научных и клинических исследований нами был выбран протокол экспансии НК-лимфоцитов с использованием модифицированной фидерной линии K562 и стартовой фракции мононуклеаров периферической крови, не включающий этап деплеции $CD3^+$-лимфоцитов. В данной работе представлены результаты валидационных процессов производства обогащенного НК-лимфоцитами биомедицинского клеточного продукта. Исследование одобрено независимым этическим комитетом и утверждено решением ученого совета НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева. Полученные клеточные продукты удовлетворяли всем заявленным критериям контроля качества, имели высокий процент содержания НК-лимфоцитов и демонстрировали выраженную цитотоксическую активность в отношении клеточных линий THP-1 и Jeko-1. Показатели кратности экспансии позволили достичь целевой клинической дозы во всех процессах. Уровень экспрессии поверхностных маркеров НК-клеток после экспансии соответствовал активированному и высокопролиферативному фенотипу. Остаточные лимфоциты были представлены в основном Т-клетками с эффекторным фенотипом и достоверным снижением процентного содержания TCRαβ относительно стартовой фракции. Полученные данные дают основание для проведения клинического исследования выполнимости и безопасности применения инфузий клеточного продукта, произведенного согласно данному протоколу, в терапии рефрактерного лейкоза у детей.

Ключевые слова: *острый рефрактерный лейкоз, НК-клетки, трансплантация гемопоэтических стволовых клеток, иммунотерапия, фидерная линия*

Кулаковская Е.А. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2025; 24 (2): 27–37. DOI: 10.24287/1726-1708-2025-24-2-27-37

Контактная информация:
Кулаковская Елена Алексеевна,
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: elena.kulakovskaya@dgoi.ru

Experience in developing and scaling a protocol for NK lymphocyte enriched cellular product manufacturing for clinical application

E.A. Kulakovskaya, V.E. Belchikov, V.A. Vedmedskaia, M.S. Fadeeva, E.A. Malakhova, E.Ya. Musaeva, O.B. Lodoeva, S.S. Larin, M.I. Lukashina, A.V. Kibardin, M.D. Mollaev, Ya.O. Muzalevskii, A.S. Kazachenok, A.K. Melkova, T.Yu. Zavidnyi, P.E. Trakhtman, L.N. Shelikhova, D.E. Pershin, 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

© 2025 by «D. Rogachev NMRCPHOI»

Received 11.05.2025
Accepted 02.06.2025

NK cell-based therapy is a promising area for hematological malignancies treatment. The development of an expansion protocol for NK lymphocyte-enriched biomedical cell product is a pressing issue in clinical biotechnology. Based on numerous scientific and clinical studies, we have settled on the NK lymphocyte expansion protocol with a modified feeder line K562 and peripheral blood mononuclear cells as a starting fraction, not including $CD3^+$ lymphocyte depletion step. In this paper, we present the results of a validation process of NK lymphocyte-enriched biomedical cell product manufacturing. 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 the Russian Federation. The resulting cell products met all stated quality control criteria, contained a high percentage of NK cells, and demonstrated strong cytotoxic activity against the THP-1 and Jeko-I cell lines. Expansion folds allowed us to achieve the desired clinical dosage in all processes. The surface marker expression profile of the expanded NK cells corresponded to an activated and highly proliferative phenotype. The residual lymphocytes were represented mainly by T cells with an effector phenotype, and a significant decrease in TCRαβ percentage was observed compared to the initial fraction. These data provide the basis for a clinical study of the feasibility and safety of the infusions of the cellular products produced according to this protocol for pediatric refractory leukemia treatment.

Key words: *acute refractory leukemia, NK cells, hematopoietic stem cell transplantation, immunotherapy, feeder cell line*

Kulakovskaya E.A., et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology 2025; 24 (2): 27–37.
DOI: 10.24287/1726-1708-2025-24-2-27-37

Correspondence:
Elena A. Kulakovskaya,
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: elena.kulakovskaya@dgoi.ru

В общей структуре заболеваемости злокачественными новообразованиями пациентов в возрасте до 18 лет более трети составляют острые лейкозы. Однако, несмотря на существенное усовершенствование тактики диагностики и лечения, у 20% детей с острыми лимфобластными лейкозами (ОЛЛ) и у 40% детей с острыми миелоидными лейкозами (ОМЛ) различные комбинации режимов полихимиотерапии не приводят к стойкой ремиссии, а возможности интенсификации цитотоксической терапии исчерпаны [1].

Использование аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК) позволяет улучшить прогноз почти у половины пациентов с резистентными и рецидивирующими формами острого лейкоза [1–4]. Тем не менее остается когорта, в которой, несмотря на проведенную терапию, новый рецидив или посттрансплантационные осложнения приводят к смерти пациента [5, 6].

Применение инновационных типов гуморальной и клеточной иммунотерапии [7–12] в комбинации с алло-ТГСК дает дополнительный шанс пациентам с рефрактерным течением острого лейкоза, решая целый ряд задач: снижение токсичности как непосредственно противоопухолевой терапии, так и режима предтрансплантационного кондиционирования; снижение риска посттрансплантационных осложнений; эффективная элиминация резистентных к другим видам терапии бластов. Значительным преимуществом НК-клеточной терапии в данном контексте является отсутствие выраженной аллореактивности в отношении здоровых негемопоэтических тканей, что позволяет получать выраженный противолейкемический эффект без увеличения риска реакции «трансплантат против хозяина». Кроме того, НК-лимфоциты обладают естественной противоопухолевой активностью, которая реализуется по антиген-независимому пути, и таким образом делает их универсальными эффекторами по отношению к бластным клеткам, нередко проявляющим фенотипическую пластичность [13–16]. В ряде клинических исследований было показано, что более высокие дозы НК-клеток, поступивших с трансплантатом, а также более ранняя посттрансплантационная реконституция НК-лимфоцитов ассоциированы с более низким риском рецидива и улучшением выживаемости после алло-ТГСК [17–20], что подтверждает важность оптимизации как количественных, так и функциональных характеристик НК-клеток для улучшения клинических исходов трансплантации.

Существует 2 основные стратегии получения дополнительных терапевтических доз НК лимфоцитов: 1) последовательная магнитная селекция большого количества $CD56^+CD3^-$-клеток из продукта лейкофереза [21, 22]; 2) *ex vivo* экспансия НК-лимфоцитов с использованием различных активирующих агентов [23].

Несмотря на ряд преимуществ магнитной селекции, таких как скорость получения финального продукта и минимальный риск контаминации за счет отсутствия этапа культивации, сегодня все чаще предпочтение отдается именно *ex vivo* экспансии, поскольку результаты множества научных и клинических исследований подтверждают более выраженный противолейкемический и противовирусный эффекты НК-клеток, прошедших дополнительный этап активации и экспансии [24–29].

Стратегия выбора протокола экспансии построена на оценке взаимодействия 3 групп факторов: 1) источник НК-лимфоцитов; 2) тип активирующего агента; 3) использование магнитной сепарации на одном из этапов процесса.

Для экспансии НК-клеток может быть использована периферическая кровь здорового донора гемопоэтических стволовых клеток, позволяющая получить достаточное для старта процесса количество НК-клеток из сравнительно небольшого объема. В некоторых клинических протоколах источником высокопролиферативных НК-клеток служит пуповинная кровь, однако ее использование ограничено доступностью биоматериала и сложностью использования в контексте алло-ТГСК, включая обязательный этап $CD3^+$-деплеции в связи с риском Т-клеточной аллореактивности по отношению к донору и трансплантату.

Исходя из состава и абсолютного количества клеток в стартовой фракции могут быть использованы более безопасные, но дающие меньшую экспансию неклеточные активирующие агенты (различные комбинации цитокинов, конъюгированные с антителами синтетические частицы [30–32]) или же многократно увеличивающие выход НК-лимфоцитов фидерные клеточные линии, которые в то же время требуют тщательного контроля качества финального продукта [33].

В рамках модификации клеточного состава возможны различные степени вмешательства: 1) экспансия чистой фракции $CD3^-CD56^+$-лимфоцитов (минимизирует риск примеси аллореактивных Т-лимфоцитов в финальном продукте при более низкой эффективности экспансии НК-клеток); 2) использование нативной фракции мононуклеаров, в которой поддерживающее микроокружение способствует НК-клеточной пролиферации, однако даже в случае частичной совместимости донора может потребоваться этап удаления из продукта остаточных Т-клеток.

Несмотря на значительный терапевтический потенциал, на сегодняшний день в России не зарегистрированы клинические исследования применения НК-лимфоцитов после экспансии в качестве профи-

лактики рецидива острого рефрактерного лейкоза после алло-ТГСК.

Целью настоящего исследования стали разработка и валидация протокола получения обогащенного НК-лимфоцитами биомедицинского клеточного продукта (НК БМКП), а также детальный анализ его фенотипических и функциональных свойств.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

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

Клеточные продукты

В работе представлены характеристики НК БМКП (n = 7), полученных путем экспансии из материала 7 здоровых взрослых доноров в период с октября 2023 г. по март 2024 г. в НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева.

Общая схема процесса получения клеточного продукта, обогащенного НК-лимфоцитами

В качестве основы был использован протокол, опубликованный N. Lapteva и соавт. (2012) [34]. Источником НК-клеток для экспансии служили мононуклеары здоровых доноров, выделенные из периферической крови методом центрифугирования в градиенте плотности. Для получения НК БМКП к мононуклеарам добавляли фидерную линию K562 и культивировали в течение 14 дней в питательной среде, содержащей интерлейкин (IL)-2.

Источник клеток и параметры культивации

Все этапы процесса, включающие выделение мононуклеаров, культивирование, а также финальную валидацию и заготовку клеточного продукта, были проведены в соответствии с правилами надлежащей производственной практики в условиях чистых помещений.

Для выделения стартовой фракции мононуклеаров были использованы пробирки BD Vacutainer CPT (Becton Dickinson, США) согласно инструкции производителя.

Затем с помощью проточной цитометрии оценивали концентрацию субпопуляций лимфоцитов в полученном образце мононуклеаров (см. раздел «Оценка состава клеточных продуктов») и, исходя из полученных значений, рассчитывали объем стартовой фракции, содержащий 4,0E+06 НК-клеток. К этому объему добавляли 40,0E+06 клеток заранее заготовленной фидерной культуры (см. раздел «Клеточные линии»).

Культивацию проводили в одноразовом биореакторе G-Rex100M (Wilson Wolf Manufacturing, США), рассчитанном на максимальный объем 1000 мл. В качестве питательной среды использовали NK MACS GMP Medium (Miltenyi Biotec, Германия) с добавлением 10% человеческого тромболизата (см. раздел «Изготовление лизата человеческих тромбоцитов») и рекомбинантного человеческого IL-2 (Miltenyi Biotec, Германия) в концентрации 10 Ед/мл.

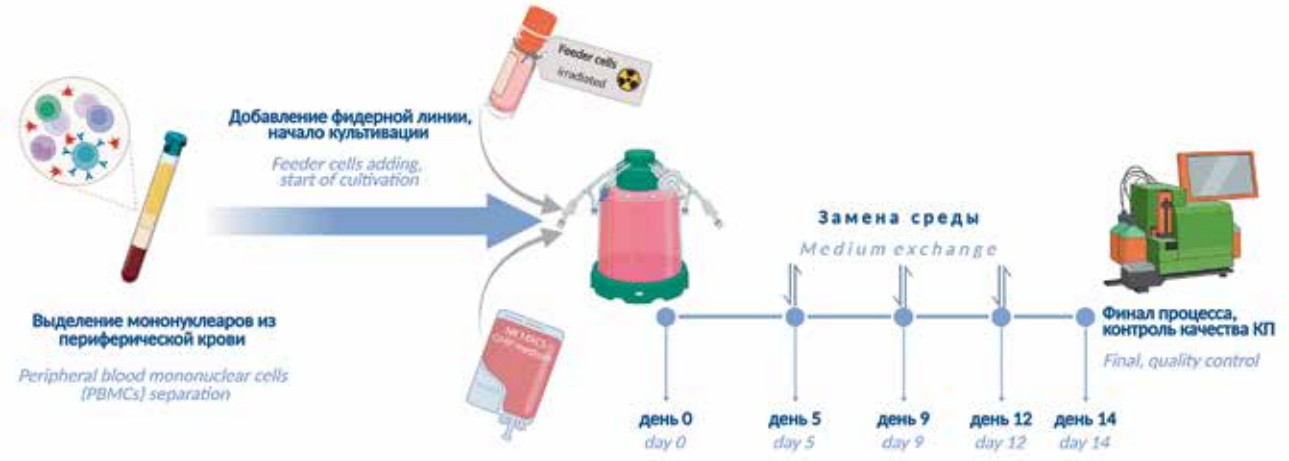
Стартовый объем среды для культивации составлял 500 мл, на 5-й день добавляли еще 500 мл, а на 9-й и 12-й дни производили замену половины культивационного объема. Детальная схема процесса приведена на *рисунке 1*.

Клеточные линии

Суспензионные клеточные линии миелоидной лейкемии THP-1 (TIB-202, ATCC, США) и В-лимфоидных бластов Jeko-1 (CRL-3006, ATCC, США)

Рисунок 1
Схема процесса экспансии НК БМКП
На рисунке отражены основные этапы производства и контроля качества клеточного продукта

Figure 1
Scheme of the NK cell product expansion process
The main steps of the NK cell product manufacturing and quality control are shown



были получены от производителя в виде замороженных аликвот, хранящихся в жидком азоте, и после разморозки культивировались в среде RPMI-1640 (Capricorn Scientific, Германия) с добавлением эмбриональной телячьей сыворотки (Cytiva, HyClone, США; регион происхождения Северная Америка). Обе линии были модифицированы в целях стабильной экспрессии красного флуоресцентного белка mKate путем лентивирусной трансдукции коммерческим реагентом NucLight Red (EF1a, Puro, Essen BioScience, Германия) с последующей селекцией на пуромицине (ThermoFisher Scientific, США).

Фидерная линия была предоставлена коллегами из лаборатории молекулярной иммунологии под руководством С.С. Ларина (НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева). В качестве фидера была использована клеточная линия K562, стабильно экспрессирующая зеленый флуоресцентный белок (green fluorescent protein, GFP) и мембранные формы IL-21, CD137-лиганда (41BB) и комплекса IL-15/IL-15Rα. Перед биобанкированием было проведено γ-облучение клеток фидера суммарной дозой 100 Гр на приборе Gammacell 3000 Elan (Best Theratronics, США).

Изготовление лизата человеческих тромбоцитов

Концентраты тромбоцитов (КТ) были получены от здоровых доноров-добровольцев, прошедших обследование и подписавших информированное согласие на проведение процедуры автоматического афереза с лейкоредукцией (Terumo BCT, США, версия 7.0). После стандартной обработки было проведено пулирование полученных КТ (объединение равных объемов КТ от 10 разных доноров в целях нивелирования индивидуальных особенностей). На финальном этапе проводили несколько циклов замораживания/размораживания полученного пула с последующим центрифугированием для получения очищенного от дебриса лизата, к которому затем добавляли гепарин в концентрации 15 Ед/мл (ФГУП «Московский эндокринный завод», Россия). После проведения микробиологического контроля полученный продукт в течение года хранился при температуре –80°С до востребования.

Контроль качества клеточного продукта

Контроль качества включал в себя оценку субпопуляционного состава (дни 0, 9, 12 и 14), а также тесты на микробиологическую безопасность (дни 0 и 14) и контроль присутствия остаточного фидера (день 14).

Продукт признавался микробиологически безопасным при отсутствии микоплазмы (выявление методом полимеразной цепной реакции с помощью набора Евроген, Myco Real-Time, Россия), эндотоксина (Endosafe, LAL test, США) и отрицательном результате теста на рост микроорганизмов (BD BACTEC, США).

Заключение об отсутствии в финальном продукте остаточного фидера делалось по результатам детекции методом проточной цитометрии. Исходя из данных литературы и параметров чувствительности используемых приборов, нами было установлено пороговое значение не более 0,5% GFP-положительных событий от 1,0E+06 событий из региона живых (7AAD-) клеток.

Оценка состава клеточного продукта

Определение концентрации клеток в продукте проводили волюметрическим методом на проточном цитометре MACSQuant (Miltenyi Biotec, Германия). Развернутый субпопуляционный состав клеточного продукта оценивали на проточном цитометре CytoFlex (Beckman Coulter, США) с использованием многоцветных панелей коммерческих моноклональных антител (*таблица 1*). Анализ цитометрических данных проводили в программе CytExpert, версия 2.3.0.84 (Beckman Coulter, США).

Оценка функциональной активности клеточного продукта, обогащенного НК-лимфоцитами

Полученный на 14-й день клеточный продукт соединяли с экспрессирующими красный флуоресцентный белок клеточными линиями THP-1 и Jeko-1 в соотношении НК:THP-1/Jeko-1 как 1:1 и 5:1, и проводили съемку на приборе IncuCyte S3 (Sartorius AG, Германия). Изображения регистрировали каждый час в течение 3 сут, а затем проводили их анализ с помощью программного обеспечения IncuCyte Software (v2019B) (Sartorius AG, Германия). Репрезентативные примеры исходного изображения и результаты его анализа представлены на *рисунке 2*. Количество красных объектов с течением времени отражает пролиферативную активность опухолевой линии, соответственно, НК БМКП считали функционально состоятельным, если он был способен подавлять пролиферацию бластов относительно контроля. Интегральным показателем пролиферации считали площадь под кривой (area under the curve, AUC) в координатах времени и количества красных объектов на лунку. Данные нормализованы к начальному значению красных объектов на лунку, принятому за 100%.

Статистический анализ и обработка данных

Обработка и статистический анализ данных проводились в программе GraphPad Prism 8.0.1 (GraphPad Software, США). Для статистического анализа были использованы критерии Манна–Уитни, Уилкоксона и коэффициент корреляции Спирмена. Уровень статистической значимости описывался как * и ** для значений $p < 0,05$ и $p < 0,01$ соответственно.

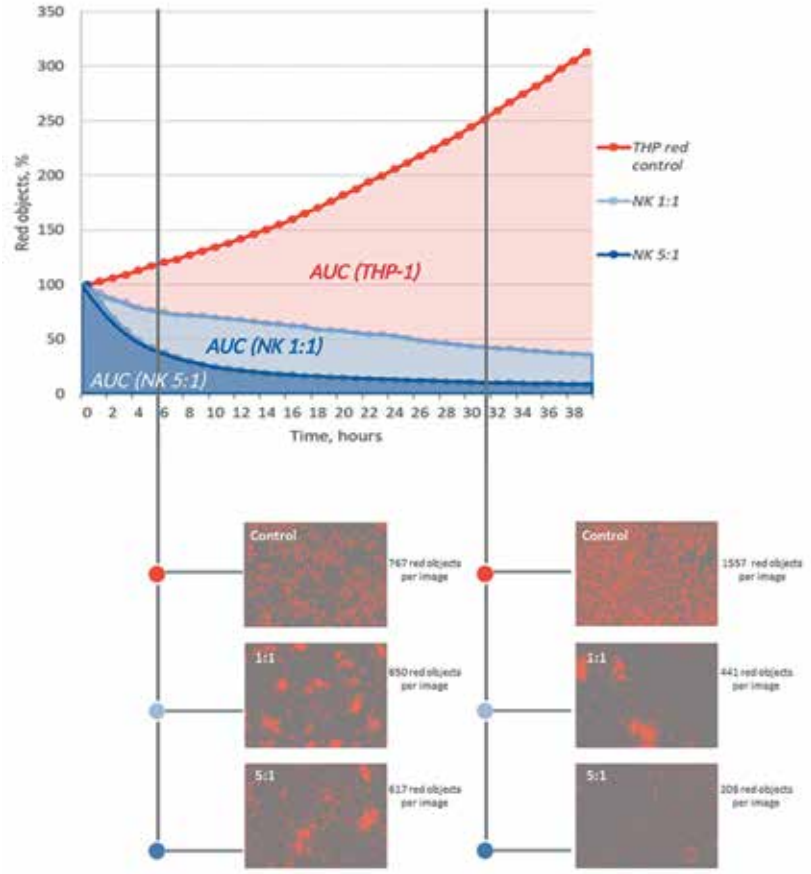
Таблица 1
Характеристики коммерческих моноклональных антител, использованных для анализа методом проточной цитометрии

Table 1
The characteristics of commercial monoclonal antibodies used for flow cytometry

Маркер Marker	Клон Clone	Компания-производитель Manufacturing company	Клеточная популяция Cell population
CD45	J33	Beckman Coulter, USA	Лейкоциты Leukocytes
7AAD	–	Miltenyi Biotec, Germany	Жизнеспособность Viability
CD14	RM052	Miltenyi Biotec, Germany	Моноциты Monocytes
CD16	3G8	Beckman Coulter, USA	НК-лимфоциты/нейтрофилы NK lymphocytes/neutrophils
CD56	NCAM16.2	Becton Dickinson, USA	НК-лимфоциты NK lymphocytes
CD19	J3-119	Miltenyi Biotec, Germany	В-лимфоциты B lymphocytes
CD3	REA613	Miltenyi Biotec, Germany	Т-лимфоциты T lymphocytes
CD4	M-T466	Miltenyi Biotec, Germany	Т-хелперы T helpers
CD8	SK1	Becton Dickinson, USA	Цитотоксические Т-лимфоциты Cytotoxic T lymphocytes
TCRαβ	BW242/412	Miltenyi Biotec, Germany	TCRαβ Т-лимфоциты TCRαβ T lymphocytes
TCRγδ	REA591	Miltenyi Biotec, Germany	TCRγδ Т-лимфоциты TCRγδ T lymphocytes
CD197	REA108	Miltenyi Biotec, Germany	Наивный фенотип/фенотип памяти Т-лимфоцитов Naive/memory T cell phenotype
CD45RA	T6D11	Becton Dickinson, USA	Наивный фенотип/фенотип памяти Т-лимфоцитов Naive/memory T cell phenotype
NKG2A	REA110	Miltenyi Biotec, Germany	Субпопуляции НК-лимфоцитов NK lymphocyte subpopulations
NKG2C	REA205	Miltenyi Biotec, Germany	
HLA-DR	AC122	Miltenyi Biotec, Germany	
CD69	REA824	Miltenyi Biotec, Germany	
CD57	REA769	Miltenyi Biotec, Germany	

Рисунок 2
Репрезентативные примеры исходных изображений, полученных в различные временные точки с помощью системы IncuCyte S3, и результаты их анализа. Красный цвет соответствует контролю, а оттенки синего – разным концентрациям НК-клеток
График иллюстрирует временную динамику количества красных объектов, отражающую пролиферацию опухолевых клеток в присутствии (оттенки синего) и отсутствии (красный) НК БМКП

Figure 2
Representative examples of the initial images acquired at various time points using IncuCyte S3 system along with the corresponding analysis results are presented. Red color corresponds to the control, and shades of blue – to different concentrations of NK cells
The graph illustrates the temporal changes in the number of red objects, reflecting the tumor cell proliferation in the presence (blue) and absence (red) of the NK cell product



Если не указано обратное, все приведенные значения представлены в формате медианы с указанием максимума и минимума разброса.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Все полученные клеточные продукты успешно прошли контроль качества по заявленным критериям. Медиана содержания остаточной фидерной линии в финальном продукте составила 0,01% (0–0,1%).

В стартовой фракции мононуклеаров медиана содержания НК-клеток ($CD56^+CD3^-$) от всех лимфоцитов составила 14,5% (6,5–24,1%), медиана содержания Т-лимфоцитов ($CD56^-CD3^+$) – 71,7% (61,3–81,0%). Вариабельность процентного содержания НК-клеток во фракции мононуклеаров была значительно выше, чем Т-лимфоцитов (коэффициент вариации 12% и 49% соответственно).

В финале всех 7 процессов был получен клеточный продукт, значительно обогащенный НК-лимфоцитами: медиана содержания НК-клеток ($CD56^+CD3^-$) от всех лимфоцитов составила 88,% (61,4–97,1%).

На 9-й день экспансии медиана тотального количества НК-клеток составила 1,6E+09 (от 0,82E+09 до 2,6E+09), что соответствует увеличению от стартового количества в 284 (194–650) раза, а на 14-й день – 0,8E+09 (от 0,39E+09 до 1,63E+09) и в 200 (96,5–406,7) раз соответственно. Динамика экспансии НК-лимфоцитов представлена на *рисунке 3* с детализацией в *таблице 2*.

Интегральный анализ поверхностных маркеров НК-лимфоцитов указывает на смещение функционального фенотипа в сторону большего пролиферативного потенциала и активации: снижение экспрессии CD57 и повышение экспрессии NKG2A, NKG2C, HLA-DR и CD69 (*таблица 3*).

Остаточные популяции были представлены следовыми количествами В-лимфоцитов (0,15% (0,03–0,2%)), а также NKT-лимфоцитами ($CD56^+CD3^+$) (2,3% (0,5–20,8%)) и Т-лимфоцитами ($CD56^-CD3^+$) (8,9% (0,5–20,8%)). Следует отметить, что, несмотря на значительное снижение доли Т-лимфоцитов в процессе экспансии, их абсолютное количество в финальном продукте по сравнению со стартовой фракцией увеличилось в 3,7 (1,3–6,2) раза. Также

Рисунок 3
Изменение тотального количества НК-лимфоцитов в составе клеточного продукта
Данные представлены в виде наложения индивидуальной динамики каждого из 7 процессов и распределения массива данных в 2 временных точках (9-й и 14-й дни экспансии). Горизонтальной линией обозначены медианы

Figure 3
The changes in the total number of NK lymphocytes in the cellular product
The data are presented as an overlay of the individual curves for each of the 7 processes, along with the distribution of values at 2 time points (days 9 and 14 of expansion). The horizontal line indicates median values

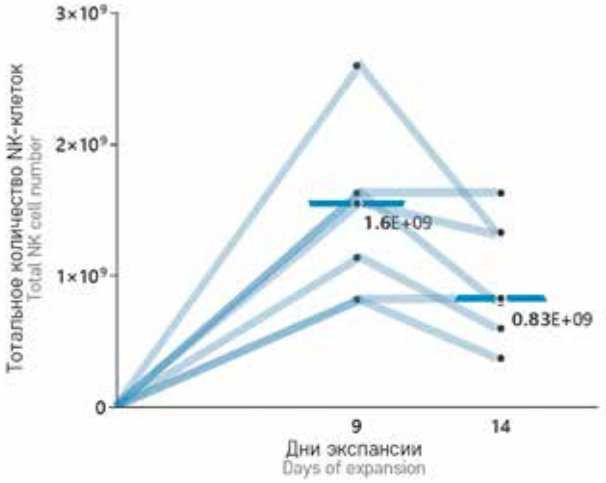


Таблица 2
Индивидуальные характеристики каждого процесса: субпопуляционный состав лимфоцитов стартовой и финальной фракции, а также параметры экспансии НК-лимфоцитов

Table 2
Individual characteristics of each process: lymphocyte subpopulations in the starting and final fractions, as well as the expansion parameters of NK lymphocytes

Номер процесса Process number	Стартовая фракция, % от лимфоцитов Starting fraction, % of lymphocytes				Финальная фракция, % от лимфоцитов Final fraction, % of lymphocytes				Тотальное количество НК-лимфоцитов в клеточном продукте Total number of NK lymphocytes in the cell product		Кратность увеличения количества НК-клеток относительно старта NK cell fold expansion compared to the starting fraction	
	$CD3^+$	$CD19^+$	$CD56^+CD3^-$	$CD56^+CD3^+$	$CD3^+$	$CD19^+$	$CD56^+CD3^-$	$CD56^+CD3^+$	9-й день Day 9	14-й день Day 14	9-й день Day 9	14-й день Day 14
1	73,6	9,7	7,2	6,1	16,6	0,03	62,3	20,8	1,6E+09	1,3E+09	194,0	163,5
2	59,3	4,8	22,3	11,0	2,4	0,1	95,8	1,1	1,6E+09	1,6E+09	408,4	406,7
3	72,7	12,7	10,1	1,7	20,1	0,2	77,4	2,3	1,1E+09	6,0E+08	283,9	150,0
4	81,0	4,8	6,5	6,7	27,0	0,2	61,4	11,3	1,6E+09	8,0E+08	408,2	200,0
5	69,8	10,3	14,5	3,3	8,9	0,2	88,1	2,9	8,2E+08	3,7E+08	204,0	93,5
6	59,2	12,3	24,1	2,2	4,0	0,15	95,9	0,5	8,2E+08	8,3E+08	205,5	207,5
7	61,8	6,7	20,6	9,8	1,9	0,03	97,1	0,96	2,6E+09	1,3E+09	650,0	332,5
Медиана Median	69,8	9,7	14,5	6,1	8,9	0,15	88,1	2,3	1,6E+09	0,83E+09	283,9	200,0

в процессе анализа была выявлена сильная положительная корреляция между процентным содержанием Т-клеток в стартовой фракции и в финальном продукте (R = 0,954; p = 0,0008). Субпопуляционный состав стартовой фракции и финального продукта представлен на *рисунке 4* с детализацией в *таблице 2*.

Состав Т-клеток, представленных в финальном продукте, был значительно изменен по сравнению с исходным: среди всех Т-клеток процент TCRαβ значимо уменьшился (с 96,4% до 57,5%; p = 0,0012), также изменилось соотношение $CD4^+/CD8^+$ (с 1,9 до 0,3). Фенотип остаточных Т-клеток был представлен более зрелыми высокодифференцированными стадиями по сравнению со стартовой фракцией: среди всех Т-клеток процент наивных ($CD45RA^+CD197^+$) уменьшился в среднем с 52% до 22%, а эффекторной популяции ($CD45RA^-CD197^-$) возрос с 20% до 64%. Субпопуляционный состав Т-лимфоцитов стартовой фракции и финального продукта представлен в *таблице 4*.

Также все полученные НК БМКП демонстрировали выраженную противоопухолевую активность в *in vitro* модели с клеточными линиями THP-1 и Jeko-1 (*рисунок 5*).

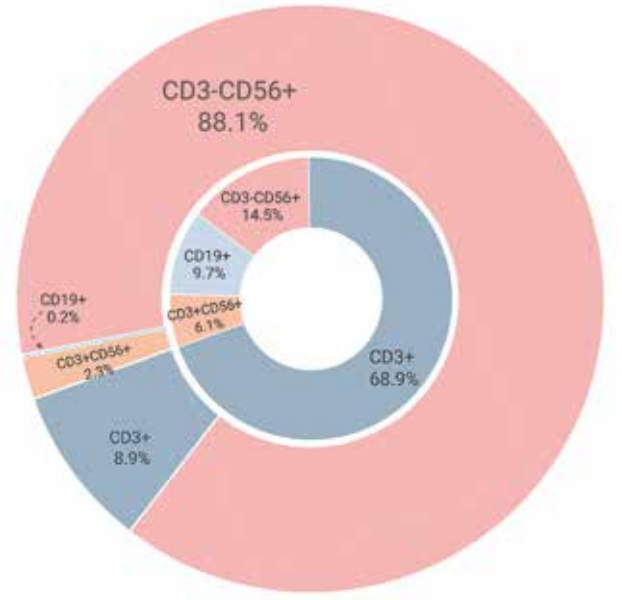
Таблица 3
Экспрессия маркеров НК-лимфоцитов в стартовой и финальной фракциях

Table 3
The expression of NK lymphocyte markers in the starting and final fractions

Маркер Marker	Старт, % от $CD3^-CD56^+$ Start, % of $CD3^-CD56^+$	Финал, % от $CD3^-CD56^+$ Final, % of $CD3^-CD56^+$
NKG2A	10,6 (0,2–13,2)	23,4 (18,7–28,1)
NKG2C	34,7 (28,2–53,0)	64,7 (48,6–87,2)
HLA-DR	3,7 (3,1–8,9)	52,5 (29,3–75,6)
CD69	1,9 (0,3–25,8)	26,8 (18,0–99,3)
CD57	69,8 (60,7–78,5)	5,7 (4,0–7,4)

Рисунок 4
Сравнение субпопуляционного состава лимфоцитов стартовой (внутренняя диаграмма) и финальной (наружная диаграмма) фракций
Диаграммы построены по значениям медиан (выведены на график), которые были рассчитаны на основе 7 процессов экспансии

Figure 4
A comparison of lymphocyte composition in the starting (inner chart) and final (outer chart) fractions
The donut chart depicts median values (displayed on the graph) derived from 7 independent expansion processes.



ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

С учетом преимуществ и ограничений существующих методик *ex vivo* экспансии НК-лимфоцитов нами был выбран протокол с использованием фидерной линии K562 и фракции мононуклеаров периферической крови, не включающий этап деплеции $CD3^+$-лимфоцитов. Данный протокол с незначительными адаптациями на протяжении последних 10 лет широко используется по всему миру в клинических и доклинических исследованиях как самостоятельно, так и в качестве платформы для дальнейших генетических модификаций НК-клеток [24, 29, 35–38].

По результатам проведенного исследования была достигнута 100% выполнимость: 7 из 7 процессов завершились получением НК БМКП, который успешно прошел контроль качества и продемонстрировал высокую функциональную активность *in vitro*.

В финале всех 7 процессов были получены клеточные продукты, значительно обогащенные НК-лимфоцитами (медиана содержания популяции $CD3^-CD56^+$ составила 88,1%). Медиана

Таблица 4
Развернутый субпопуляционный состав Т-лимфоцитов в стартовой и финальной фракциях

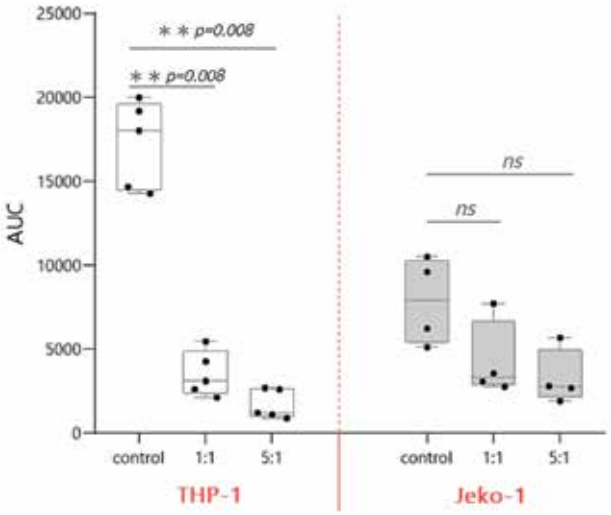
Table 4
Detailed T-lymphocyte composition in the starting and final cell product

Т-лимфоциты T lymphocytes	Старт, % от $CD3^+CD56^-$ Start, % of $CD3^+CD56^-$	Финал, % от $CD3^+CD56^-$ Final, % of $CD3^+CD56^-$
$CD4^+$-клетки $CD4^+$ cells	61,8 (59,1–67,7)	15,85 (6,7–33,6)
CD4 naïve	58,4 (37,4–62,1)	39,8 (14,3–70,1)
CD4 CM	22,0 (6,5–28,4)	11,7 (5,4–17,5)
CD4 EM	22,5 (8,7–35,6)	47,0 (15,0–71,3)
CD4 TEMRA	5,1 (0,8–6)	2,85 (1,0–5,5)
$CD8^+$-клетки $CD8^+$ cells	32,2 (25,4–37,2)	48,4 (41,8–74,2)
CD8 naïve	48,0 (24,5–65,8)	4,35 (1,4–6,8)
CD8 CM	3,1 (0,3–14,6)	0,9 (0,3–4,9)
CD8 EM	18,7 (6,5–23,5)	84,0 (44,0–92,6)
CD8 TEMRA	27,4 (18,7–59,5)	9,0 (5,8–52,4)
TCRαβ	96,4 (95,5 –98,3)	57,5 (41,3–76,4)
TCRγδ	3,6 (1,7–4,5)	50,4 (23,7–61,1)

Примечание. Значения приведены в виде медианы с разбросами по 7 процессам. Naive – наивные клетки ($CD197^+CD45RA^+$); CM (central memory) – центральные клетки памяти ($CD197^+CD45RA^-$); EM (effector memory) – эффекторные клетки памяти ($CD197^+CD45RA^-$); TEMRA (effector memory $CD45RA^+$) – CD45RA-положительные эффекторные клетки ($CD197^-CD45RA^+$).
Note. Values are given as a median with ranges calculated based on seven expansion processes. Naive – naïve cells ($CD197^+CD45RA^+$); CM – central memory cells ($CD197^+CD45RA^-$); EM – effector memory cells ($CD197^+CD45RA^-$); TEMRA – CD45RA-positive effector cells ($CD197^-CD45RA^+$).

Рисунок 5
Результаты анализа функциональной активности НК БМКП
Индивидуальные значения AUC, приведенные на графике, рассчитаны для 5 НК БМКП, соединенных с клеточными линиями THP-1 и Jeko-1 в 2 соотношениях (см. раздел «Материалы и методы»)

Figure 5
The results of the NK cellular product functional assay
Individual data points represent the AUC from 5 independent NK cellular products co-cultured with the THP-1 and Jeko-1 cell lines at 2 different effector-to-target ratios (see "Materials and Methods" for details)



тотального количества НК-лимфоцитов составила 0,8E+09 на 14-й день экспансии. Опираясь на данные завершенных клинических исследований, можно утверждать, что полученные нами количественные характеристики клеточного продукта достаточны для обеспечения педиатрическим пациентам медианной дозы 15E+06/кг (исходя из средней массы пациента 35 кг) [38–41].

Также анализ динамики экспансии указывает на возможность дальнейшей оптимизации протокола: во всех процессах максимальное тотальное количество НК-лимфоцитов наблюдалось на 9-е сутки культивирования, после чего их число постепенно снижалось (*рисунок 3*). Сокращение длительности процесса до 10 дней позволит не только увеличить выход таргетной популяции клеток, но и снизить стоимость производства за счет уменьшения расхода питательной среды, а также сократить время ожидания клеточного продукта в рамках клинического протокола.

Как уже было упомянуто, протокол экспансии с использованием в роли активатора живых фидерных клеток требует строгого контроля качества финального клеточного продукта. Традиционно для обеспечения безопасности используют воздействие высокими дозами γ-излучения, которые блокируют клеточный цикл и останавливают пролиферацию фидерных клеток [42]. Однако в результате значительного стрессового воздействия и длительной культивации с цитотоксическими лимфоцитами фидерные клетки могут терять линейные маркеры, что усложняет их детекцию методом проточной цитометрии. В целях повышения надежности детекции фидерная линия была дополнительно снабжена экспрессией GFP, который позволяет с высокой чувствительностью идентифицировать остаточную популяцию на проточном цитометре за счет интенсивного сигнала в канале FITC [34]. Измеренные описанным методом значения содержания остаточного фидера были значительно ниже установленного порога во всех 7 процессах (медиана 0,1% при пороговом значении 0,5% от всех живых клеток), что свидетельствует в пользу безопасности потенциального клинического применения полученного клеточного продукта.

На 14-й день медиана примеси Т-лимфоцитов составила 8,9%, что при средней дозе НК-лимфоцитов 20E+06/кг составляет соответственно 2E+06/кг. Согласно клиническим протоколам, такое значение несколько превышает рекомендуемые к $CD3^+$-деплеции дозы Т-клеток. Однако включение в производственный протокол НК БМКП этапа магнитной сепарации должно быть достаточно обосновано, поскольку увеличивает стоимость всего процесса и повышает риск контаминации за счет дополнительных манипуляций. Вместе с тем потенциальное присутствие в финальном клеточном продукте значимой примеси аллореактивных Т-лимфоцитов связано с риском развития реакции «трансплантат против хозяина», поэтому одной из важных задач нашего исследования была подробная характеристика остаточных Т-лимфоцитов.

Расширенный анализ фенотипа остаточных Т-клеток выявил преобладание зрелых высокодифференцированных стадий, а также статистически значимое снижение процента популяции TCRαβ среди всех Т-клеток (с 96,4% до 57,5%; p = 0,0012). Полученные данные могут не только свидетельствовать в пользу снижения аллореактивного потенциала примеси Т-клеток, но и указывать на возможный противовирусный эффект, что может явиться преимуществом для пациентов с высоким риском инфекционных осложнений в посттрансплантационном периоде.

Основной целью клинического применения инфузий активированных НК-лимфоцитов является профилактика рецидива, особенно для пациентов с рефрактерными формами ОМЛ [24, 38, 43]. В связи с этим важнейшим этапом валидации полученных НК БМКП было подтверждение их цитотоксической эффективности в отношении не только лимфоидных (Jeko-1), но и миелоидных (THP-1) бластных клеточных линий. Классические методики определения внутриклеточной экспрессии цитокинов и оценки уровня дегрануляции в присутствии опухо-

левой клеточной линии недостаточно информативны для НК-клеток, полученных путем 2-недельной экспансии, поскольку базовый уровень этих показателей достаточно высок у предварительно активированных клеток [44]. В связи с этим основным методом функциональной оценки полученного НК БМКП был выбран тест, отражающий способность НК-лимфоцитов напрямую элиминировать опухолевые клетки *in vitro*. Тест проводился на приборе прижизненной визуализации активности клеток IncuCyte S3, который позволяет также проследить временную динамику противоопухолевой активности цитотоксических лимфоцитов. Все исследованные НК БМКП подавляли пролиферацию бластных клеток, причем в отношении миелоидной клеточной линии THP-1 эффект был более выражен. Полученные результаты не могут быть напрямую экстраполированы на клинический потенциал клеточных продуктов и требуют дополнительного подтверждения в *in vivo* и *in vitro* моделях с расширением спектра мишеней и тестируемых соотношений.

Анализ фенотипа НК-лимфоцитов после экспансии выявил существенное повышение экспрессии маркеров активации CD69 и HLA-DR, что указывает на ярко выраженные цитотоксические свойства [45]. Вместе с тем снижение экспрессии маркера терминальной дифференцировки CD57 может свидетельствовать о повышении пролиферативного потенциала и одновременном снижении цитотоксичности по антителозависимому пути [46]. Повышение экспрессии NKG2C связывают с увеличением доли обладающих противовирусной активностью НК-клеток памяти [47]. Одновременно повышение экспрессии ингибирующего рецептора NKG2A может повышать вероятность ухода бластных клеток из-под иммунологического контроля за счет гиперэкспрессии HLA-E [48, 49]. По совокупности представленных фенотипических характеристик сложно сделать однозначный вывод об изменении пролиферативных и цитотоксических свойств НК-лимфоцитов после экспансии, если интерпретировать результаты через призму знаний о нормальной физиологии НК-лимфоцитов в организме, что подчеркивает важность использования *in vitro* и *in vivo* моделей для оценки их истинных функциональных свойств.

Несмотря на признанную клиническую эффективность, применение данного вида клеточной терапии имеет целый ряд ограничений. В частности, короткое время персистенции НК-клеток делает их скорее альтернативой высокотоксичной химиотерапии, но не позволяет осуществлять долгосрочный контроль над опухолевым процессом. Также отсутствие этапа $CD3^+$-деплеции делает данный вид терапии строго персонализированным, что значительно увеличивает его стоимость и снижает доступность. Несмотря на указанные ограничения, мы рассматриваем настоящий протокол как платформу для разработки НК БМКП следующего поколения с использованием большого спектра генетических модификаций, направленных на придание им антиген-специфичности, способности к длительной персистенции и управляемости.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате настоящего исследования был разработан и валидирован протокол производства НК БМКП. На основании данного протокола планируется проведение пилотного клинического исследования выполнимости и безопасности инфузий донорских НК-клеток для профилактики рецидива лейкоза после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ
Не указан.

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

ORCID
Kulakovskaya E.A. ORCID: https://orcid.org/0000-0002-9639-2779
Belchikov V.E. ORCID: https://orcid.org/0009-0001-7491-6906
Vedmedskaia V.A. ORCID: https://orcid.org/0000-0001-7247-4844
Fadeeva M.S. ORCID: https://orcid.org/0000-0002-6553-2505
Malakhova E.A. ORCID: https://orcid.org/0000-0002-7334-0706
Musaeva E.Ya. ORCID: https://orcid.org/0000-0003-0581-9472
Lodoeva O.B. ORCID: https://orcid.org/0000-0002-2874-0014
Larin S.S. ORCID: https://orcid.org/0000-0002-2128-0078
Lukashina M.I. ORCID: https://orcid.org/0009-0005-0194-4200/
Kibardin A.V. ORCID: https://orcid.org/0000-0001-5021-8065
Mollaev M.D. ORCID: https://orcid.org/0000-0003-0539-6393
Muzalevskii Ya.O. ORCID: https://orcid.org/0000-0003-3513-8299
Kazachenok A.S. ORCID: https://orcid.org/0000-0003-0497-9175
Melkova A.K. ORCID: https://orcid.org/0009-0000-3801-0931
Zavidnyi T.Yu. ORCID: https://orcid.org/0000-0002-4705-401X
Trakhtman P.E. ORCID: https://orcid.org/0000-0002-0231-1617
Shelikhova L.N. ORCID: https://orcid.org/0000-0003-0520-5630
Pershin D.E. ORCID: https://orcid.org/0000-0002-6148-7209
Maschan M.A. ORCID: https://orcid.org/0000-0003-1735-0093

Литература / References

1. Румянцев А.Г. Перспективы таргетной терапии острого лейкоза у детей. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2017; 2: 62–74. [Rumyantsev A.G. Prospects of targeted therapy for pediatric acute leukemia. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology 2017; 2: 62–74. (In Russ.)].
2. Reinhardt D., Antoniou E., Waack K. Pediatric Acute myeloid leukemia – past, present, and future. JCM 2022; 11: 504. DOI: 10.3390/jcm11030504
3. Inaba H., Mullighan C.G. Pediatric acute lymphoblastic leukemia. Haematol 2020; 105: 2524–39. DOI: 10.3324/haematol.2020.247031
4. Илюшина М.А., Шелихова Л.Н., Шашелева Д.А., Дунайкина М.А., Благов С.Л., Курникова Е.Е. и др. Опыт аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток у детей с химиорезистентным острым миелоидным лейкозом. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2024; 23 (2): 14–25. DOI: 10.24287/1726-1708-2024-23-2-14-24 [Ilyushina M.A., Shelikhova L.N., Shasheleva D.A., Dunaykina M.A., Blagov S.L., Kurnikova E.E. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation outcomes in pediatric patients with refractory acute myeloid leukemia. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology 2024; 23 (2): 14–25. (In Russ.)].
5. Omar A.A., Basiouny L., Elnoby A.S., Zaki A., Abouzid M. St. Jude Total Therapy studies from I to XVII for childhood acute lymphoblastic leukemia: a brief review. J Egypt Natl Canc Inst 2022; 34: 25. DOI: 10.1186/s43046-022-00126-3
6. Styczyński J., Tridello G., Koster L., Iacobelli S., van Biezen A., van der Werf S., et al. Death after hematopoietic stem cell transplantation: changes over calendar year time, infections and associated factors. Bone Marrow Transplant 2020; 55: 126–36. DOI: 10.1038/s41409-019-0624-z
7. Duell J., Lammers P.E., Djuretic I., Chunyk A.G., Alekar S., Jacobs I., et al. Bispecific antibodies in the treatment of hematologic malignancies. Clin Pharmacol Ther 2019; 106: 781–91. DOI: 10.1002/cpt.1396
8. Cao W., Ma S., Han L., Xing H., Li Y., Jiang Z., et al. Bispecific antibodies in immunotherapy for acute leukemia: latest updates from the 66th annual meeting of the American society of hematology, 2024. Front Oncol 2025; 15: 1566202. DOI: 10.3389/fonc.2025.1566202
9. Narayan R., Piérola A.A., Donnellan W.B., Yordi A.M., Abdul-Hay M., Platzbecker U., et al. First-in-human study of JNJ-67571244, a CD33 × CD3 bispecific antibody, in relapsed/refractory acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. Clin Transl Sci 2024; 17: e13742. DOI: 10.1111/cts.13742
10. Bonifant C.L., Tasian S.K. The future of cellular immunotherapy for childhood leukemia. Curr Opin Pediatr 2020; 32: 13–25. DOI: 10.1097/MOP.0000000000000866
11. Aamir S., Anwar M.Y., Khalid F., Khan S.I., Ali M.A., Khattak Z.E. Systematic review and meta-analysis of CD19-Specific CAR-T cell therapy in relapsed/refractory acute lymphoblastic leukemia in the pediatric and young adult population: safety and efficacy outcomes. Clin Lymphoma Myeloma Leuk 2021; 21: e334–47. DOI: 10.1016/j.clml.2020.12.010
12. Nieto Y., Banerjee P., Kaur I., Basar R., Li Y., Daher M., et al. Allogeneic NK cells with a bispecific innate cell engager in refractory relapsed lymphoma: a phase 1 trial. Nat Med 2025. DOI: 10.1038/s41591-025-03640-8
13. Paul S., Lal G. The molecular mechanism of natural killer cells function and its importance in cancer immunotherapy. Front Immunol 2017; 8: 1124. DOI: 10.3389/fimmu.2017.01124
14. Yoon S.R., Kim T.-D., Choi I. Understanding of molecular mechanisms in natural killer cell therapy. Exp Mol Med 2015; 47: e141. DOI: 10.1038/emm.2014.114
15. Roerden M., Spranger S. Cancer immune evasion, immunoediting and intratumour heterogeneity. Nat Rev Immunol 2025; 25: 353–69. DOI: 10.1038/s41577-024-01111-8
16. Zhou T., Curry C.V., Khanlari M., Shi M., Cui W., Peker D., et al. Genetics and pathologic landscape of lineage switch of acute leukemia during therapy. Blood Cancer J 2024; 14: 1–6. DOI: 10.1038/s41408-024-00983-2
17. Mushtaq M.U., Shahzad M., Shah A.Y., Chaudhary S.G., Zafar M.U., Anwar I., et al. Impact of natural killer cells on outcomes after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: A systematic review and meta-analysis. Front Immunol 2022; 13: 1005031. DOI: 10.3389/fimmu.2022.1005031
18. Maggs L., Kinsella F., Chan Y.L.T., Eldershaw S., Murray D., Nunnick J., et al. The number of CD56dim NK cells in the graft has a major impact on risk of disease relapse following allo-HSCT. Blood Adv 2017; 1: 1589–97. DOI: 10.1182/bloodadvances.2017008631
19. Hadjis A.D., McCurdy S.R. The role and novel use of natural killer cells in graft-versus-leukemia reactions after allogeneic transplantation. Front Immunol 2024; 15: 1358668. DOI: 10.3389/fimmu.2024.1358668
20. Glushkova S., Shelikhova L., Voronin K., Pershin D., Vedmedskaya V., Muzalevskii Y., et al. Impact of Natural Killer Cell-Associated Factors on Acute Leukemia Outcomes after Haploidentical Hematopoietic Stem Cell Transplantation with αβ T Cell Depletion in a Pediatric Cohort. Transplant Cell Ther 2024; 30: 435.e1–12. DOI: 10.1016/j.jtct.2024.01.070
21. Passweg J.R., Tichelli A., Meyer-Monard S., Heim D., Stern M., Kühne T., et al. Purified donor NK-lymphocyte infusion to consolidate engraftment after haploidentical stem cell transplantation. Leukemia 2004; 18: 1835–8. DOI: 10.1038/sj.leu.2403524
22. Shaffer B.C., Le Luduec J.-B., Forlenza C., Jakubowski A.A., Perales M.-A., Young J.W., et al. Phase II Study of haploidentical natural killer cell infusion for treatment of relapsed or persistent myeloid malignancies following allogeneic hematopoietic cell transplantation. Biol Blood Marrow Transplant 2016; 22: 705–9. DOI: 10.1016/j.bbmt.2015.12.028
23. Çubukçu H.C., Mesutoğlu P.Y., Seval G.C., Beksaç M. *Ex vivo* expansion of natural killer cells for hematological cancer immunotherapy: a systematic review and meta-analysis. Clin Exp Med 2022; 23: 2503–33. DOI: 10.1007/s10238-022-00923-z
24. Ciurea S.O., Kongtim P., Srour S., Chen J., Soebbing D., Shpall E., et al. Results of a phase I trial with Haploidentical mbIL-21 *ex vivo* expanded

NK cells for patients with multiply relapsed and refractory AML. Am J Hematol 2024; 99: 890–9. DOI: 10.1002/ajh.27281
25. Basílio-Queirós D., Venturini L., Luther-Wolf S., Dammann E., Ganser A., Stadler M., et al. Adaptive NK cells undergo a dynamic modulation in response to human cytomegalovirus and recruit T cells in *in vitro* migration assays. Bone Marrow Transplant 2022; 57: 712–20. DOI: 10.1038/s41409-022-01603-y
26. Hammer Q., Rückert T., Borst E.M., Dunst J., Haubner A., Durek P., et al. Peptide-specific recognition of human cytomegalovirus strains controls adaptive natural killer cells. Nat Immunol 2018; 19: 453–63. DOI: 10.1038/s41590-018-0082-6
27. Yu X.-X., Shang Q.-N., Liu X.-F., He M., Pei X.-Y., Mo X.-D., et al. Donor NKG2C homozygosity contributes to CMV clearance after haploidentical transplantation. JCI Insight 2022; 7 (3): e149120. DOI: 10.1172/jci.insight.149120
28. Ciurea S.O., Kongtim P., Soebbing D., Trikha P., Behbehani G., Rondon G., et al. Decrease post-transplant relapse using donor-derived expanded NK-cells. Leukemia 2022; 36: 155–64. DOI: 10.1038/s41375-021-01349-4
29. Shang Q.-N., Yu X.-X., Xu Z.-L., Chen Y.-H., Han T.-T., Zhang Y.-Y., et al. Expanded clinical-grade NK cells exhibit stronger effects than primary NK cells against HCMV infection. Cell Mol Immunol 2023; 20: 895–907. DOI: 10.1038/s41423-023-01046-5
30. Oyer J.L., Croom-Perez T.J., Hasan M.F., Rivera-Huertas J.A., Gitto S.B., Mucha J.M., et al. PM21-particle stimulation augmented with cytokines enhances NK cell expansion and confers memory-like characteristics with enhanced survival. Front Immunol 2024; 15: 1383281. DOI: 10.3389/fimmu.2024.1383281
31. De Rham C., Ferrari-Lacraz S., Jendly S., Schneiter G., Dayer J.-M., Villard J. The proinflammatory cytokines IL-2, IL-15 and IL-21 modulate the repertoire of mature human natural killer cell receptors. Arthritis Res Ther 2007; 9: R125. DOI: 10.1186/ar2336
32. Johnson C.D.L., Zale N.E., Frary E.D., Lomakin J.A. Feeder-cell-free and serum-free expansion of natural killer cells using cloudz microspheres, G-Rex6M, and human platelet lysate. Front Immunol 2022; 13: 803380. DOI: 10.3389/fimmu.2022.803380
33. Gurney M., Kundu S., Pandey S., O'Dwyer M. Feeder Cells at the interface of natural killer cell activation, expansion and gene editing. Front Immunol 2022; 13: 802906. DOI: 10.3389/fimmu.2022.802906
34. Lapteva N., Durett A.G., Sun J., Rollins L.A., Huye L.L., Fang J., et al. Large-scale *ex vivo* expansion and characterization of natural killer cells for clinical applications. Cytotherapy 2012; 14: 1131–43. DOI: 10.3109/14653249.2012.700767
35. Lapteva N., Szmania S.M., van Rhee F., Rooney C.M. Clinical grade purification and expansion of natural killer cells. Crit Rev Oncog 2014; 19: 121–32. DOI: 10.1615/critrevoncog.2014010931
36. Wang X., Byrne M.E., Liu C., Ma M.T., Liu D. Scalable process development of NK and CAR-NK expansion in a closed bioreactor. Front Immunol 2024; 15: 1412378. DOI: 10.3389/fimmu.2024.1412378
37. Shman T.V., Vashkevich K.P., Migas A.A., Matveyenka M.A., Lasiukov Y.A., Mukhametshyna N.S., et al. Phenotypic and functional characterisation of locally produced natural killer cells *ex vivo* expanded with the K562-41BBL-mbIL21 cell line. Clin Exp Med 2023; 23: 2551–60. DOI: 10.1007/s10238-022-00974-2
38. Gómez García L.M., Escudero A., Mestre C., Fuster Soler J.L., Martínez A.P., Vagace Valero J.M., et al. Phase 2 Clinical trial of infusing haploidentical K562-mb15-41BBL-activated and expanded natural killer cells as consolidation therapy for pediatric acute myeloblastic leukemia. Clin Lymphoma Myeloma Leuk 2021; 21: 328–37.e1. DOI: 10.1016/j.clml.2021.01.013
39. Mestre Durán C., Leon Triana O., Pertiñez L., Bueno D., Sisinni L., Navarro Zapata A., et al. Phase I/II study on infusion of alloreactive or *ex vivo* IL-15 Stimulated natural killer cells after haploidentical stem cell transplantation in pediatric patients with acute leukemia (PHINK): a study of the spanish hematopoietic stem cell transplantation group (GETH). Blood 2023; 142: 6888. DOI: 10.1182/blood-2023-189400
40. Nguyen R., Wu H., Pounds S., Inaba H., Ribeiro R.C., Cullins D., et al. A phase II clinical trial of adoptive transfer of haploidentical natural killer cells for consolidation therapy of pediatric acute myeloid leukemia. J Immunother Cancer 2019; 7: 81. DOI: 10.1186/s40425-019-0564-6
41. Ciurea S.O., Kongtim P., Soebbing D., Trikha P., Behbehani G., Rondon G., et al. Decrease post-transplant relapse using donor-derived expanded NK-cells. Leukemia 2022; 36: 155–64. DOI: 10.1038/s41375-021-01349-4
42. Kim G.H., Dang H.-N., Phan M.-T.T., Kweon S.H., Chun S., Cho D. X-ray as irradiation alternative for K562 feeder cell inactivation in human natural killer cell expansion. Anticancer Res 2018; 38: 5767–72. DOI: 10.21873/anticanres.12915
43. Rady M., Mostafa M., Dida G., Sabet F., Abou-Aisha K., Watzl C. Adoptive NK cell therapy in AML: progress and challenges. Clin Exp Med 2025; 25: 41. DOI: 10.1007/s10238-025-01559-5
44. Puig-Gámez M., Van Attekum M., Theis T., Dick A., Park J.E. Transcriptional signature of rapidly responding NK cells reveals S1P5 and CXCR4 as anti-tumor response disruptors. Sci Rep 2025; 15: 10769. DOI: 10.1038/s41598-025-95211-7
45. Evans J.H., Horowitz A., Mehrabi M., Wise E.L., Pease J.E., Riley E.M., et al. A distinct subset of human NK cells expressing HLA-DR expand in response to IL-2 and can aid immune responses to BCG. Eur J Immunol 2011; 41: 1924–33. DOI: 10.1002/eji.201041180
46. Lopez-Vergès S., Milush J.M., Pandey S., York V.A., Arakawa-Hoyt J., Pircher H., et al. CD57 defines a functionally distinct population of mature NK cells in the human CD56dimCD16^{+} NK-cell subset. Blood 2010; 116: 3865–74. DOI: 10.1182/blood-2010-04-282301
47. Capuano C., Pighi C., Battella S., Santoni A., Palmieri G., Galandrini R. Memory NK Cell features exploitable in anticancer immunotherapy. J Immunol Res 2019; 2019: 8795673. DOI: 10.1155/2019/8795673
48. Wang X., Xiong H., Ning Z. Implications of NKG2A in immunity and immune-mediated diseases. Front Immunol 2022; 13: 960852. DOI: 10.3389/fimmu.2022.960852
49. Li Y., Li Z., Tang Y., Zhuang X., Feng W., Boor P.P.C., et al. Unlocking the therapeutic potential of the NKG2A-HLA-E immune checkpoint pathway in T cells and NK cells for cancer immunotherapy. J Immunother Cancer 2024; 12: e009934. DOI: 10.1136/jitc-2024-009934

DOI: 10.24287/1726-1708-2025-24-2-38-45

© 2025 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России

Поступила 14.05.2025
Принята к печати 09.06.2025

EDN: DBRSDO

Посттрансплантационный циклофосфамид, абатацепт и ведолизумаб в профилактике реакции «трансплантат против хозяина» после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток у детей с острым лейкозом: результаты проспективного исследования

М.Е. Перминова, Л.Н. Шелихова, М.А. Климентова, Д.А. Шашелева, Р.Д. Хисматуллина, М.А. Дунайкина, С.К. Аракелян, Ю.В. Скворцова, Д.Н. Балашов, А.А. Масчан, М.А. Масчан

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

Контактная информация:
Перминова Маргарита Евгеньевна, врач-гематолог отделения трансплантации гемопоэтических стволовых клеток №1 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России
Адрес: 117997, Москва, ул. Саморы Машела, 1
E-mail: margarita.perminova@dgoi.ru

Высокодозный посттрансплантационный циклофосфамид (ПТЦф) является признанным методом профилактики реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ) при аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) от гаплоидентичных доноров, однако данные о его эффективности в педиатрической популяции остаются ограниченными. В рамках проспективного исследования нами была оценена усовершенствованная схема профилактики РТПХ на основе ПТЦф, включающая блокатор интегрина α4β7 ведолизумаб и ингибитор ко-стимулирующего сигнала абатацепт в дополнение к стандартной терапии ПТЦф и циклоспорином А. Исследование одобрено независимым этическим комитетом и утверждено решением ученого совета НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева. Аллогенная ТГСК проводилась детям с острым лейкозом высокого риска в стадии полной ремиссии от гаплоидентичного (n = 54) либо неродственного (n = 4) донора. Миелоаблативное кондиционирование было основано на треосульфане либо тотальном облучении тела. В 97% случаев в качестве источника трансплантата использовался костный мозг. Частота приживления трансплантата составила 98%. Кумулятивный риск развития острой РТПХ II–IV и III–IV стадии составил 38% и 8,6% соответственно, кишечной острой РТПХ II–IV стадии – 10%, хронической РТПХ – 7%. Трансплантат-ассоциированная смертность через 2 года наблюдения составила 3,6%, частота рецидивов – 16%, общая выживаемость – 91%, а бессобытийная выживаемость – 85%. В целом предложенная схема профилактики РТПХ продемонстрировала благоприятный профиль безопасности и хорошую переносимость без выявления специфических нежелательных явлений.

Ключевые слова: *посттрансплантационный циклофосфамид, реакция «трансплантат против хозяина», аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток*

Перминова М.Е. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2025; 24 (2): 38–45. DOI: 10.24287/1726-1708-2025-24-2-38-45

© 2025 by «D. Rogachev NMRCPHOI»

Received 14.05.2025
Accepted 09.06.2025

Post-transplant cyclophosphamide, abatacept, and vedolizumab for the prevention of graft-versus-host disease after hematopoietic stem cell transplantation in children with acute leukemia: results of a prospective study

M.E. Perminova, L.N. Shelikhova, M.A. Klimentova, D.A. Shasheleva, R.D. Khismatullina, M.A. Dunaykina, S.K. Arakelyan, Yu.V. Skvortsova, D.N. Balashov, A.A. Maschan, 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

Correspondence:
Margarita E. Perminova, a hematologist of the Department of Hematopoietic Stem Cell Transplantation No.1 at 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: margarita.perminova@dgoi.ru

High-dose post-transplant cyclophosphamide (PTCy) is an established method for the prevention of graft-versus-host disease (GVHD) in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) from haploidentical donors, however data on its efficacy in the pediatric population remain limited. In this prospective study, we evaluated an improved PTCy-based GVHD prophylaxis regimen comprising the α4β7 integrin blocker vedolizumab and a co-stimulatory signal inhibitor abatacept in addition to standard treatment with PTCy and cyclosporine A. 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 the Russian Federation. Allogeneic HSCT was performed in children with high-risk acute leukemia in complete remission from a haploidentical (n = 54) or unrelated (n = 4) donor. Myeloablative conditioning was based on treosulfan or total body irradiation. In 97% of cases, bone marrow was used as a graft source. The engraftment rate was 98%. The cumulative risk of acute GVHD grade II–IV and III–IV was 38% and 8.6%, respectively, of acute intestinal GVHD grade II–IV – 10%, and of chronic GVHD – 7%. Transplant-related mortality after 2 years of follow-up was 3.6%, the incidence of relapse was 16%, the overall survival rate – 91%, and the event-free survival rate – 85%. Overall, the proposed GVHD prophylaxis regimen demonstrated a favorable safety profile and good tolerability, no specific adverse events were observed.

Key words: *post-transplant cyclophosphamide, graft-versus-host disease, allogeneic hematopoietic stem cell transplantation*

Perminova M.E., et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology 2025; 24 (2): 38–45. DOI: 10.24287/1726-1708-2025-24-2-38-45

Безопасная и эффективная профилактика реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ) является краеугольным камнем успешной аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК). ТГСК от гаплоидентичных родственных доноров стремительно заняла место стандартного подхода в детской трансплантологии благодаря успешному применению режимов профилактики РТПХ на основе *ex vivo* деплеции Т-клеток либо фармакологической элиминации аллореактивных Т-лимфоцитов с помощью высокодозного посттрансплантационного циклофосфамида (ПТЦф) [1].

Классическая схема профилактики РТПХ на основе ПТЦф включает такролимус и микофенолата мофетил в качестве ключевых компонентов [2, 3]. Несмотря на широкую клиническую практику, опубликованные данные о применении ПТЦф у детей остаются ограниченными [4, 5]. Хотя отдельные исследования свидетельствуют о том, что оригинальная схема обеспечивает высокий уровень защиты от тяжелых форм РТПХ, данные проспективных исследований, а также собственный опыт показывают, что существует необходимость для дальнейшего совершенствования этого метода [6].

В последние годы в арсенал средств профилактики РТПХ были включены 2 препарата – абатацепт и ведолизумаб [7, 8]. Оба они воздействуют на ключевые молекулярные механизмы развития РТПХ: абатацепт ингибирует ко-стимуляцию Т-клеток, а ведолизумаб препятствует их миграции в ключевые органы-мишени острой РТПХ – кишечник и печень. При этом ни один из этих препаратов не вызывает выраженной лимфодеплеции и системной иммуносупрессии, а также они обладают минимальной органной токсичностью. В настоящее время абатацепт одобрен FDA для профилактики РТПХ при ТГСК от неродственных частично совместимых доноров, а ведолизумаб продемонстрировал эффективность в профилактике гастроинтестинальной РТПХ в сочетании со стандартной схемой на основе ингибиторов кальциневрина и антиметаболитов при ТГСК от родственных и неродственных совместимых доноров [7–9].

Оба препарата продолжают активно изучаться в составе различных схем профилактики РТПХ, однако опыт их применения в составе профилактики РТПХ на основе ПТЦф крайне ограничен, а в детской популяции публикации по данной теме отсутствуют. Основываясь на предыдущем опыте, мы инициировали проспективное исследование в целях оценки безопасности и предварительной эффективности добавления ведолизумаба и абатацепта к стандартной схеме профилактики на основе ПТЦф и циклоспорина А у детей с острым лейкозом высокого риска. В данной работе представлены результаты анализа по основным конечным точкам исследования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В период с марта 2022 г. по апрель 2023 г. ТГСК от гаплоидентичных и совместимых неродственных доноров с применением ПТЦф, циклоспорина, абатацепта и ведолизумаба была проведена у 58 детей с острым лейкозом в стадии ремиссии. Протокол исследования был зарегистрирован в ClinicalTrials.gov (NCT06475820). Исследование одобрено независимым этическим комитетом и утверждено решением ученого совета НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева. Все пациенты и/или их законные представители дали информированное согласие на участие в исследовании. Медиана наблюдения для выживших пациентов составила 609 дней, дата последней оценки – август 2024 г.

В исследуемую группу вошли 28 девочек и 30 мальчиков, медиана возраста на момент ТГСК составила 7 лет (диапазон 0,4–16 лет). Для всех пациентов это была первая трансплантация.

Показанием к проведению ТГСК являлся острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ) у 38 пациентов и острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) в 20 случаях. На момент трансплантации в первой полной ремиссии (ПР1) находились 27 пациентов, во второй ремиссии (ПР2) – 30, в третьей ремиссии (ПР3) – 1 пациент. Четыре пациента имели положительную минимальную остаточную болезнь (МОБ) по данным проточной цитометрии (диапазон 0,012–0,87%, медиана 0,42%), среди них 3 с ОМЛ и 1 с ОЛЛ. У 3 пациентов была выявлена положительная молекулярная МОБ (0,002–0,047%).

Пятьдесят четыре пациента получили трансплантат от гаплоидентичного донора, а 4 – от совместимого неродственного донора. Всем пациентам проводилась миелоаблативная кондиционирующая терапия: на основе тотального облучения тела (ТОТ) в общей дозе 12 Гр (n = 31) или на основе треосульфана в дозе 42 г/м^2 (n = 27). В качестве второго препарата применяли либо циклофосфамид в курсовой дозе 50 мг/кг (n = 50), либо этопозид в дозе 60 мг/кг (n = 8).

Профилактика РТПХ включала циклоспорин А с –1-го до 180-го дня, ПТЦф в дозе 50 мг/кг на +3-й и +4-й дни, абатацепт в дозе 10 мг/кг на +5, +14, +28, +45 и +60-й дни, а также ведолизумаб в дозе 10 мг/кг (максимально 300 мг) на –1, +14 и +28-й дни.

В 56 случаях в качестве трансплантата использовался неманипулированный костный мозг, в 2 случаях – гемопоэтические стволовые клетки периферической крови. Медианная доза CD34$^+$-клеток составила 4,8 × 10^6/кг (диапазон 1,2–17 × 10^6/кг),

доза $CD3^+$-клеток – 42 × 10^6/кг. Еженедельно проводился мониторинг цитомегаловируса (ЦМВ), аденовируса, вирусов герпеса 6-го типа и Эпштейна–Барр методом полимеразной цепной реакции в периферической крови. Лечение ЦМВ и аденовируса начинали при достижении вирусной нагрузки >500 копий/мл.

Приживление нейтрофилов фиксировалось при достижении абсолютного числа нейтрофилов ≥0,5 × 10^9/л, а восстановление тромбоцитов определялось как уровень тромбоцитов ≥20 × 10^9/л при отсутствии необходимости в трансфузиях тромбоцитов в течение 3 последовательных дней. Оценка статуса ремиссии, МОБ и химеризма проводилась на +30-й день после ТГСК.

Острая и хроническая РТПХ диагностировались и стадировались в соответствии со стандартными рекомендациями [10, 11].

Первичными конечными точками исследования были кумулятивный риск развития (КР) острой РТПХ II–IV стадии и 100-дневная трансплантационная смертность. Вторичные конечные точки включали частоту и сроки приживления трансплантата, КР рецидива, выживаемость без рецидива и РТПХ, трансплантационную смертность, частоту и выраженность хронической РТПХ, характеристику иммунореконституции, бессобытийную (БСВ) и общую (ОВ) выживаемость. При анализе БСВ в качестве событий учитывались смерть от любой причины и рецидив заболевания. Смертность, не связанная с рецидивом, и рецидив рассматривались как взаимоисключающие конкурирующие риски и анализировались с использованием модели конкурирующих рисков. Расчет БСВ и ОВ проводился методом Каплана–Майера. Статистический анализ выполнялся с использованием пакета XLSTAT (Addinsoft, Париж, Франция).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Приживление трансплантата

Приживление трансплантата зафиксировано у 57 (98%) пациентов. Медианный срок приживления составил 20 дней для нейтрофилов и 23 дня для тромбоцитов. Первичное неприживление трансплантата было зарегистрировано у 1 пациента с Т-линейным ОЛЛ, у которого впоследствии произошел рецидив на +120-е сутки после ТГСК. Данному пациенту была проведена повторная трансплантация.

Острая реакция «трансплантат против хозяина»

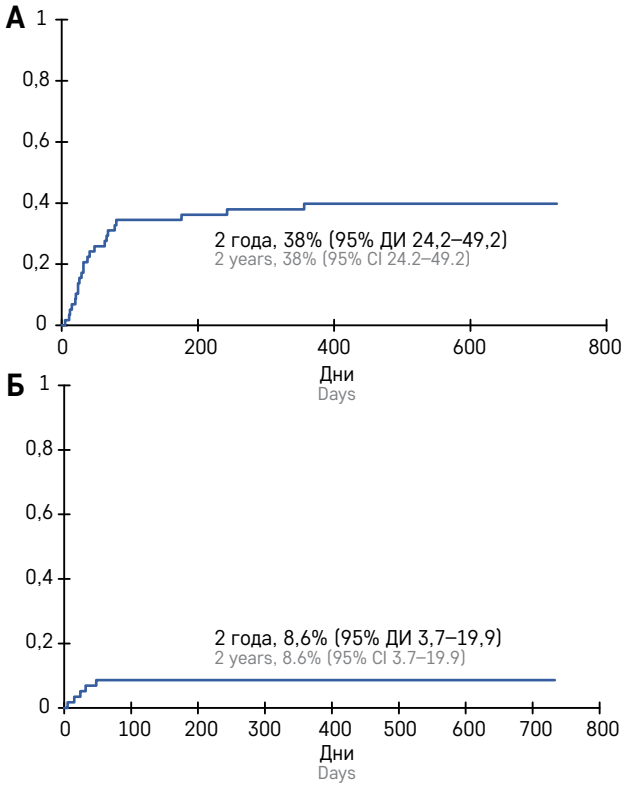
Острая РТПХ II–IV стадии развилась у 23 пациентов. КР острой РТПХ II–IV стадии составил 38% (95% доверительный интервал (ДИ) 24,2–49,2). Острая РТПХ III стадии диагностирована у 3 пациентов, IV стадии – у 2. КР РТПХ III–IV стадии составила 8,6% (95% ДИ 3,7–19,9) (*рисунок 1*). КР острой РТПХ IV стадии составила 3,4%.

Кишечная форма острой РТПХ развилась у 6 пациентов: у 2 наблюдалась РТПХ II стадии, у 3 – III стадии, у 1 – IV стадии. Риск развития кишечного поражения при острой РТПХ составил 10%. Гистологическое подтверждение диагноза было получено в 4 случаях. Медиана возникновения гастроинтестинальной формы острой РТПХ составила 48 дней после ТГСК (диапазон 36–212 дней). У 5 пациентов одновременно выявлялись вирусные гастроинтестинальные инфекции, подтвержденные методом полимеразной цепной реакции: в 4 случаях – норовирус, в 1 – аденовирус. Все 6 пациентов получали терапию глюкокортикостероидами, в 5 случаях схема иммуносупрессивной терапии была изменена: циклоспорин А был заменен на руксолитиниб.

На момент анализа данных у 16 (69%) пациентов РТПХ полностью разрешилась, иммуносупрессивная терапия была полностью завершена. Три пациента скончались по различным причинам, 4 продолжают лечение. Восемнадцать (78%) пациентов с острой РТПХ получали 2 линии терапии и более. Медиана числа линий иммуносупрессивной терапии составила 3.

КР хронической РТПХ составил 7% (95% ДИ 2,7–17,9) (*рисунок 2*). Хроническая РТПХ развилась у 4 пациентов, у всех отмечалось поражение кожи, а в 1 случае дополнительно наблюдалось поражение

Рисунок 1
КР развития острой РТПХ II–IV (А) и III–IV (Б) стадии
Figure 1
The cumulative risk of acute GVHD grade II–IV (A) and III–IV (Б)



легких. Два пациента с изолированным кожным поражением ответили на терапию низкими дозами глюкокортикостероидов и в настоящее время получают местную терапию стероидами. Еще 1 пациент с кожным поражением и пациент с поражением легких продемонстрировали полный ответ на системную иммуносупрессивную терапию и на момент завершения сбора данных продолжают получать руксолитиниб.

Токсичность

Схема лечения в целом переносилась хорошо. Острая токсичность включала мукозит III–IV стадии (n = 10), геморрагический цистит II–III стадии (n = 4) и тяжелую степень венооклюзионной болезни печени (ВОБ) (n = 2) (оба случая ВОБ развились после применения инотузумаба озогамицина перед ТГСК). Инфекции кровотока были зарегистрированы у 7 пациентов – все они были бактериальными (*Escherichia coli*, n = 2; *Klebsiella pneumoniae*, n = 2; *Stenotrophomonas maltophilia*, n = 1; *Streptococcus oralis*, n = 1; *Pseudomonas aeruginosa*, n = 1). Четыре пациента были переведены в отделение интенсивной терапии в связи с септическими осложнениями или ВОБ.

Вирусные инфекции

Реактивация ЦМВ произошла у 21 (36%) пациента, медиана реактивации составила 46 дней после ТГСК. Максимальная вирусная нагрузка ЦМВ в крови достигала 20 000 копий/мл, у 1 пациента развилось органное поражение в виде пневмонии. Реактивация (виремия) аденовируса была зафиксирована у 2 пациентов, у 1 отмечалось развитие аденовирусного колита.

Переносимость циклоспорина А

Нейротоксичность, связанная с циклоспорином А, наблюдалась у 10 пациентов. Судороги развились у 6 пациентов, сильная головная боль – у 4, у 2 из них также отмечались сходящееся косоглазие и нарушение зрения. Развитие PRES не было зарегистрировано ни у одного пациента. Острая почечная недостаточность наблюдалась в 4 случаях. Диапазон времени развития этих осложнений составил от –1-го до +30-го дня после ТГСК. У 17 пациентов циклоспорин А был заменен на руксолитиниб в связи с токсичностью, у 5 в рамках терапии острой РТПХ.

Рецидивы

Рецидив заболевания произошел у 9 пациентов: 5 с ОЛЛ и 4 с ОМЛ, медианный срок составил 4 мес (диапазон 2–14 мес). Кумулятивная 2-летняя частота рецидива или прогрессии составила 16% (*рисунок 3*).

Трансплантат-ассоциированная смертность

Трансплантат-ассоциированная смертность составила 1,7% (95% ДИ 0,9–13,5) на 100-й день и 3,4% (95% ДИ 0,9–13,5) через 2 года (*рисунок 4*).

Два пациента скончались: один из-за развития ВОБ и сепсиса, вызванного инфекцией *Stenotrophomonas maltophilia*, на +60-й день после ТГСК, другой из-за развития сепсиса, вызванного *Klebsiella pneumoniae* и *Candida glabrata*, во время получения второй линии терапии по поводу острой РТПХ на +268-й день после ТГСК.

Рисунок 2
КР развития хронической РТПХ
Figure 2
The cumulative risk of chronic GVHD

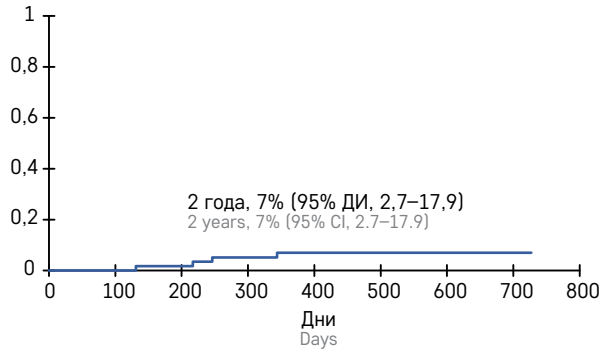


Рисунок 3
КР рецидива или прогрессии
Figure 3
The cumulative risk of relapse or progression

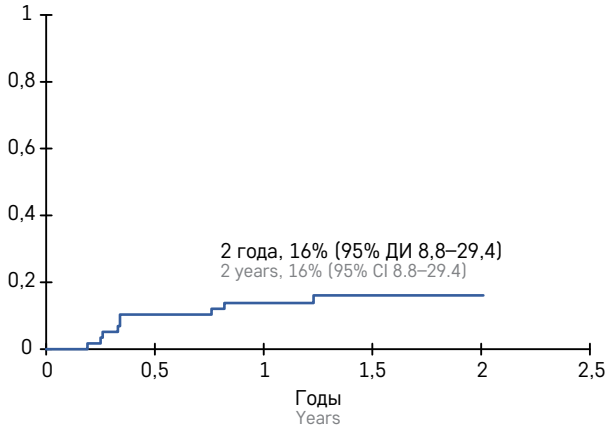
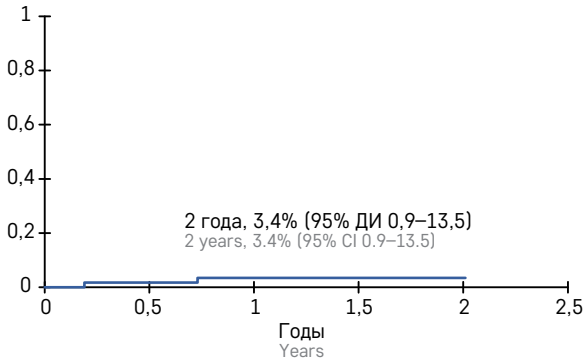


Рисунок 4
Трансплантат-ассоциированная смертность
Figure 4
Transplant-related mortality



Выживаемость

Двухлетняя ОВ составила 91% (95% ДИ 83,5–98,6), БСВ – 84,5% (95% ДИ 75,2–93,8) (*рисунок 5*). Выживаемость без РТПХ и рецидива составила 63,1% (95% ДИ 46,7–79,4) (*рисунок 6*).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эффективная и безопасная профилактика РТПХ является ключевым фактором успешной аллогенной ТГСК. Современная *ex vivo* Т-клеточная деплеция является наиболее эффективным методом предотвращения РТПХ, однако ее широкое применение ограничено из-за зависимости от сложных технологий и высокой стоимости [12, 13], в отличие от этого ПТЦф представляет собой относительно простой и широко применяемый метод, который приобрел значительную популярность благодаря своей надежности, легкости в использовании и низким непосредственным затратам. Взрослые пациенты были включены в многочисленные исследования, демонстрирующие эффективность различных схем профилактики РТПХ на основе ПТЦф [14–17]. В педиатрической популяции данные ограничены и в основном представлены ретроспективными исследованиями и анализами регистров [5, 6, 18]. Проспективные исследования носят либо одноцентровый характер, либо включают небольшое число пациентов [19]. Согласно имеющимся данным, зарегистрированная частота клинически значимой РТПХ после профилактики на основе ПТЦф варьирует от минимального уровня до более характерных показателей для ТГСК без Т-клеточной деплеции. Наш собственный опыт показал, что *ex vivo* Т-клеточная деплеция ассоциируется со значительно более низким риском как острой, так и хронической РТПХ, особенно ее тяжелых форм, по сравнению с пациентами, получавшими профилактику на основе ПТЦф [20–22]. При переходе от *ex vivo* Т-клеточной деплеции к платформе на основе ПТЦф мы стремились разработать вариант схемы профилактики РТПХ, который позволил бы повысить ее эффективность, при этом минимизируя глобальную иммуносупрессию, инфекционные осложнения и органную токсичность.

Выбор дополнительных фармакологических агентов был основан на опубликованных данных, а также на собственном опыте применения абатацепта и ранних данных о применении ведолизумаба. Ключевыми аргументами в пользу их использования стали низкая органная токсичность, возможность парентерального введения, а также убедительные доклинические и ранние клинические данные, подтверждающие их эффективность в профилактике и лечении РТПХ.

Настоящее исследование демонстрирует, что добавление ведолизумаба и абатацепта к стандартной схеме профилактики РТПХ на основе ПТЦф и циклоспорина А не ассоциировано с неожиданными нежелательными явлениями и, напротив, характеризуется хорошей переносимостью. Частота клинически значимой и тяжелой острой РТПХ находилась в пределах, ранее зарегистрированных для ПТЦф в условиях гаплоидентичной ТГСК.

Важно отметить, что острая РТПХ в целом хорошо поддавалась терапии и не приводила к избыточной трансплантат-ассоциированной смертности. Фактически трансплантат-ассоциированная смертность была низкой и сопоставимой с наилучшими результатами, достигнутыми в наших исследованиях при *ex*

Рисунок 5
ОВ (А) и БСВ (В)
Figure 5
Overall (A) and event-free survival (B)

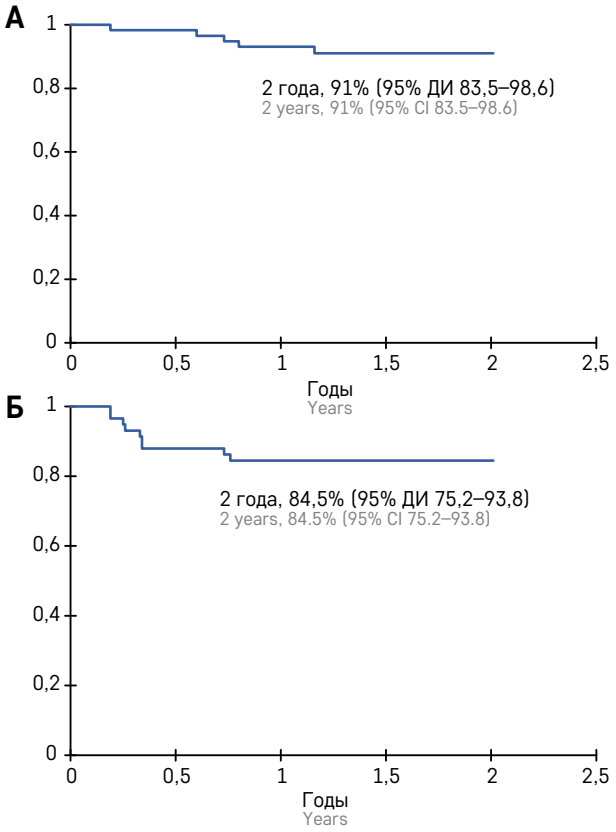
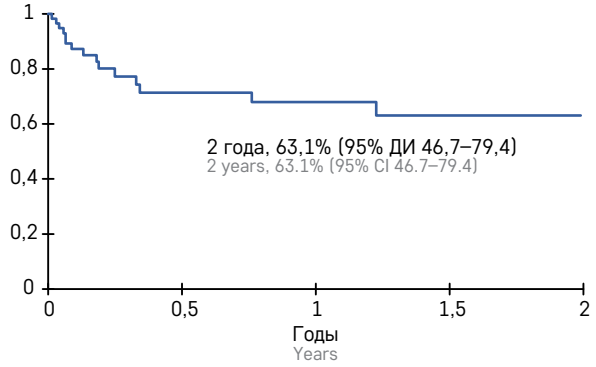


Рисунок 6
Выживаемость без РТПХ и рецидива
Figure 6
Survival without GVHD or relapse



vivo деплеции. Хроническая РТПХ была эффективно предотвращена, тяжелые формы встречались редко, и только 2 пациента продолжали получать иммуносупрессивную терапию на момент завершения анализа данных. Эти результаты согласуются с имеющимися данными как детских, так и взрослых исследований, подтверждающих высокую эффективность ПТЦф в профилактике хронической РТПХ [3, 4, 6, 19, 23, 24].

Абатацепт был одобрен FDA в 2022 г. в качестве дополнительного компонента к схемам на основе ингибиторов кальциневрина при ТГСК от частично совместимых неродственных доноров (<8/8). В недавнем пилотном проспективном исследовании Al-Homsi и соавт. была показана высокая эффективность комбинации абатацепта и ПТЦф с сокращенным курсом такролимуса при гаплоидентичной ТГСК у взрослых [3]. Протокол и дозирование абатацепта в данном исследовании были аналогичны используемым в нашем исследовании. Частота РТПХ (17% для острой РТПХ II–IV стадии) и общие результаты, представленные в этом исследовании, оказались весьма перспективными. Одним из возможных факторов, влияющих на частоту острой РТПХ и обусловивших существенное расхождение с результатами нашего исследования, могло быть значительное число пациентов, получивших режимы кондиционирования сниженной интенсивности.

Ведолизумаб ранее применялся в качестве одной из последних линий терапии гастроинтестинальной РТПХ в небольших сериях клинических случаев, а также оценивался в пилотном исследовании в качестве профилактического препарата [7, 25]. Однако данных о его применении в качестве профилактики при гаплоидентичной ТГСК у детей ранее не публиковалось. В недавнем рандомизированном исследовании III фазы было показано, что добавление ведолизумаба к стандартной профилактике (циклоспорин А + антиметаболиты) при ТГСК от неродственных доноров у взрослых значимо снижает частоту гастроинтестинальной РТПХ. Помимо различий в возрасте пациентов и типе донора, дополнительным фактором могло быть более длительное использование ведолизумаба в этом исследовании – вплоть до +180-го дня, что, возможно, способствовало лучшему контролю кишечной РТПХ по сравнению с нашими данными. Интересно, что в нашей когорте у большинства пациентов с РТПХ с поражением желудочно-кишечного тракта одновременно выявлялся вирусный патоген, что могло способствовать развитию патологии и затруднять дифференциальную диагностику между РТПХ и инфекционным гастроэнтеритом. Примечательно, что в исходной популяции пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника, получавших терапию ведолизумабом, отмечалось повышенное количество случаев кишечных инфекций [26].

Настоящее исследование не было спроектировано для оценки эффективности абатацепта и ведолизумаба в профилактике РТПХ, поэтому окончательные выводы по этому вопросу сделать нельзя. Следует отметить, что данных, свидетельствующих об исключительной эффективности данной схемы, получено не было. Тем не менее через 2 года наблюдения частота рецидивов оказалась несколько ниже, чем в аналогичных когортах, что, возможно, связано с применением интенсивных режимов кондиционирования и тем, что на момент ТГСК пациенты находились в состоянии полной ремиссии, а большинство в МОБ-негативной ремиссии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Применение абатацепта и ведолизумаба на фоне стандартной схемы профилактики РТПХ с ПТЦф и циклоспорином А оказалось осуществимым и не сопровождалось неожиданной токсичностью. Показатели трансплантат-ассоциированной смертности, частота рецидивов, заболеваемость хронической РТПХ и выживаемость продемонстрировали обнадеживающие результаты, в то время как частота острой РТПХ находилась в пределах ожидаемой для ТГСК без деплеции Т-клеток.

Дальнейшее совершенствование профилактики РТПХ возможно за счет оптимизации схемы введения препаратов, а также потенциально включения ингибиторов JAK-киназ в профилактические режимы.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ
Не указан.

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

ORCID
Perminova M.E. ORCID: https://orcid.org/
Shelikhova L.N. ORCID: https://orcid.org/0000-0003-0520-5630
Klimentova M.A. ORCID: https://orcid.org/
Shasheleva D.A. ORCID: https://orcid.org/0000-0002-5641-8567
Khismatullina R.D. ORCID: https://orcid.org/0000-0001-5618-7159
Dunaykina M.A. ORCID: https://orcid.org/0000-0002-1384-1752
Arakelyan S.K. ORCID: https://orcid.org/0009-0005-7866-7256
Skvortsova Yu.V. ORCID: https://orcid.org/0000-0002-0566-053X
Balashov D.N. ORCID: https://orcid.org/0000-0003-2689-0569
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. Anasetti C., Logan B.R., Lee S.J., Waller E.K., Weisdorf D.J., Wingard J.R., et al. Peripheral-blood stem cells versus bone marrow from unrelated donors. N Engl J Med 2012; 367 (16): 1487–96.
2. Jacobsohn D.A., Vogelsang G.B. Acute graft versus host disease. Orphanet J Rare Dis 2007; 2 (1): 35.
3. Al-Homsi A.S., Cirrone F., Wo S., Cole K., Suarez-Londono J.A., Gardner S.L., et al. PTCy, abatacept, and a short course of tacrolimus for GVHD prevention after haploidentical transplantation. Blood Adv 2023; 7 (14): 3604–11.
4. Fierro-Pineda J.C., Tsai H.L., Blackford A., Cluster A., Caywood E., Dalal J., et al. Prospective PTCTC trial of myeloablative haplo-BMT with posttransplant cyclophosphamide for pediatric acute leukemias. Blood Adv 2023; 7 (18): 5639–48.
5. Nagler A., Labopin M., Swoboda R., Schroeder T., Hamladji R.M., Griskevicius L., et al. Post-transplant cyclophosphamide, calcineurin inhibitor, and mycophenolate mofetil compared to anti-thymocyte globulin, calcineurin inhibitor, and methotrexate combinations as graft-versus-host disease prophylaxis post allogeneic stem cell transplantation from sibling and unrelated donors in patients with acute myeloid leukemia: a study on behalf of the acute leukemia working party of the european society for blood and marrow transplantation. Bone Marrow Transplant 2024; 59 (7): 1012–21.
6. Symons H.J., Zahurak M., Cao Y., Chen A., Cooke K., Gamper C., et al. Myeloablative haploidentical BMT with posttransplant cyclophosphamide for hematologic malignancies in children and adults. Blood Adv 2020; 4 (16): 3913–25.
7. Bin C.Y., Mohty M., Zeiser R., Teshima T., Jamy O., Maertens J., et al. Vedolizumab for the prevention of intestinal acute GVHD after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a randomized phase 3 trial. Nat Med 2024; 30 (8): 2277–87.
8. Kean L.S., Burns L.J., Kou T.D., Kapikian R., Lozenski K., Langston A., et al. Abatacept for acute graft-versus-host disease prophylaxis after unrelated donor hematopoietic cell transplantation. Blood 2024; 144 (17): 1834–45.
9. Watkins B., Qayed M., McCracken C., Bratrude B., Betz K., Suessmuth Y., et al. Phase II trial of costimulation blockade with abatacept for prevention of acute GVHD. J Clin Oncol 2021; 39 (17): 1865–77.
10. Wilhelm K., Ganesan J., Müller T., Dürr C., Grimm M., Beilhack A., et al. Graft-versus-host disease is enhanced by extracellular ATP activating P2X7R. Nat Med 2010; 16 (12): 1434–9.
11. Betcher J., Chang Y.H., Noel P., Leis J., Sproat L.O., Fauble V., et al. Factors affecting the incidence of severe (stage 2–4) gastrointestinal (GI) graft-versus-host disease (GVHD) in adult patients (pts) undergoing allogeneic hematopoietic transplant (allo-HCT) for hematologic malignancy. Biol Blood Marrow Transplant 2014; 20 (2): S262.
12. Shelikhova L., Glushkova S., Nikolaev R., Dunaikina M., Zhekhovtsova Z., Blagov S., et al. Serotherapy-free regimen improves non-relapse mortality and immune recovery among the recipients of αβ Tcell–depleted haploidentical grafts: retrospective study in childhood leukemia. Transplant Cell Ther 2021; 27 (4): 330.e1–9.
13. 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.
14. McCurdy S.R., Luznik L. How we perform haploidentical stem cell transplantation with posttransplant cyclophosphamide. Blood 2019; 134 (21): 1802–10.
15. Ciurea S.O., Zhang M.J., Bacigalupo A.A., Bashey A., Appelbaum F.R., Aljitawi O.S., et al. Haploidentical transplant with post-transplant cyclophosphamide vs matched unrelated donor transplant for acute myeloid leukemia. Blood 2015; 126 (8): 1033–40.
16. McCurdy S.R., Kanakry J.A., Showel M.M., Tsai H.L., Bolaños-Meade J., Rosner G.L., et al. Risk-stratified outcomes of nonmyeloablative HLA-haploidentical BMT with high-dose posttransplantation cyclophosphamide. Blood 2015; 125 (19): 3024–31.
17. Ruggeri A., Labopin M., Bacigalupo A., Afanasyev B., Cornelissen J.J., Elmaagacli A., et al. Post-transplant cyclophosphamide for graft-versus-host disease prophylaxis in HLA matched sibling or matched unrelated donor transplant for patients with acute leukemia, on behalf of ALWP-EBMT. J Hematol Oncol 2018; 11 (1).
18. Berger M., Lanino E., Cesaro S., Zecca M., Vassallo E., Faraci M., et al. Feasibility and outcome of haploidentical hematopoietic stem cell transplantation with post-transplant high-dose cyclophosphamide for children and adolescents with hematologic malignancies: an AIEOP-GITMO retrospective multicenter study. Biol Blood Marrow Transplant 2016; 22(5): 902–9.
19. Ruggeri A., Galimard J.E., Paina O., Fagioli F., Tbakhi A., Yesilipek A., et al. Outcomes of unmanipulated haploidentical transplantation using post-transplant cyclophosphamide (PT-Cy) in pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia. Transplant Cell Ther 2021; 27 (5): 424.e1–9.
20. Abrosimov A.B., Blinov D.S., Blinova E.V., Maschan M.A. Results of a comparative phrmacoeconomics analysis of strategies for the prevention of graft-versus-host dis-

ease in children with hematological malignences: a single center experience. Acta Medica Eurasica 2023; (1): 1–10.
21. Дунайкина М.А., Шелихова Л.Н., Шеховцова Ж.Б., Глушкова С.Ю., Николаев Р.В., Благов С.Л. и др. Безопасность и эффективность инфузий донорских лимфоцитов памяти после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток на платформе деплеции αβ-Т-лимфоцитов у детей с острыми лейкозами. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2021; 20 (2): 12–28. [Dunaykina M.A., Shelikhova L.N., Shekhovtsova Zh.B., Glushkova S.Yu., Nikolayev R.V., Blagov S.L., et al. The safety and effectiveness of donor memory T lymphocyte infusions after hematopoietic stem cell transplantation with αβ T cell depletion platform in children with acute leukemia. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology 2021; 20 (2): 12–28. (In Russ.)].
22. Боровкова А.С., Паина О.В., Кожокарь П.В., Рахманова З.З., Осипова А.А., Цветкова Л.А. и др. Анализ эффективности профилактики реакции «трансплантат против хозяина» на основе посттрансплантационного циклофосфамида у детей с острым миелоидным лейкозом после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток от полностью и частично HLA-совместимых неродственных доноров. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2023; 22 (2): 32–43. [Borovkova A.S., Paina O.V., Kozhokar P.V., Rakhmanova Z.Z., Osipova A.A., Tsvetkova L.A., et al. An analysis of the efficacy of graft-versus-host disease prophylaxis with post-transplant cyclophosphamide in children with acute myeloid leukemia following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation from HLA-matched and partially-matched unrelated donors. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology 2023; 22 (2): 32–43. (In Russ.)].
23. Tanaka T., Nakamae H., Ito A., Fuji S., Hirose A., Eto T., et al. A phase I/II multicenter trial of HLA-haploidentical PBSCT with PTCy for aggressive adult T cell leukemia/lymphoma. Transplant Cell Ther 2021; 27 (11): 928.e1–7.
24. Luznik L., O'Donnell P.V., Symons H.J., Chen A.R., Leffell M.S., Zahurak M., et al. HLA-haploidentical bone marrow transplantation for hematologic malignancies using nonmyeloablative conditioning and high-dose, posttransplantation cyclophosphamide. Biol Blood Marrow Transplant 2008; 14 (6): 641–50.
25. Isshiki K., Kamiya T., Endo A., Okamoto K., Osumi T., Kawai T., et al. Vedolizumab therapy for pediatric steroid-refractory gastrointestinal acute graft-versus-host disease. Int J Hematol 2022; 115 (4): 590–4.
26. Innocenti T., Roselli J., Lynch E.N., Apolito P., Parisio L., Bagnoli S., et al. Infectious risk of vedolizumab compared with other biological agents in the treatment of inflammatory bowel disease. Eur J Gastroenterol Hepatol 2021; 33 (1S Suppl 1): E574–9.

DOI: 10.24287/1726-1708-2025-24-2-46-54

© 2025 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России

Поступила 11.05.2025
Принята к печати 02.06.2025

EDN: FOEZME

Функция гонад у мальчиков после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток: сравнение воздействия треосульфана и тотального облучения тела в кондиционировании

Э.Р. Султанова, Е.Ю. Ильина, Д.А. Шашелева, А.А. Винокуров, А.В. Процветкина, В.М. Делягин, Ю.В. Скворцова

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

Контактная информация:
Султанова Эльвира Ривалевна, врач-гематолог отделения трансплантации гемопоэтических стволовых клеток №2 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России
Адрес: 117997, Москва, ул. Саморы Машела, 1
E-mail: elvira.sultanova@yahoo.com

Аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) – единственный излечивающий метод терапии многих орфанных заболеваний, значительно улучшающий прогноз и выживаемость пациентов. Кондиционирование, предшествующее ТГСК, включает алкиляторы и/или тотальное облучение тела (ТОТ), обладающие выраженными гонадотоксичными эффектами. В связи с этим актуальным является выбор препаратов и вариантов терапии с минимальными побочными эффектами. Цель: оценить функцию репродуктивной системы мальчиков-реципиентов ТГСК при использовании режимов кондиционирования на основе треосульфана и ТОТ. Данное исследование одобрено независимым этическим комитетом и утверждено решением ученого совета ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России. В исследование включены 112 мальчиков. В динамике оценивали концентрации фолликулостимулирующего и лютеинизирующего гормонов, тестостерона, а также размеры яичек по данным ультразвукового исследования и общую оценку полового развития по шкале Таннера. Воздействие треосульфана на функцию гонад у мальчиков меньше, чем ТОТ (кумулятивная вероятность развития гипогонадизма к 4 годам после ТГСК 0% и 24% соответственно), однако токсичность других алкиляторов в составе кондиционирования нивелирует разницу при развитии гипогонадизма. Для полноценного понимания репродуктивного потенциала пациентов необходим дальнейший ежегодный мониторинг.

Ключевые слова: *мальчики, аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток, репродуктивная система, треосульфан, тотальное облучение тела*

Султанова Э.Р. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2025; 24 (2): 46–54. DOI: 10.24287/1726-1708-2025-24-2-46-54

© 2025 by «D. Rogachev NMRCPHOI»

Received 11.05.2025
Accepted 02.06.2025

Gonadal function in male pediatric patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a comparison of the effects of treosulfan- and total body irradiation-based conditioning

E.R. Sultanova, E.Yu. Ilyina, D.A. Shasheleva, A.A. Vinokurov, A.V. Protsvetkina, W.M. Delyagin, Yu.V. Skvortsova

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

Correspondence:
Elvira R. Sultanova, a hematologist at Department of Hematopoietic Stem Cell Transplantation №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: elvira.sultanova@yahoo.com

Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) is the only curative treatment for many orphan diseases that can significantly improve prognosis and survival in patients. Conditioning prior to HSCT includes alkylating agents and/or total body irradiation (TBI) that are both known to be highly gonadotoxic. This is why it is so important to choose drugs and treatment options with minimal side effects. The aim of our study was to evaluate the reproductive function of male HSCT recipients who had received treosulfan- and TBI-based conditioning. 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 the Russian Federation. We included 112 boys. The concentrations of follicle-stimulating and luteinizing hormones, testosterone levels, testicular size (measured using ultrasound) and pubertal development (as per the Tanner scale) were assessed over time. The obtained data showed that the effect of treosulfan on gonadal function in the males was less significant than that of TBI, with the cumulative probability of developing hypogonadism at 4 years after HSCT equaling 0% and 24% respectively. However, the toxicity of other alkylating agents included in a treosulfan-based conditioning regimen eliminates the difference in the cumulative probability of hypogonadism between the two approaches. Further annual monitoring is needed to fully understand the reproductive potential of the patients.

Key words: *males, allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, reproductive system, treosulfan, total body irradiation*

Sultanova E.R., et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology 2025; 24 (2): 46–54. DOI: 10.24287/1726-1708-2025-24-2-46-54

Патология репродуктивной системы – одно из наиболее частых поздних осложнений аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) [1]. Нарушение функции гонад после кондиционирования может быть прямым – за счет токсических эффектов непосредственно на ткани тестикул или опосредованным – обусловленным негативным влиянием облучения головного мозга на гипоталамо-гипофизарную область [2].

Основной гонадотоксический эффект при кондиционировании обусловлен использованием препаратов из группы алкиляторов и лучевой терапии. Суммарная доза облучения зависит от основного заболевания и напрямую связана с токсичностью данного метода. Яички максимально чувствительны к облучению. Так, при использовании 6–8 Гр поражение может стать необратимым, а при меньших дозах описано длительное восстановление функции гонад [3].

Среди алкилирующих агентов базовыми препаратами с миелоаблативным эффектом являются бусульфан и треосульфан. Также в состав кондиционирования часто включают тиотепу, мелфалан или циклофосфамид. Последний применяется и в качестве деплеции трансплантата in vivo (посттрансплантационный циклофосфамид) [2]. При оценке суммарной токсичности алкиляторов рассчитывается эквивалентная доза циклофосфамида (cyclophosphamide equivalent dose, CED) [4]. Используя коэффициенты к каждому из алкиляторов, можно вычислить суммарную дозу повреждающих агентов. Согласно данным литературы, CED >4000 мг/м^2 связана с нарушениями сперматогенеза [5, 6].

Риск дисфункции мужских гонад после ТГСК в детском возрасте зависит от кумулятивной дозы (КД) облучения яичек, а также прямо пропорционален CED [7, 8]. Нельзя исключить влияние на функцию гонад реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ), иммуносупрессивной терапии (ИСТ) после ТГСК [9–11].

Тотальное облучение тела (ТОТ) – метод лучевой терапии с суммарной дозой 12 Гр, применяемый многими ведущими трансплантационными центрами в рамках кондиционирования. В связи с выраженной токсичностью показания к использованию данного метода узкие и включают в себя острые лимфобластные лейкозы и лимфомы [12].

Треосульфан – препарат из группы алкиляторов, обладающий миелоаблативными и лимфодеплетирующими свойствами, применяется для предтрансплантационной подготовки с начала 2000-х годов [13]. В настоящий момент уже известно о меньшей токсичности треосульфана по сравнению с другими миелоаблативными режимами [7, 14, 15]. Однако данный препарат требует проведения новых исследований на более крупных когортах пациентов с оценкой токсичности относительно других режимов кондиционирования.

Цель исследования – оценка функции репродуктивной системы мальчиков-реципиентов ТГСК в детском и подростковом возрасте при использовании режимов кондиционирования на основе треосульфана и ТОТ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Данное исследование одобрено независимым этическим комитетом и утверждено решением ученого совета ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России.

В исследование включены 112 мальчиков-реципиентов аллогенной ТГСК, проходивших лечение в ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России в период с 01.09.2018 по 31.12.2023, старше 10 лет на момент трансплантации и старше 14 лет на момент сбора данных (31.08.2024), при проведении кондиционирования у которых применяли треосульфан или ТОТ. Из исследования были исключены пациенты с синдромом Ниймеген в связи с нарушениями репродуктивной сферы по основному заболеванию, с проведенной до ТГСК двусторонней орхифуникулэктомией, а также пациенты, получившие 2 ТГСК и более. Пациенты, включенные в исследование, были разделены на 2 группы: 1-я группа получала треосульфан (n = 48), 2-я группа – ТОТ (n = 64).

Для сбора данных проанализированы истории болезни, записи приемов в поликлинике, исследования с места жительства, присланные через защищенные каналы для телемедицинской консультации.

Медиана возраста пациентов на момент ТГСК в обеих группах составила 14 (10,2–17,8) лет. Максимальный срок наблюдения составил 5,5 лет (треосульфан) и 6,2 года (ТОТ). Наблюдение было ограничено датой осмотра пациента с любой информацией о его состоянии или событием (за событие принимались неприживление/отторжение, рецидив/прогрессия, смерть). Дата цензурирования данных – 31.12.2024.

В группе треосульфана чаще встречались острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) и первичные иммунодефицитные состояния (ПИДс), в группе ТОТ преимущественно были пациенты с острыми лимфобластными лейкозами (ОЛЛ) (*таблица 1*).

Пациентам проводили кондиционирование в следующем составе (представлены суммарные дозы): треосульфан 42 г/м^2 или ТОТ 12 Гр; флударабин 150 мг/м^2; дополнительным алкилятором в 50% случаев выступала тиотепа 10 мг/кг, у 28%

пациентов использовался этопозид 60 мг/кг, с меньшей частотой применялись мелфалан 140 мг/м^2 и циклофосфамид 50–150 мг/кг, включая посттрансплантационный. Для элиминации В-клеток 75 из 112 пациентов получали ритуксимаб в дозе 100–375 мг/м^2. Пациентам с ПИДс и незлокачественной патологией крови проводили также серотерапию в виде антитимоцитарного иммуноглобулина.

В качестве доноров чаще всего выступали родители (гаплоидентичные родственные доноры). Источником гемопоэтических стволовых клеток более чем в 70% случаев были периферические стволовые клетки крови с TCRαβ$^+$/CD19$^+$-деплецией (деплеция проводилась на аппаратах CliniMACS или CliniMACS Prodigy в соответствии с инструкциями производителя (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Германия)). Остальные пациенты получали костный мозг или периферические стволовые клетки крови с деплецией циклофосфамидом *in vivo*. Неприживление трансплантата констатировано у 5 (10,4%) пациентов в группе треосульфана и у 2 (3,1%) мальчиков из группы ТОТ.

Профилактика РТПХ проводилась 103 из 112 пациентов, иммунные осложнения после ТГСК в остром периоде оценивали у 104 мальчиков, 8 были исключены из анализа (у 7 пациентов не прижился трансплантат, 1 мальчик умер в день ТГСК), поздние осложнения – у 90 пациентов, 22 исключены в связи с событиями до 100-го дня. Диагностику и стадирование острой и хронической РТПХ проводили в соответствии со стандартными критериями (*таблица 2*).

У всех пациентов оценивали гонадотоксичность терапии, проведенной до и после ТГСК, включая облучение мошонки и головного мозга (*таблица 3*). Суммарную гонадотоксичность алкиляторов рассчитывали по формуле: CED (мг/м^2) = 1,0 (КД циклофосфамида (мг/м^2)) + 0,244 (КД ифосфамида (мг/м^2)) + 40 (КД мелфалана (мг/м^2)) + 50 (КД тиотепы (мг/м^2)) [4]. Пересчет доз в мг/м^2 проводился из расчета 1 мг/кг = 30 мг/м^2.

Функцию репродуктивной системы оценивали в 3 точках: точка 1 – до ТГСК в рамках предтрансплантационного обследования, точка 2 – через 6–18 мес и точка 3 – через 24 мес и более после трансплантации. При наличии нескольких обследований более чем через 2 года для оценки репродуктивного статуса выбиралось последнее.

Оценка функции гонад у мальчиков старше 14 лет основывалась на результатах гормонального исследования (фолликулостимулирующий (ФСГ) и лютеинизирующий (ЛГ) гормоны, тестостерон), ультразвукового исследования органов мошонки (определение объема яичек) и общей оценке полового развития по Таннеру.

В подростковом возрасте гипогонадизм может быть заподозрен при отсутствии вторичных половых признаков у мальчиков после 14 лет. В зависимости от уровня нарушения выделяют гипергонадотропный гипогонадизм (первичный), характеризующийся первичным поражением гонад и повышением уровня гонадотропинов, и гипогонадотропный гипогонадизм (вторичный, центральный), когда ухудшение функции половых желез происходит вследствие снижения способности гипоталамуса секретировать гонадолиберин или гипофиза секретировать ЛГ и ФСГ. В зависимости от причин и длительности сниженной секреции гонадотропинов гипогонадотропный гипогонадизм может быть функциональным (транзиторным) или перманентным [16].

Общими клиническими проявлениями гипогонадизма являются недоразвитие наружных половых органов, отсутствие роста волос в андрогензависимых зонах, гипоплазия яичек, высокий тембр голоса, возможно развитие гинекомастии. Для гипогонадиза, возникшего уже после начала пубертата и, соответственно, определенного периода влияния половых гормонов на организм, характерно снижение роста волос на лице, исчезновение поллюций, малый объем мышечной массы, умень-

Таблица 1
Распределение пациентов в группах по диагнозам
Table 1
Patient distribution in the study groups according to the diagnosis

Диагноз Diagnosis	**Все пациенты (*n* = 112), *n* (%)** All patients (*n* = 112), *n* (%)	**Первая группа (треосульфан; *n* = 48), *n* (%)** Group 1 (treosulfan; *n* = 48), *n* (%)	**Вторая группа (ТОТ; *n* = 64), *n* (%)** Group 2 (TBI; *n* = 64), *n* (%)
В-/Т-клеточный ОЛЛ, ОБЛ B-/T-cell ALL, BAL	62 (55,3)	2 (4,2)	60 (93,7)
ОМЛ, миелосаркома AML, myeloid sarcoma	23 (20,5)	22 (45,8)	1 (1,6)
Лимфома (Ходжкина, ALK-/Т-/В-клеточная) Lymphoma (Hodgkin lymphoma, ALK-/T-/B-cell lymphoma)	7 (6,3)	4 (8,3)	3 (4,7)
Аплазии/талассемия/МДС Aplasia/thalassemia/MDS	7 (6,3)	7 (14,6)	0
ПИДс PIDs	13 (11,6)	13 (27,1)	0

Примечание. ОБЛ – острый бифенотипический лейкоз; МДС – миелодиспластический синдром.
Notes. TBI – total body irradiation; ALL – acute lymphoblastic leukemia; BAL – biphenotypic acute leukemia; AML – acute myeloid leukemia; MDS – myelodysplastic syndrome; PIDs – primary immunodeficiencies.

шение объема и плотности яичек, возможно также развитие гинекомастии.

Диагноз вероятного гипогонадизма как первичного, так и вторичного устанавливали при наличии одного из следующих критериев у пациентов в возрасте старше 14 лет: I стадия по шкале Таннера, малый размер яичек (<4 мл в объеме), сниженный/высокий уровень гонадотропинов, сниженный уровень общего тестостерона (при этом оценка по шкале Таннера могла быть I–III). Мальчикам младше 14 лет диагноз гипогонадизма не устанавливался согласно определению, они были включены в анализ в последующие контрольные точки по достижении 14-летнего возраста.

При оценке риска развития гипогонадизма были исключены пациенты с событиями до 1 года после ТГСК. Анализ проводили методом кумулятивной вероятности с учетом конкурирующих событий, за события принимались смерть пациента, рецидив/прогрессия, а также недостаточность трансплантата (неприживление, отторжение). Пациенты старше 14 лет с гипогонадизмом на момент предтрансплантационного обследования, а также при отсутствии данных о репродуктивной системе в точке 1 были

Таблица 2
РТПХ: профилактика и терапия
Table 2
GVHD: prevention and treatment

Показатель Parameter	Все пациенты All patients	Первая группа (треосульфан) Group 1 (treosulfan)	Вторая группа (ТОТ) Group 2 (TBI)
Профилактика РТПХ: да/нет, *n*: GVHD prevention: yes/no, *n*:	103/9	39/9	64/0
абатацепт + тоцилизумаб ± бортезомиб, *n* (%) abatacept + tocilizumab ± bortezomib, *n* (%)	67 (65)	20 (51,3)	47 (73,4)
циклоспорин А/такролимус ± ведолизумаб/метотрексат/микофенолата мофетил ± абатацепт, *n* (%) cyclosporine A/tacrolimus ± vedolizumab/methotrexate/mycophenolate mofetil ± abatacept, *n* (%)	29 (28,2)	15 (38,5)	14 (21,9)
барицитиниб + ведолизумаб + абатацепт, *n* (%) baricitinib + vedolizumab + abatacept, *n* (%)	5 (4,9)	2 (5,1%)	3 (4,7)
другое, *n* (%) other, *n* (%)	2 (1,9)	2 (5,1)	0
Ингибиторы кальциневрина >1 мес, *n* Treatment with calcineurin inhibitors > 1 month, *n*	22	10	12
Острая РТПХ, *n*: Acute GVHD, *n*:	104	43	61
II–IV стадии, *n* (%) grade II–IV, *n* (%)	42 (40,4)	16 (37,2)	26 (42,6)
III–IV стадии, *n* (%) grade III–IV, *n* (%)	10 (9,6)	6 (14)	4 (6,6)
Системная терапия острой РТПХ, *n* (%) Systemic treatment for acute GVHD, *n* (%)	27 (26)	15 (34,9)	12 (19,7)
Хроническая РТПХ, *n* (%) Chronic GVHD, *n* (%)	18/90 (20)	8/40 (20)	10 (20)
Системная терапия хронической РТПХ, *n* (%) Systemic treatment for chronic GVHD, *n* (%)	9 (10)	3 (7,5)	6 (12)
Другие осложнения, потребовавшие ИСТ/ПХТ, *n* (%) Other complications that required IST/MAC, *n* (%)	5 (4,8)	2 (4,7)	3 (4,9)

Примечание. ПХТ – полихимиотерапия.
Notes. GVHD – graft-versus-host disease; IST – immunosuppressive therapy; MAC – multiagent chemotherapy.

Таблица 3
Гонадотоксичные факторы в перитрансплантационном периоде
Table 3
Gonadotoxic factors in the peri-transplant period

Показатель Parameter	Все пациенты (*n* = 112), *n* (%) All patients (*n* = 112), *n* (%)	Первая группа (треосульфан; *n* = 48), *n* (%) Group 1 (treosulfan; *n* = 48), *n* (%)	Вторая группа (ТОТ; *n* = 64), *n* (%) Group 2 (TBI; *n* = 64), *n* (%)
Гонадотоксичная терапия до ТГСК Gonadotoxic therapy before HSCT			
Алкиляторы </>4000 мг/м^2 Alkylating agents </>4000 mg/m^2	107/5 (4,5)	45/3 (6,25)	62/2 (3,1)
Краниальное облучение 12–18 Гр Cranial irradiation 12–18 Gy	11 (9,8)	1 (2)	10 (15,6)
Гонадотоксичная терапия после ТГСК Gonadotoxic therapy after HSCT			
Ингибиторы кальциневрина >1 мес Treatment with calcineurin inhibitors > 1 month	8 (7)	5 (10,4)	3 (4,7)
Глюкокортикостероиды >3 мес Treatment with glucocorticosteroids > 3 months	18 (16,1)	8 (16,7)	10 (15,6)
CED >4000 мг/м^2 CED >4000 mg/m^2	2 (1,8)	0	2 (3,1)

исключены из анализа кумулятивной вероятности развития гипогонадизма.

Статистическая обработка полученных данных проводилась с помощью программы R-Studio.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Медиана наблюдения всей когорты составила 1 (0–6,3) год, в группах треосульфана и ТОТ – 1,2 года и 1 год соответственно. Медиана наблюдения при оценке гипогонадизма – 3,2 (0,5–5,5) года и 3,6 (0,8–6,2) года в группах соответственно.

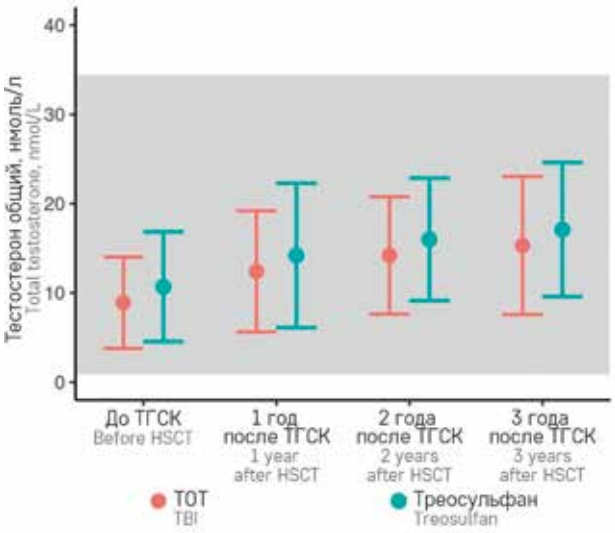
Медиана возраста на момент последней оценки гипогонадизма (n = 37) в группе треосульфана (n = 16) составила 16,3 (14,3–18,8) года, в группе ТОТ (n = 21) – 17,3 (14,1–19,2) года.

Проведена оценка уровня тестостерона и гонадотропинов в динамике после ТГСК. Клетки Лейдига, задачей которых является продукция тестостерона, более резистентны к специфической терапии, чем клетки Сертоли [17, 18]. Наше исследование также подтверждает эти данные, показатели уровня тестостерона за время наблюдения остаются в пределах нормы (*рисунок 1*).

При оценке уровня гонадотропных гормонов получены следующие данные (*рисунок 2*): у пациентов с треосульфаном в кондиционировании показатели ниже, чем в группе с ТОТ, при этом уровень ЛГ оставался в пределах референсных значений. ЛГ связан с дисфункцией клеток Лейдига, поэтому так же, как и тестостерон, остается в пределах нормы [19, 20]. В своем исследовании A. Cattoni и соавт.

Рисунок 1
Динамика уровня тестостерона после ТГСК (среднее, 95% доверительный интервал)
Серый коридор – границы нормы для тестостерона: 0,86–34,41 нмоль/л

Figure 1
Testosterone levels after HSCT measured over time (the mean, 95% confidence interval)
The grey area indicates the reference range for testosterone: 0.86–34.41 nmol/L



разница в уровне тестостерона, это подтверждает гипотезу о медленно прогрессирующем ухудшении функции клеток Лейдига, вызванном ТОТ [7]. В нашем исследовании также отмечается медленная отрицательная динамика в уровне показателей тестостерона и ЛГ (*рисунки 1, 2*).

При анализе динамики ФСГ после ТГСК отмечается повышение показателей нормы до 1,5 раза в 1-й год после ТГСК, далее снижение до нормальных значений к 3 годам после трансплантации. Исследования, проведенные в 1970–80-х годах, показали, что после цитотоксической терапии уровень ФСГ повышается с последующим снижением, это связано с транзиторным (функциональным) гипогонадизмом и дальнейшим восстановлением сперматогенеза [16, 19–23]. Однако стоит помнить, что ФСГ может оставаться выше границ нормы при сохранении сперматогенеза и снижаться без восстановления сперматогенеза. Второй вариант, вероятно, связан с истощением секреторной функции гипофиза.

Кумулятивная частота развития гипогонадизма (*рисунок 3*) в общей группе к 4 годам достигала 34%, а в группах треосульфана и ТОТ значимо не отличалась и составляла 36% и 32% соответственно. Однако, по данным литературы, частота компенсированного или явного гипогонадизма после ТОТ значительно выше (41,4% и 25,9% соответственно), чем в режимах кондиционирования без облучения (31,4% и 17,1% соответственно при схемах с бусульфаном, 0% – с треосульфаном, 5,3% случаев явного гипогонадизма при других режимах) [7]. Оценка влияния только одной гонадотоксичной составляющей, вводимой как часть протокола кондиционирования, включающего другие химиопрепараты, может привести к ошибочным выводам. Для полноценного понимания причин повреждения репродуктивной системы после проведенного кондиционирования необходимо определить суммарную гонадотоксичность всех вводимых препаратов.

Для унификации оценки в качестве фактора риска азооспермии введена CED.

По данным S. Mathiesen и соавт., определено пороговое значение CED >10 г/м^2, при таких значениях у всех пациентов была азооспермия, при дозах ниже 6 г/м^2 сперматогенез сохранялся [8]. Учитывая эти данные, нами была проведена попытка оценить вклад в развитие гипогонадизма тиотепы, CED которой составляет 15 000 мг/м^2 и более чем в 2 раза превышает максимальную дозу циклофосфамида (6000 мг/м^2) или мелфалана (5600 мг/м^2) в кондиционировании. Мы оценивали кумулятивную частоту развития гипогонадизма в 3 группах CED: ≥15 000, 4000–14 999, <4000 мг/м^2. По нашим данным, как и по данным литературы [5, 6], пациенты с

CED ≥4000 мг/м² имели схожую, бóльшую кумулятивную частоту развития гипогонадизма по сравнению с группой с CED <4000 мг/м², значимой разницы в группах ≥15 000 и 4000–14 999 мг/м² обнаружено не было (*рисунок 4А*).

Нами проведена оценка вклада суммарной дозы алкиляторов в развитие гипогонадизма в группах треосульфана и ТОТ отдельно: случаев развития гипогонадизма в группе треосульфана с CED <4000 мг/м² не зафиксировано, у пациентов с ТОТ и CED ≥4000 мг/м² гипогонадизм развивается стремительно в первые годы после ТГСК, а токсичность треосульфана с высокими дозами других алкиляторов в кондиционировании сравнима с гонадотоксичностью ТОТ (*рисунок 4Б*). Учитывая, что по нашим протоколам кондиционирования 85% пациентов в группе треосульфана получают дополнительно алкиляторы с высокой суммарной CED, можно сделать вывод, что препараты из группы алкиляторов вносят значимый вклад в развитие кумулятивной

Рисунок 2
Динамика концентрации половых гормонов после ТГСК (среднее, 95% доверительный интервал): А – ЛГ; Б – ФСГ
Серый коридор – границы нормы: для ФСГ 1,5–12,4 мМЕд/мл, для ЛГ 1,7–8,6 мМЕд/мл

Figure 2
Sex hormone concentrations after HSCT measured over time (the mean, 95% Confidence Interval): A – luteinizing hormone (LH); Б – follicle-stimulating hormone (FSH)
In each graph, the grey area indicates the reference range: 1.5–12.4 mIU/mL for FSH, 1.7–8.6 mIU/mL for LH

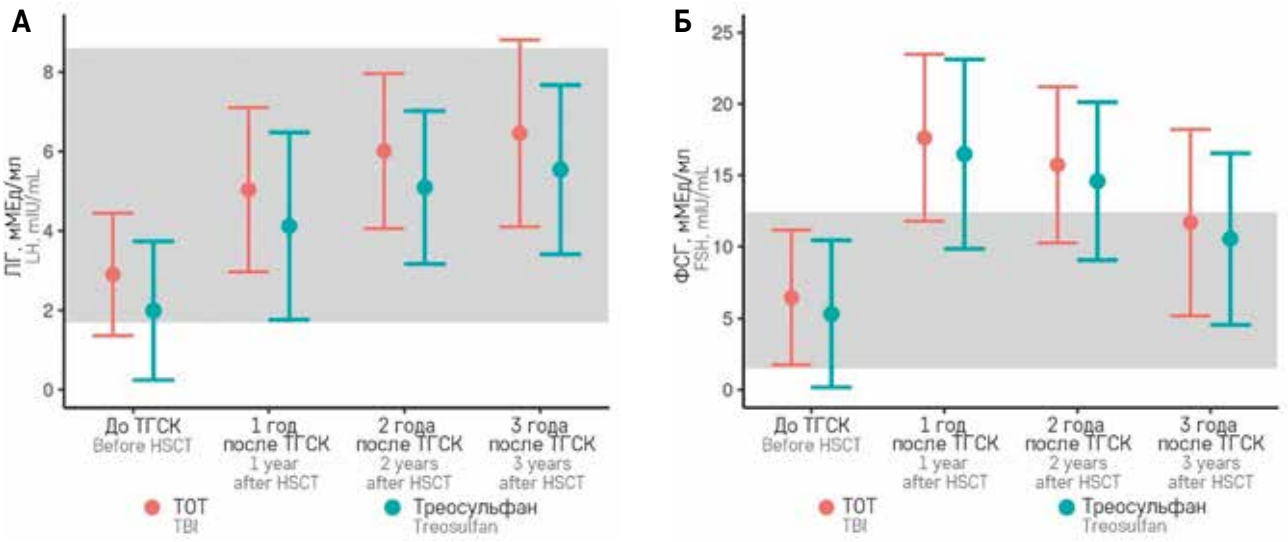
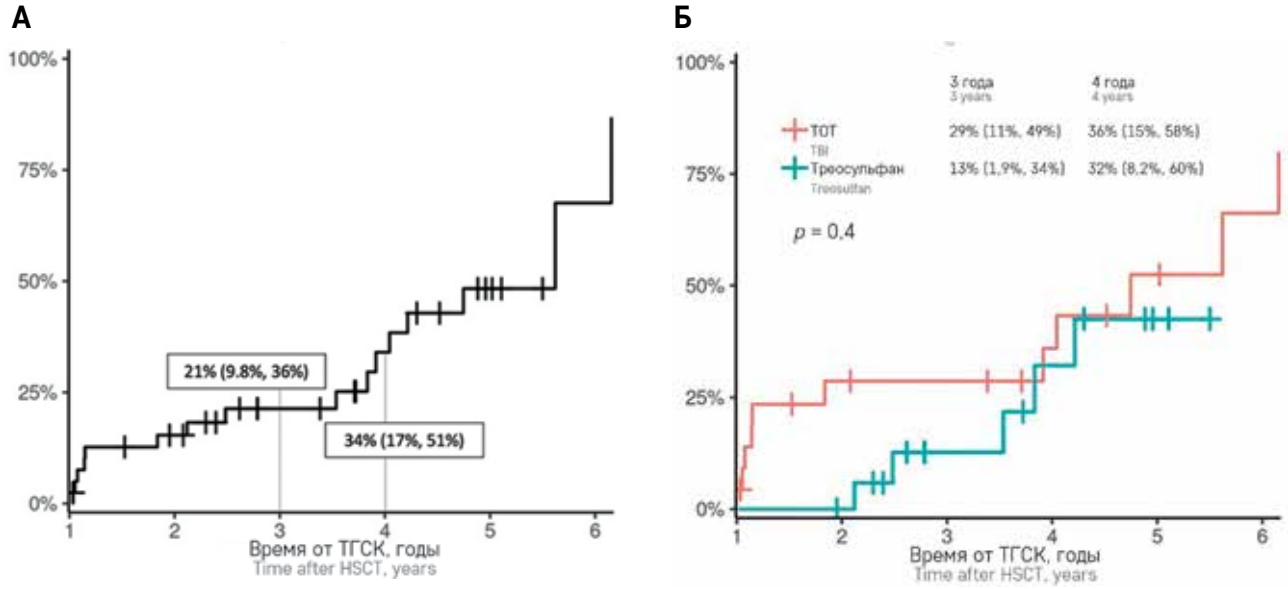


Рисунок 3
Кумулятивная частота развития гипогонадизма: А – в общей группе; Б – в зависимости от режима кондиционирования

Figure 3
The cumulative incidence of hypogonadism: A – in the entire group; Б – according to the conditioning regimen



вероятности гипогонадизма в протоколах кондиционирования с треосульфаном.

Для оценки вклада в развитие гипогонадизма других посттрансплантационных факторов проведена оценка кумулятивной вероятности развития гипогонадизма в зависимости от развития РТПХ и проводимой ИСТ. По нашим данным, пациенты с течением острой РТПХ II–IV стадии и терапией ингибиторами кальциневрина и глюкокортикостероидами имеют меньшие риски развития гипогонадизма как в общей группе (к 4 годам после ТГСК 25% с РТПХ и 44% без нее; p = 0,13), так и при анализе в группах 1 и 2. Вероятно, это связано с тем, что хроническое воспаление при РТПХ отрицательно влияет на репродуктивную функцию у мужчин, а ИСТ, проводимая в этом случае, может привести к контролю за воспалением. В значительном количестве наблюдательных исследований у пациентов, находящихся на длительной терапии преднизолоном для лечения хронического воспалительного заболевания, уровень тестостерона был ниже по сравнению с нелечеными пациентами контрольных групп, хотя рандомизированные контролируемые исследования не проводились [11].

При течении хронической РТПХ отмечается больший риск развития гипогонадизма (*рисунок 5*). Это объясняется тем, что системные воспалительные факторы, как и ИСТ, длительно влияют на всю репродуктивную систему. На данный момент различия в кривых в пределах обычной погрешности. Очень вероятно, что другие факторы (особенно терапия и CED) мешают нам увидеть самостоятельный эффект хронической РТПХ. В литературе описаны исследования как подтверждающие вклад хронической РТПХ в нарушение работы гонад [9], так и опровергающие связь данного осложнения с риском азооспермии [8] и развитием гипогонадизма [24].

Для более глубокого исследования вклада в развитие гипогонадизма инициальной терапии до ТГСК, а также облучения яичек и головного мозга в рамках кондиционирования требуются оценка большей когорты пациентов и регулярное лонгитюдное наблюдение.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В нашем исследовании показано, что при проведении аллогенной ТГСК воздействие треосульфансодержащего кондиционирования оказывает меньший эффект на функцию половых желез у мальчиков, чем ТОТ. Однако значимый вклад других алкиляторов в составе предтрансплантационной подготовки нивелирует разницу при развитии гипогонадизма. Также нами не получено достоверных данных о влиянии РТПХ и проводимой ИСТ на развитие гипогонадизма. Недостаточное число пациентов и недисциплинированность в проведении контрольных исследований со стороны пациентов и их семей могут ограничивать статистический потенциал исследования. Для полноценного понимания репродуктивного потенциала пациентов необходим регулярный продолженный ежегодный мониторинг, а также при достижении возраста 18 лет – объективная оценка фертильности с помощью анализа спермограммы. Дальнейшее изучение данного вопроса является весьма актуальным в связи с нарастающим числом реципиентов ТГСК, вступающих во взрослую жизнь. Оно позволяет

Рисунок 4
Кумулятивная частота развития гипогонадизма в зависимости от CED: А – в общей группе; Б – в зависимости от режима кондиционирования

Figure 4
The cumulative incidence of hypogonadism according to CED: A – in the entire group; Б – according to the conditioning regimen

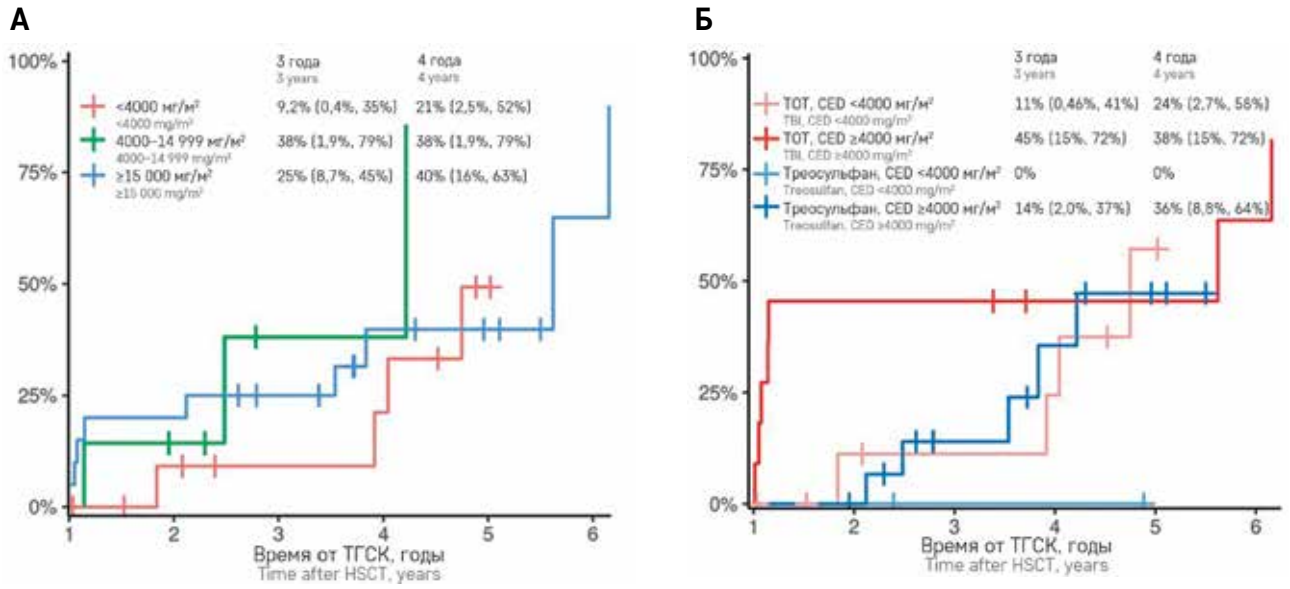
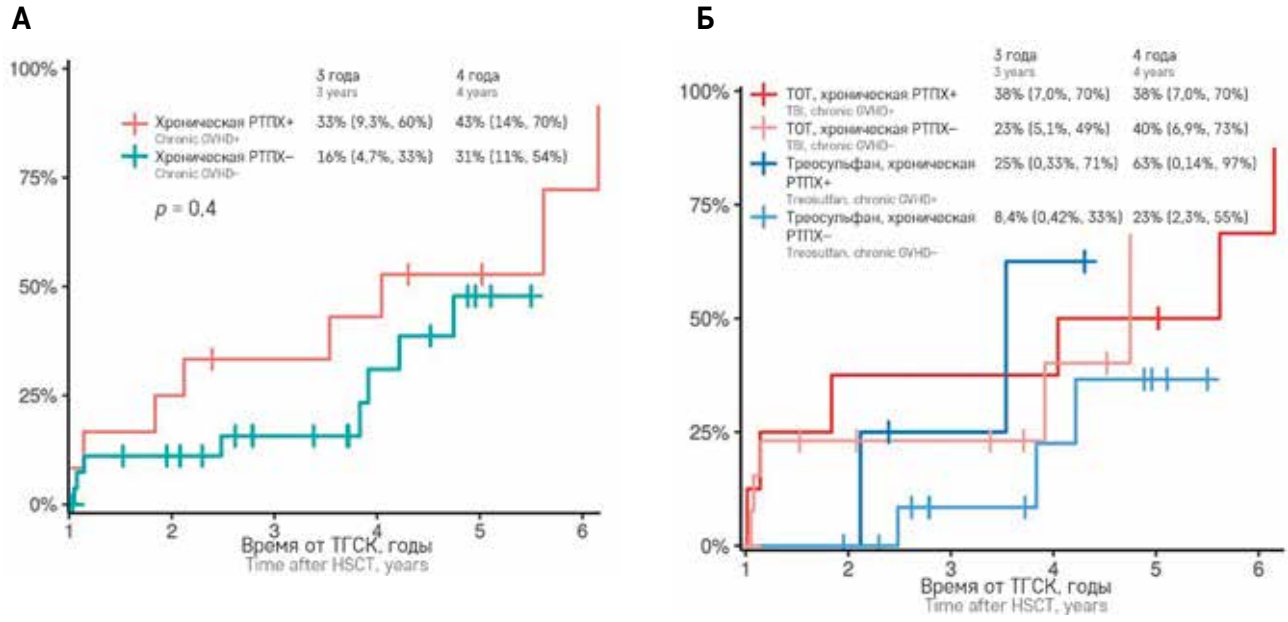


Рисунок 5
Кумулятивная частота развития гипогонадизма у пациентов с хронической РТПХ и без нее: А – в общей группе; Б – в зависимости от режима кондиционирования

Figure 5
The cumulative incidence of hypogonadism in the patients with/without chronic GVHD: A – in the entire group; Б – according to the conditioning regimen



помочь юношам в адаптации, решении социальных и репродуктивных вопросов, а также поднимает важность разработки способов эффективного сохранения фертильности у пациентов до ТГСК.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ
Не указан.

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

ORCID
Sultanova E.R. ORCID: https://orcid.org/0000-0003-0319-3699
Ilyina E.Yu. ORCID: https://orcid.org/0000-0002-9177-5252
Shasheleva D.A. ORCID: https://orcid.org/0000-0002-5641-8567
Vinokurov A.A. ORCID: https://orcid.org/0000-0003-0441-0034
Protsvetkina A.V. ORCID: https://orcid.org/0000-0001-8562-8945
Delyagin W.M. ORCID: https://orcid.org/0000-0001-8149-7669
Skvortsova Yu.V. ORCID: https://orcid.org/0000-0002-0566-053X

Литература / References

1. Shalitin S., Pertman L., Yackobovitch-Gavan M., Yaniv I., Lebenthal Y., Phillip M., et al. Endocrine and Metabolic Disturbances in Survivors of Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Childhood and Adolescence. Horm Res Paediatr 2018; 89 (2): 108–21.
2. Султанова Э.Р., Скворцова Ю.В., Делягин В.М. Влияние аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток на репродуктивную функцию, способы профилактики и коррекции нарушений фертильности. Лечение и профилактика 2024; 14 (4): 42–9. [Sultanova E.R., Skvortsova Yu.V., Delyagin W.M. The impact of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation on reproductive health, methods of prevention and treatment of fertility issues. Prevention and Treatment 2024; 14 (4): 42–9. (In Russ.)].
3. Hall E., Giaccia A. Clinical response of normal tissue. Radiobiology for the Radiologist. 7th ed. Philadelphia: Wiliams & Wilkins; 2012.
4. Green D.M., Nolan V.G., Goodman P.J., Whitton J.A., Srivastava D., Leisenring W.M., et al. The cyclophosphamide equivalent dose as an approach for quantifying alkylating agent exposure: a report from the Childhood Cancer Survivor Study. Pediatr Blood Cancer 2014; 61 (1): 53–67.
5. Huang I.S., Fantus R.J., Halpern J.A., Wren J., Bennett N.E., Pham M.N., et al. Association of the minimal cyclophosphamide equivalent dose and outcome of microdissection testicular sperm extraction in patients with persistent azoospermia after chemotherapy. F S Rep 2023; 5 (1): 95–101.
6. Green D.M., Liu W., Kutteh W.H., Ke R.W., Shelton K.C., Sklar C.A., et al. Cumulative alkylating agent exposure and semen parameters in adult survivors of childhood cancer: a report from the St Jude Lifetime Cohort Study. Lancet Oncol 2014; 15 (11): 1215–23.
7. Cattoni A., Nicolosi M.L., Capitoli G., Gadda A., Molinari S., Louka S., et al. Pubertal attainment and Leydig cell function following pediatric hemato-

poietic stem cell transplantation: a three-decade longitudinal assessment. Front Endocrinol (Lausanne) 2023; 14: 1292683.
8. Mathiesen S., Sørensen K., Nielsen M.M., Suominen A., Ifversen M., Grell K., et al. Male gonadal function after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in childhood: a cross-sectional, population-based study. Biol Blood Marrow Transplant 2020; 26 (9): 1635–45.
9. Rovó A., Aljurf M., Chiodi S., Spinelli S., Salooja N., Sucak G., et al. Ongoing graft-versus-host disease is a risk factor for azoospermia after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a survey of the Late Effects Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. Haematologica 2013; 98 (3): 339-45.
10. Hampl R., Stárka L. Glucocorticoids affect male testicular steroidogenesis. Physiol Res 2020; 69 (Suppl 2): S205–10.
11. Drobnis E.Z., Nangia A.K. Immunosuppressants and Male Reproduction. Adv Exp Med Biol 2017; 1034: 179–210.
12. Peters C., Dalle J.H., Locatelli F., Poetschger U., Sedlacek P., Buechner J., et al. Total Body Irradiation or Chemotherapy Conditioning in Childhood ALL: A Multinational, Randomized, Noninferiority Phase III Study. J Clin Oncol 2021; 39 (4): 295–307.
13. Wachowiak J., Chybicka A., Boruczkowski D., Gorczyńska E., Kalwak K., Leda M. 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 (Suppl 1): S12 (abstract 16).
14. Saglio F., Pagliara D., Zecca M., Balduzzi A., Cattoni A., Prete A., et al. Long-term complications after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation with treosulfan- or busulfan-based conditioning in pediatric patients with acute leukemia or myelodysplastic syndrome: results of an associazione italiana ematologia oncologia pediatrica retrospective study. Transplant Cell Ther 2024; 30 (4): 433.e1–10.
15. Скворцова Ю.В., Новичкова Г.А., Масчан М.А., Балашов Д.Н., Папуша Л.И., Шипицына И.П. и др. Сравнительная оценка влияния треосульфан- и бусульфан-содержащих миелоаблативных режимов кондиционирования на поздние осложнения аллогенных ТГСК при злокачественных заболеваниях у детей. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2018; 17 (2): 28–38. DOI: 10.24287/1726-1708-2018-17-2-28-38 [Skvortsova Yu.V., Novichkova G.A., Maschan M.A., Balashov D.N., Papusha L.I., Shipitsina I.P., et al. Late effects after treosulfan- and busulfan-based myeloablative conditioning for allogeneic HSCT in children with malignant diseases: a comparative study. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology 2018; 17 (2): 28–38. (In Russ.)].
16. Palmert M.R., Dunkel L. Clinical practice. Delayed puberty. N Engl J Med 2012; 366 (5): 443–53.
17. Grigg A.P., McLachlan R., Zaja J., Szer J. Reproductive status in long-term bone marrow transplant survivors receiving busulfan-cyclophosphamide (120 mg/kg). Bone Marrow Transplant 2000; 26 (10): 1089–95.
18. Faraci M., Barra S., Cohen A., Lanino E., Grisolia F., Miano M., et al. Very late nonfatal consequences of fractionated TBI in children undergoing bone marrow transplant. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2005; 63 (5): 1568–75.
19. Howell S.J., Shalet S.M. Testicular function following chemotherapy. Hum Reprod Update 2001; 7 (4): 363–9.
20. Gradishar W.J., Schilsky R.L. Effects of cancer treatment on the reproductive system. Crit Rev Oncol Hematol 1988; 8: 153–71.
21. Rowley M.J., Leach D.R., Warner G.A., Heller C.G. Effect of graded doses of ionizing radiation on the human testis. Radiat Res 1974; 59 (3): 665–78.
22. Pineau C., Velez de la Calle J.F., Pinon-Lataillade G., Jégou B. Assessment of testicular function after acute and chronic irradiation: further evidence for an influence of late spermatids on Sertoli cell function in the adult rat. Endocrinology 1989; 124 (6): 2720–8.
23. Delic J.I., Hendry J.H., Morris I.D., Shalet S.M. Dose and time relationships in the endocrine response of the irradiated adult rat testis. J Androl 1986; 7 (1): 32–41.
24. Gokcebay D.G., Azik F., Bayram C., Erdem A.Y., Fettah A., Isik P., et al. Evaluation of endocrine and metabolic dysfunctions after hematopoietic stem cell transplantation in children: a study from Turkey. J Pediatr Endocrinol Metab 2017; 30 (6): 683–91.

DOI: 10.24287/1726-1708-2025-24-2-55-61

Результаты трансплантаций гемопоэтических стволовых клеток у детей с приобретенной апластической анемией с использованием мелфалансодержащих режимов кондиционирования

Е.В. Скоробогатова, Е.Б. Мачнева, Л.В. Ольхова, Ю.А. Николаева, М.М. Антошин

Российская детская клиническая больница – филиал ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, Москва

Несмотря на высокую эффективность трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) у детей с приобретенной апластической анемией (ПАА), недостаточность и отторжение трансплантата остаются одной из основных проблем. Факторами риска отторжения и гипофункции трансплантата, персистенции смешанного химеризма являются аллосенсибилизация, недостаточные количественные характеристики трансплантата, относительно сохранный собственный миелопоэз. Обеспечения долгосрочного приживления трансплантата возможно достичь путем модификации режима кондиционирования и иммуносупрессивной профилактики. Одной из перспективных опций является включение мелфалана в схему кондиционирования. Проведен ретроспективный анализ результатов ТГСК с использованием мелфалансодержащих режимов кондиционирования у 21 ребенка с ПАА (18 первичных, 3 повторных ТГСК): 11 от полностью совместимых неродственных доноров, 9 совместимых родственных, 1 гаплоидентичного. Основанный на ингибиторах кальциневрина режим профилактики реакции «трансплантат против хозяина» получили 9 детей, на ингибиторах янус-киназ – 12. Удовлетворительная функция трансплантата достигнута у всех детей при отсутствии тяжелых осложнений. По данным итоговых результатов у 95% пациентов определен общий полный донорский химеризм, по $CD3^+$-линии 85,7% с долей собственных клеток (СК) 9–13%. Включение мелфалана в режим кондиционирования у пациентов с ПАА перед ТГСК в сочетании с новыми менее токсичными схемами профилактики реакции «трансплантат против хозяина» может стать эффективной опцией преодоления риска отторжения трансплантата при низком уровне токсичности и частоты развития осложнений. Исследование одобрено независимым этическим комитетом и утверждено решением ученого совета ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России.

Ключевые слова: *дети, мелфалан, отторжение трансплантата, приобретенная апластическая анемия, смешанный химеризм, трансплантация гемопоэтических стволовых клеток, ингибиторы янус-киназ*

Скоробогатова Е.В. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2025; 24 (2): 55–61. DOI: 10.24287/1726-1708-2025-24-2-55-61

© 2025 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России

Поступила 11.05.2025
Принята к печати 06.06.2025

EDN: IAQLOL

Контактная информация:
Скоробогатова Елена Владимировна, д-р мед. наук, заведующая отделением трансплантации костного мозга Российской детской клинической больницы – филиала ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России
Адрес: 119571, Москва, Ленинский пр-т, 117, корп. 1
E-mail: skorobog.e@mail.ru

Outcomes of hematopoietic stem cell transplantation using melphalan-based conditioning in children with acquired aplastic anemia

E.V. Skorobogatova, E.B. Machneva, L.V. Olkhova, Yu.A. Nikolaeva, M.M. Antoshin

The Russian Children's Clinical Hospital of the N.I. Pirogov Russian National Research Medical University of Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow

Despite the high effectiveness of hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) in children with acquired aplastic anemia (AAA), the procedure can still result in such major issues as graft failure and rejection. Risk factors for graft rejection and poor function as well as the persistence of mixed chimerism include allosensitization, insufficient number of transplanted cells and relatively preserved native myelopoiesis. Long-term engraftment can be achieved by modifying conditioning and immunosuppressive therapy. One such promising approach is the inclusion of melphalan in a conditioning regimen. In our study, we retrospectively analyzed outcomes of HSCT with melphalan-based conditioning carried out in 21 children with AAA (for 18 patients, it was their first HSCT, while 3 had a repeat HSCT): out of these, 11 patients received transplants from matched unrelated donors, 9 received transplants from matched related donors and 1 – from a haploidentical donor. Nine children received calcineurin inhibitor-based graft-versus-host disease prophylaxis while 12 children received Janus kinase inhibitors. A good graft function was achieved in all the children, without any severe complications. As per the latest findings, 95% of the patients achieved full total donor cell chimerism, 85.7% of the patients had full donor chimerism in the $CD3^+$ cell lineage, while 14.3% had mixed $CD3^+$ cell chimerism with 9–13% of own cells. The inclusion of melphalan in a conditioning regimen in patients with AAA before HSCT in combination with new less toxic graft-versus-host disease prophylaxis regimens may be an effective strategy to overcome the risk of graft rejection and ensure a low toxicity profile and low incidence of complications. The study was approved by the Independent Ethics Committee and the Scientific Council of the N.I. Pirogov Russian National Research Medical University of Ministry of Healthcare of the Russian Federation.

Key words: *children, melphalan, graft rejection, acquired aplastic anemia, mixed chimerism, hematopoietic stem cell transplantation, Janus kinase inhibitors*

Skorobogatova E.V., et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology 2025; 24 (1): 55–61. DOI: 10.24287/1726-1708-2025-24-1-55-61

© 2025 by «D. Rogachev NMRCPHOI»

Received 11.05.2025
Accepted 06.06.2025

Correspondence:
Elena V. Skorobogatova, Dr. Med. Sci., Head of the Department of Bone Marrow Transplantation at the Russian Children's Clinical Hospital of the N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, Ministry of Healthcare of the Russian Federation
Address: 1 Samory Mashela St., Moscow 117997, Russia
E-mail: skorobog.e@mail.ru

Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) от HLA-совместимого родственного донора у детей является первой линией терапии тяжелых и сверхтяжелых форм приобретенной апластической анемии (ПАА) [1]. Раннее проведение трансплантации позволяет излечивать около 90% пациентов [2, 3]. Трансплантации от неродственных и гаплоидентичных доноров проводятся в случаях неэффективности курсов иммуносупрессивной терапии [2]. Общеизвестно, что риск неприживления/отторжения трансплантата при ПАА значительно выше, чем при злокачественных заболеваниях. В ранних исследованиях частота отторжения достигала 30%, в настоящее время этот риск составляет около 10% [1]. Проблемы отторжения и гипофункции трансплантата, персистенции смешанного химеризма (СХ) связаны с множеством факторов, наиболее значимыми среди которых являются аллосенсибилизация к минорным антигенам гистосовместимости в связи с частыми трансфузиями препаратов крови, немиелоаблативное кондиционирование, недостаточные количественные характеристики трансплантата [1].

Кроме того, относительно сохранный миелопоэз у некоторых пациентов с ПАА, получивших стандартное иммуноаблативное кондиционирование, может быть предиктором первичного неприживления трансплантата, последующей персистенции СХ и отторжения. Высокий риск неприживления наблюдается у пациентов с длительным анамнезом заболевания, получивших более 10 гемотрансфузий, рефрактерных к трансфузиям тромбоцитов, независимо от их числа, или у трансфузированных от родственников [4]. Использование лейкодеплетированных компонентов крови частично позволило решить проблему аллоиммунизации [5]. Критерием адекватности дозы трансплантированных стволовых клеток служит количество $CD34^+$, превышающее 3×10^6/кг массы тела реципиента с ПАА, что не всегда достижимо при использовании миелоинфузии и возможно только при трансплантации периферических стволовых клеток крови (ПСКК). Недостаточное количество Т-лимфоцитов в трансплантате также ассоциировано с высоким риском неприживления и отторжения. По этим причинам пуповинная кровь и $CD34^+$-селектированный трансплантат не являются оптимальными опциями при ТГСК у пациентов с ПАА [1, 6].

Обеспечение долгосрочного приживления трансплантата путем модификации режима кондиционирования и схемы иммуносупрессивной терапии эволюционировало за 30 лет существования отделения трансплантации костного мозга РДКБ на основании современных тенденций. Режимы кондиционирования на основе бусульфана и циклофосфамида около 25 лет назад заменило иммуноаблативное кондиционирование с использованием циклофосфамида, флударабина и антитимоцитарного глобулина (АТГ) [2, 7]. При ТГСК от альтернативных доноров в кондиционирование были введены торакоабдоминальное облучение (thoracoabdominal irradiation, TAI), тиофосфамид или мелфалан [2, 7, 8].

Длительная (не менее 1 года) посттрансплантационная иммуносупрессивная профилактика позволяет у пациентов с ПАА улучшить функцию трансплантата. Посттрансплантационный циклофосфамид, менее токсичные ингибиторы янус-киназ в комбинации с другими иммуносупрессантами постепенно приходят на смену традиционным блокаторам кальциневрина, метотрексату, микофенолатам [1, 7, 9].

Включение мелфалана в схему кондиционирования сначала у пациентов при неродственной ТГСК, повторной трансплантации от родственных доноров, а затем и при первичном кондиционировании при родственных совместимых ТГСК, использование в большинстве случаев ПСКК показало высокую эффективность у детей с ПАА, ассоциированную во всех случаях с приживлением трансплантата, отсутствием отторжений, полным донорским химеризмом (ПДХ), низким профилем токсичности и отсутствием летальных исходов [1, 7, 8].

Стандартизировать подходы к выбору режима кондиционирования и профилактике реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ) действительно сложно в связи с множеством индивидуальных сопутствующих факторов (тяжесть основного заболевания, соматический, инфекционный, токсический статус пациента, источник гемопоэтических стволовых клеток). Создание мультицентровых протоколов лечения осложняется постоянно возникающими инновационными подходами, которые делают столь привлекательным персонализированный подход к терапии для каждого пациента для достижения наилучших результатов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Проведен ретроспективный анализ результатов ТГСК у детей с ПАА, выполненных в отделении трансплантации костного мозга Российской детской клинической больницы – филиала ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России с 2021 по 2025 г. Исследование одобрено независимым этическим комитетом и утверждено решением ученого совета ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России. Медиана наблюдения за пациентами после ТГСК составила 25 (4–48) мес. За анализируемый период проведено 39 ТГСК у 36 пациентов с ПАА, из них мелфаланосодержащие режимы получил 21 ребенок: 18 первичных и 3 повторных. Повторные ТГСК проводились в 1 случае после первичного

неприживления трансплантата, в 2 – после отторжения, возникших после иммуноаблативного кондиционирования, при повторных ТГСК использовались ПСКК от того же HLA-совместимого сиблинга. Трансплантации от полностью совместимых неродственных доноров (СНД) проведены 11 (52,4%) пациентам, от полностью совместимых родственных доноров (СРД) – 7 (33,3%), 9/10 HLA-СРД – 2 (9,5%), в 1 (4,8%) случае выполнена гаплоидентичная трансплантация. У всех пациентов использовался нативный трансплантат: костный мозг (КМ) – в 10 (47,6%) случаях (9 СНД, 1 СРД), ПСКК – в 11 (52,4%) (2 СНД, 8 СРД, 1 гаплоидентичный донор). Возраст больных на момент ТГСК составлял от 5 до 17 лет (медиана – 10 лет). Детальная характеристика группы пациентов представлена в *таблице 1*.

Интенсивность режима кондиционирования обусловливалась видом и источником гемопоэтических стволовых клеток, особенностями статуса по основному заболеванию, определяющими риск отторжения трансплантата, сопутствующими осложнениями. У всех детей перед неродственной ТГСК и у 2 пациентов с отторжением родственного трансплантата в режим кондиционирования было включено ТАІ в дозе 2 Гр. Доза флударабина варьировала от 90 до 150 мг/м^2, мелфалана – от 70 до 140 мг/м^2. Более высокие дозы мелфалана применялись в группе пациентов с СНД, СРД 9/10, а также при отторжениях трансплантата. Дозы тимоглобулина и АТГАМ составляли 5–10 мг/кг и 100 мг/кг массы тела реципиента соответственно. У 2 пациенток в связи с предшествующей тяжелой реакцией на введение АТГ был исключен из схемы кондиционирования. Доза циклофосфамида в кондиционировании составляла от 50 до 100 мг/кг, в режиме профилактики РТПХ 25–100 мг/кг массы тела пациента.

Все пациенты в целях профилактики РТПХ и посттрансплантационных лимфопролиферативных заболеваний на –1-е сутки получали ритуксимаб. Основанный на блокаторах кальциневрина режим получили 9 (42,8%) пациентов, на блокаторах янускиназ (руксолитиниб, тофацитиниб) – 12 (57,1%) детей. Короткий курс низких доз метотрексата получили 8 пациентов. Ингибиторы CD80 и CD86, антитела к интерлейкину-6 также дополнительно использовались в схемах иммуносупрессии (абатацепт у 14 детей, в комбинации с тоцилизумабом у 2).

Медиана содержания в трансплантате CD34$^+$-клеток (в расчете на 1 кг массы тела реципиента) для всей группы пациентов составила 8,2 (3,0–13,6) × 10^6/кг, в КМ – 7,6 × 10^6/кг, в ПСКК –10,2 × 10^6/кг. Медиана содержания в трансплантате CD3$^+$-клеток для всей группы пациентов составила 2,0 (0,27–19,0) × 10^8/кг, в КМ – 0,5 × 10^8/кг, в ПСКК – 4,6 × 10^8/кг.

Все пациенты получали стандартную сопроводительную терапию. Профилактика инфекционных осложнений включала вориконазол, рифаксимин, валацикловир, со дня восстановления лейкопоэза всем пациентам назначался триметоприм/сульфаметоксазол. В стимуляции лейкопоэза пациенты не нуждались.

Восстановлением лейкопоэза считался первый из трех последовательных дней, когда у пациента отмечался уровень лейкоцитов в крови более 1,0 × 10^9/л. Всем пациентам проводился систематический мониторинг химеризма периферической крови (ОХ, по CD3$^+$-линии) на 30, 60 и 100-й дни после ТГСК. ПДХ констатировался при выявлении >95% донорских клеток в образце периферической крови.

Статистический анализ

Статистический анализ данных проводился с использованием программы IBM SPSS Statistics, версия 23.0. Для сравнения качественных переменных использован χ^2-тест, количественных переменных – непараметрический U-критерий Манна–Уитни. Различия между сравниваемыми параметрами считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Первичное восстановление лейкопоэза и тромбоцитопоэза достигнуто у всех пациентов. Медиана восстановления лейкопоэза составила 17 (11–38) дней. Орофарингеальный мукозит до II степени в раннем посттрансплантационном периоде развился у 3 (14,3%) пациентов. Жизнеугрожающих инфекционных эпизодов не отмечено. Все осложнения были купированы на фоне проводимой комплексной антибактериальной и симптоматической терапии. Острая РТПХ (оРТПХ) была диагностирована у 9 (42,8%) пациентов: у 5 (23,8%) кожная форма до II степени, у 3 (14,3%) интестинальная форма до II степени, у 1 (4,8%) – печеночная форма I степени. Проявления оРТПХ у большинства пациентов были купированы на фоне интенсификации иммуносупрессивной терапии. Лишь у 2 (9,5%) пациентов в дальнейшем отмечалось развитие легкой формы кожной хронической РТПХ. Тяжелых иммунных осложнений ни у одного пациента отмечено не было.

Помимо частоты инфекционных, токсических и иммунных осложнений на результаты ТГСК влияет динамика гемопоэтического химеризма, поскольку наличие значимого числа собственных гемопоэтических клеток может быть предиктором оттор-

жения трансплантата. В нашем исследовании по результатам мониторинга в периферической крови ОХ и CD3⁺-линейного химеризма в течение периода наблюдения у большинства детей сохранялся ПДХ. По данным последних результатов по ОХ 20 (95%) пациентов имеют ПДХ, у 1 сохраняется 9% СК; по CD3⁺-линии 18 (85,7%) – ПДХ, у 3 пациентов определялся СХ с различной долей СК (9–13%).

Таблица 1
Характеристика пациентов, трансплантатов, режимов кондиционирования, иммуносупрессии, периода наблюдения и исходов

Table 1
The characteristics of the patients, grafts, conditioning regimens, immunosuppression, observation period and outcomes

Пациент Patient	Возраст, годы Age, years	Кондиционирование Conditioning regimens	Профилактика РТПХ GVHD prophylaxis	Донор Donor	Источник гемопоэтических стволовых клеток Stem cell source	Период наблюдения, мес Observation period, months	Итоговый химеризм Resulting chimerism	
							CD3	ОХ TC
№1	7	TAI2/ Flu150/ Thymo10/ CY100/ Mel 140	Rit, Tac, Mtx	СНД MUD	КМ BM	48	13% СК 13% OC	ПДХ FDC
№2	13	TAI2/ Flu150/ Thymo10/ CY100/ Mel 140	Rit, Tac, Mtx	СНД MUD	КМ BM	46	ПДХ FDC	ПДХ FDC
№3	5	TAI2/ Flu150/ Atgam100/ CY100/ Mel 140	Rit, Tac, Mtx	СНД MUD	КМ BM	43	ПДХ FDC	ПДХ FDC
№4	6	Flu150/Atgam100/ CY100/Mel 140	Rit, Mtx, CsA, CY50	СНД MUD	КМ BM	38	ПДХ FDC	ПДХ FDC
№5	10	TAI2/ Flu150/ Thymo10/ CY100/ Mel 100	Rit, Tac, Mtx	СНД MUD	КМ BM	33	9% СК 9% OC	ПДХ FDC
№6	5	TAI2/ Flu150/ Thymo10/ CY100/ Mel 100	Rit, Tac, Mtx, Abatacept	СНД MUD	КМ BM	31	ПДХ FDC	ПДХ FDC
№7	9	Flu150/Thymo10/ CY100/Mel 140	Rit, Tac, Mtx	СНД MUD	КМ BM	27	ПДХ FDC	ПДХ FDC
№8	16	Flu90/Thymo5/Mel 100	Rit, CsA, Abatacept, Tocilizumab	Повторная ТГСК, СРД Repeat HSCT, MSD	ПСКК PBSC	27	ПДХ FDC	ПДХ FDC
№9	8	Flu100/Atgam100/ CY70/Mel 100	Rit, Ruxo, CY50, Abatacept, Tocilizumab	СРД 9/10 9/10 MSD	КМ + ПСКК BM + PBSC	26	ПДХ FDC	ПДХ FDC
№10	17	Flu100/Atgam100/ CY100/Mel 75	Rit, Mtx, CsA	СРД MSD	ПСКК PBSC	25	ПДХ FDC	ПДХ FDC
№11	7	Flu120/Thymo10/ CY70/Mel 100	Rit, Ruxo, CY50, Abatacept	СРД 9/10 9/10 MSD	КМ BM	25	ПДХ FDC	ПДХ FDC
№12	8	TAI 2/ Flu150/ Thymo7/ CY70/Mel 140	Rit, Ruxo, CY50, Abatacept	СНД MUD	КМ BM	23	ПДХ FDC	ПДХ FDC
№13	14	TAI 2/ Flu150/ Thymo7/ CY70/Mel 140	Rit, Ruxo, CY50, Abatacept	СНД MUD	ПСКК PBSC	21	ПДХ FDC	ПДХ FDC
№14	14	TAI 2/ Flu150/ Thymo7/ CY50/Mel 140	Rit, Ruxo, CY100, Abatacept	Гаплоидентичный Haploidentical	ПСКК PBSC	21	ПДХ FDC	ПДХ FDC
№15	14	TAI 2/ Flu150/ Thymo7/ CY70/Mel 140	Rit, Ruxo, CY50, Abatacept	Повторная ТГСК, СРД Repeat HSCT, MSD	ПСКК PBSC	20	10% СК 10% OC	ПДХ FDC
№16	7	TAI 2/ Flu150/ CY70/ Mel 100	Rit, Ruxo, CY80, Abatacept	СНД MUD	КМ BM	20	ПДХ FDC	ПДХ FDC
№17	11	TAI 2/ Flu150/ CY70/ Mel 70	Rit, Ruxo, CY80, Abatacept	СНД MUD	ПСКК PBSC	19	ПДХ FDC	ПДХ FDC
№18	14	TAI 2/ Flu150/ Thymo7/ CY70/Mel 70	Rit, Ruxo, CY50, Abatacept	Повторная ТГСК, СРД Repeat HSCT, MSD	ПСКК PBSC	18	ПДХ FDC	ПДХ FDC
№19	17	Flu100/Thymo10/ CY100/Mel 70	Rit, Tofa, Abatacept	СРД MSD	ПСКК PBSC	10	ПДХ FDC	ПДХ FDC
№20	11	Flu100/Thymo10/ CY100/Mel 70	Rit, Tofa, Abatacept	СРД MSD	ПСКК PBSC	6	ПДХ FDC	Не определялся Not tested
№21	6	Flu100/Thymo10/ CY100/Mel 70	Rit, Tofa, CY25, Abatacept	СРД MSD	ПСКК PBSC	4	ПДХ FDC	9% СК 9% OC

Примечание. TAI – торакоабдоминальное облучение (Гр); Flu – флударабин (мг/м²); Atgam – АТГАМ (мг/кг); Thymo – тимоглобулин (мг/кг); CY – циклофосфамид (мг/кг); Mel – мелфалан (мг/м²); Rit – ритуксимаб; Tac – такролимус; CsA – циклоспорин А; Mtx – метотрексат; Ruxo – руксолитиниб; Tofa – тофацитиниб; Abatacept – абатацепт; Tocilizumab – тоцилизумаб; СРД 9/10 – совместимый 9/10 родственный донор; ОХ – общий химеризм.
Notes. TAI – thoracoabdominal irradiation (Gr); Flu – fludarabine (mg/m²); Atgam (мг/кг); Thymo – thymoglobulin (mg/kg); CY – cyclophosphamide (mg/kg); Mel – melphalan (mg/m²); Rit – rituximab; Tac – tacrolimus; CsA – cyclosporin A; Mtx – methotrexate; Ruxo – ruxolitinib; Tofa – tofacitinib; GVHD – graft-versus-host disease; MSD – matched sibling donor; MUD – matched unrelated donor; 9/10 MSD – 9/10 matched sibling donor; HSCT – hematopoietic stem cell transplantation; PBSC – peripheral blood stem cells; BM – bone marrow, TC – total chimerism; FDC – full donor chimerism; OC – own cells.

Все пациенты живы, тяжелых осложнений ни в одном случае на протяжении всего периода наблюдения зафиксировано не было.

Проанализирована зависимость результатов ТГСК от потенциально значимых факторов – характеристик пациентов, трансплантата, донора, кондиционирования, режима иммуносупрессии.

При анализе влияния различных факторов на сроки восстановления лейкопоэза не выявлено влияния режима профилактики РТПХ, типа донора, включения ТАІ в кондиционирование (*таблица 2*).

Близкие к значимым (p = 0,08) различия выявлены лишь между группами пациентов, получивших разные источники гемопоэтических стволовых клеток – в группе КМ восстановление лейкопоэза происходило дольше, чем в группе ПСКК. Также близки к значимым (p = 0,13) различия длительности восстановления лейкопоэза в зависимости от наличия (медиана 17 дней) или отсутствия (медиана 21 день) редукции дозы мелфалана в кондиционировании – быстрее восстановление происходило при редукции дозы препарата. Кроме того, восстановление лейкопоэза было заметно длительнее (медиана 24,5 дня) в группе пациентов, получивших менее клеточный по $CD34^+$ (менее 4 × 10^6/кг) трансплантат по сравнению с группой пациентов с более клеточным (медиана восстановления лейкопоэза 17 дней), однако ввиду малочисленности групп значимость различий не была достигнута.

При анализе влияния различных факторов на развитие токсических осложнений не выявлено различий в группах с использованием ингибиторов кальциневрина и янус-киназ (p = 0,59), с и без ТАІ (p = 0,41), в зависимости от источника гемопоэтических стволовых клеток (p = 0,67), типа донора (p = 0,31). Близкие к значимым (p = 0,15) различия выявлены лишь между группами пациентов, получивших в режиме кондиционирования редуцированные и полные дозы мелфалана – осложнений в группе редукции доз было в 4 раза меньше.

Анализ развития оРТПХ у наблюдаемых детей (*таблица 3*) не показал различий в ее частоте в группах больных, разделенных по режиму профилактики РТПХ, типу донора, редукции дозы мелфалана в режиме кондиционирования. Близкие к значимым различия (p = 0,13) отмечались в группе пациентов, получивших в качестве гемопоэтических стволовых клеток КМ – частота оРТПХ у них была вдвое выше (60,0%) по сравнению с пациентами, получившими ПСКК (27,3%). При этом большинство из них являлись СНД.

Одним из факторов риска развития оРТПХ является высокое содержание $CD3^+$-клеток в трансплантате. В нашем исследовании не было значимых различий (p = 0,3) медиан содержания $CD3^+$-клеток в трансплантате между группами пациентов с развитием оРТПХ в посттрансплантационном периоде и с отсутствием данного осложнения. Однако следует отметить, что в группе пациентов с развитием оРТПХ содержание $CD3^+$-клеток в трансплантате оказалось ниже (медиана 0,9 (0,4–13) × 10^8/кг) по сравнению с группой пациентов без оРТПХ (медиана 3,15 (0,27–19) × 10^8/кг). Следует в очередной раз подчеркнуть, что у большинства СНД источником гемопоэтических стволовых клеток был КМ.

В исследуемой группе пациентов не было выявлено влияния режима профилактики РТПХ, типа донора, включения ТАІ в кондиционирование и источника гемопоэтических стволовых клеток на появление СХ.

Клеточность трансплантата также не влияла на частоту СХ – медиана $CD34^+$-клеток в трансплантате в группе пациентов с СХ составила 8,4 (3–11,7) × 10^8/кг,

Таблица 2
Анализ потенциального влияния различных факторов на длительность восстановления лейкопоэза у пациентов с ПАА после ТГСК

Table 2
An analysis of the potential influence of various factors on leukopoiesis recovery time in the patients with acquired aplastic anemia (AAA) after HSCT

Фактор Factor	**Медиана (разброс) восстановления лейкопоэза, дни** The median time (range) of leukopoiesis recovery, days	***p***
Основа режима профилактики РТПХ Approaches to GVHD prophylaxis		
Ингибиторы кальциневрина (n = 9) Calcineurin inhibitors (n = 9)	16 (11–29)	0,57
Ингибиторы янус-киназ (n = 12) Janus kinase inhibitors (n = 12)	17,5 (11–38)	
Тип донора Donor type		
СНД (n = 11) MUD (n = 11)	17 (11–28)	0,25
СРД (n = 9) MSD (n = 9)	21 (12–29)	
Наличие ТАІ в режиме кондиционирования Inclusion of TAI in the conditioning regimen		
С ТАІ (n = 12) With TAI (n = 12)	17 (11–28)	0,22
Без ТАІ (n = 9) Without TAI (n = 9)	19 (12–38)	
Источник гемопоэтических стволовых клеток Hematopoietic stem cell source		
КМ (n = 10) BM (n = 10)	21 (12–29)	0,08
ПСКК (n = 11) PBSC (n = 11)	17 (11–38)	
Количество $CD34^+$-клеток в трансплантате The number of $CD34^+$ cells in a graft		
Более 4 × 10^6/кг (n = 17) More than 4 × 10^6/kg (n = 17)	17 (11–38)	0,3
Менее 4 × 10^6/кг (n = 4) Less than 4 × 10^6/kg (n = 4)	24,5 (11–29)	
Редукция дозы мелфалана в кондиционировании Melphalan dose reduction in conditioning		
Нет (n = 9) No (n = 9)	21 (16–38)	0,13
Да (n = 12) Yes (n = 12)	17 (11–29)	

Таблица 3
Анализ потенциального влияния различных факторов на развитие оРТПХ у пациентов с ПАА после ТГСК

Table 3
An analysis of the potential influence of various factors on the development of acute GVHD in the patients with AAA after HSCT

Фактор Factor	**Пациенты с оРТПХ** Patients with acute GVHD		***p***
	n	**%**	
Основа режима профилактики РТПХ Approaches to GVHD prophylaxis			
Ингибиторы кальциневрина (*n* = 9) Calcineurin inhibitors (*n* = 9)	4	44,4	0,62
Ингибиторы янус-киназ (*n* = 12) Janus kinase inhibitors (*n* = 12)	5	41,7	
Тип донора Donor type			
СНД (*n* = 11) MUD (*n* = 11)	5	45,5	0,43
Гаплоидентичный (*n* = 1) Haploidentical (*n* = 1)	1	100	
СРД (*n* = 9) MSD (*n* = 9)	3	33,3	
Источник гемопоэтических стволовых клеток Stem cell source			
КМ (*n* = 10) BM (*n* = 10)	6	60,0	0,13
ПСКК (*n* = 11) PBSC (*n* = 11)	3	27,3	
Редукция дозы мелфалана в кондиционировании Melphalan dose reduction in conditioning			
Нет (*n* = 9) No (*n* = 9)	5	55,6	0,3
Да (*n* = 12) Yes (*n* = 12)	4	33,3	

в группе пациентов с ПДХ – 8,2 (3–13,6) × 10^8/кг, значимых различий не получено (p = 0,74).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Основными задачами в улучшении результатов ТГСК у пациентов с ПАА в настоящее время являются профилактика отторжения трансплантата и развития оРТПХ, снижение токсичности кондиционирования и режима иммуносупрессивной терапии, предотвращение персистенции СХ. Проблемы токсичности и иммунных осложнений частично решаются включением в новые схемы профилактики РТПХ менее токсичных ингибиторов янус-киназ в качестве базисного препарата взамен блокаторов кальциневрина, а также дополнительных иммуносупрессивных препаратов (тоцилизумаб, абатацепт и т. д.). В нашем исследовании профилактическая эффективность ингибиторов янус-киназ и блокаторов кальциневрина была сопоставима, как и их влияние на длительность восстановления лейкопоэза, частоту СХ. Результат анализа факторов, влияющих на развитие РТПХ, в исследуемой группе пациентов показал большую ее частоту среди больных, получивших трансплантат КМ по сравнению с ПСКК, а также у пациентов с меньшим содержанием в трансплантате $CD3^+$-клеток, что связано с более низким их содержанием в КМ по сравнению с ПСКК, а в исследуемой группе пациентов именно КМ был приоритетным источником гемопоэтических стволовых клеток при трансплантации от СНД и СРД 9/10. Кроме того, при получении высоких показателей содержания $CD3^+$-клеток в трансплантате проводилась интенсификация режима профилактики РТПХ, в большинстве случаев циклофосфамидом.

Снижение токсичности кондиционирования у ряда пациентов с отягощенными соматическим и инфекционным статусами достигалось за счет редукции доз химиопрепаратов, исключения TAI из схемы кондиционирования, применения ингибиторов янус-киназ для иммуносупрессивной профилактики. Особо интересен тот факт, что у 2 детей с индивидуальной непереносимостью АТГ препарат был исключен из режима кондиционирования без каких-либо негативных последствий благодаря использованию посттрансплантационного циклофосфамида, что согласуется с опубликованными сравнительными данными исследований зарубежных коллег [10]. Кроме того, следует подчеркнуть, что в нашем исследовании повторные ТГСК у 2 пациентов с включением мелфалана в кондиционирование, выполненные после отторжения трансплантата от того же СРД, были эффективны.

Для преодоления персистенции собственного гемопоэза, гипофункции и отторжения трансплантата пациенты исследуемой группы в схеме кондиционирования получили мелфалан, который обладает как иммуноаблативными, так и миелоаблативными свойствами. Подобный подход показал хорошие результаты – частота и тяжесть инфекционных, иммунных и токсических осложнений была низкой, при этом зафиксирована удовлетворительная функция трансплантата и ПДХ у 95% пациентов по данным итоговых результатов. Подобные результаты согласуются с опубликованными данными зарубежных исследований, в которых отмечено преимущество схемы кондиционирования с включением мелфалана по сравнению с традиционными режимами в отношении риска отторжения трансплантата у пациентов с ПАА после ТГСК [8].

Следует отметить, что в представленном исследовании ввиду малочисленности группы наблюдения не удалось получить статистическую значимость при сравнении различий основных параметров ТГСК и характеристик пациентов, поэтому мы отмечали лишь тенденцию к достижению значимости различий тех или иных показателей.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Включение мелфалана в режим кондиционирования у пациентов с ПАА перед ТГСК в сочетании

с новыми менее токсичными схемами профилактики РТПХ и сопроводительной терапии может стать эффективной опцией преодоления у таких больных персистенции собственного гемопоэза, риска отторжения трансплантата и появления СХ после ТГСК при низком уровне токсичности и частоты развития иммунных осложнений. Безусловно, необходимо проведение дальнейших исследований в этом направлении с включением в группы наблюдения большего числа пациентов и показателей для получения более статистически значимых новых данных в целях оптимизации схем терапии и улучшения результатов ТГСК у пациентов с ПАА.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ
Не указан.

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

ORCID
Skorobogatova E.V. ORCID: https://orcid.org/0000-0003-4431-1444
Machneva E.B. ORCID: https://orcid.org/0000-0003-2395-4045
Olkhova L.V. ORCID: https://orcid.org/0000-0002-7531-6443
Nikolaeva Yu.A. ORCID: https://orcid.org/0000-0001-7034-1730
Antoshin M.M. ORCID: https://orcid.org/0000-0002-6129-2647

Литература / References

1. Sureda A., Corbacioglu S., Greco R., Kröger N., Carreras E., eds. The EBMT Handbook: Hematopoietic Cell Transplantation and Cellular Therapies [Internet]. 8th ed. Cham (CH): Springer; 2024. DOI: 10.1007/978-3-031-44080-9
2. Bacigalupo A., Socie G., Lanino E., Prete A., Locatelli F., Locasciulli A., et al. Fludarabine, cyclophosphamide, antithymocyte globulin, with or without low dose total body irradiation, for alternative donor transplants, in acquired severe aplastic anemia: a retrospective study from the EBMT-SAA Working Party. Haematologica 2010; 95 (6): 976–82, DOI: 10.3324/haematol.2009.018267
3. Peffault de Latour R. Transplantation for bone marrow failure: current issues. Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2016; 2016 (1): 90–8. DOI: 10.1182/asheducation-2016.1.90
4. Morin-Zorman S., Loiseau P., Taupin J.L., Caillat-Zucman S. Donor-specific anti-HLA antibodies in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Front Immunol 2016; 7: 1–6. DOI: 10.3389/fimmu.2016.00307
5. Trial to Reduce Alloimmunization to Platelets Study Group. Leukocyte reduction and ultraviolet B irradiation of platelets to prevent alloimmunization and refractoriness to platelet transfusions. N Engl J Med 1997; 337 (26): 1861–9. DOI: 10.1056/NEJM199712253372601
6. Cutler C., Kim H.T., Sun L., Sese D., Glotzbecker B., Armand P., et al. Donor-specific anti-HLA antibodies predict outcome in double umbilical cord blood transplantation. Blood 2011; 118 (25): 6691–7. DOI: 10.1182/blood-2011-05-355263
7. Onishi Y. Aplastic anemia: history and recent developments in diagnosis and treatment. Int J Hematol 2024; 119 (3): 217–9. DOI: 10.1007/s12185-024-03715-1
8. Yoshida N., Takahashi Y., Yabe H., Kobayashi R., Watanabe K., Kudo K., et al. Conditioning regimen for allogeneic bone marrow transplantation in children with acquired bone marrow failure: fludarabine/melphalan vs. fludarabine/cyclophosphamide. Bone Marrow Transplant 2020; 55 (7): 1272–81. DOI: 10.1038/s41409-020-0948-8
9. Storb R., Etzioni R., Anasetti C., Appelbaum F.R., Buckner C.D., Bensinger W., et al. Cyclophosphamide combined with antithymocyte globulin in preparation for allogeneic marrow transplants in patients with aplastic anemia. Blood 1994; 84 (3): 941–9.
10. Chen R.L., Ip P.P., Shaw J.J., Wang Y.H., Fan L.H., Shen Y.L., et al. Anti-thymocyte globulin (ATG)-free nonmyeloablative haploidentical PBSCT plus post-transplantation cyclophosphamide is a safe and efficient treatment approach for pediatric acquired aplastic anemia. Int J Mol Sci 2022; 23 (23): 15192. DOI: 10.3390/ijms232315192

DOI: 10.24287/1726-1708-2025-24-2-62-72

© 2025 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России

Поступила 20.05.2025
Принята к печати 20.06.2025

EDN: JDRKXV

Результаты терапии детей с острым миелоидным лейкозом промежуточного риска, получивших аллогенную трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток с кондиционированием высокими дозами треосульфана от геноидентичного родственного донора в первой клинико-гематологической ремиссии

И.И. Калинина[1], Л.Н. Шелихова[1], М.А. Илюшина[1], Г.О. Бронин[2], М.М. Антошин[3], Е.В. Скоробогатова[3], М.А. Масчан[1], Г.А. Новичкова[1], А.А. Масчан[1]

[1]ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, Москва
[2]ГБУЗ г. Москвы «Морозовская детская городская клиническая больница Департамента здравоохранения г. Москвы», Москва
[3]Российская детская клиническая больница – филиал ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, Москва

Контактная информация:
Масчан Алексей Александрович, д-р мед. наук, профессор, член-корр. РАН, директор Института гематологии, иммунологии и клеточных технологий ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России
Адрес: 117997, Москва, ул. Саморы Машела, 1
E-mail: amaschan@mail.ru

Вопрос о целесообразности аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) у детей с острым миелоидным лейкозом (ОМЛ) промежуточного риска в первой клинико-гематологической ремиссии остается открытым. Мы проанализировали результаты ТГСК от геноидентичного сиблинга с миелоаблативным кондиционированием на основе высоких доз треосульфана и усиленной профилактикой реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ) у пациентов, получивших трансплантацию после 2 или 3 курсов химиотерапии (ХТ) в сравнении с продолжением высокодозной ХТ. Исследование одобрено независимым этическим комитетом и утверждено решением ученого совета НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева. В основную группу исследования вошли 22 реципиента ТГСК, в группу сравнения – 240 пациентов, у которых применяли высокодозную ХТ. В 15 случаях режим кондиционирования включал треосульфан, в 3 – бусульфан, в 4 – мелфалан. Источником трансплантата был костный мозг у 12 пациентов и периферические стволовые клетки – у 10. Профилактика РТПХ была усилена либо за счет добавления 1 или 2 дополнительных иммуносупрессивных препаратов, либо за счет увеличения длительности профилактики. Группу сравнения составили 240 пациентов, получивших 1 или 2 цикла консолидирующей терапии на основе высоких доз цитарабина. Группы были сравнимы по всем инициальным характеристикам. Приживление трансплантата достигнуто у всех пациентов: медиана интервала до приживления гранулоцитов – день +16 (разброс от +11-го до +21-го дня), до приживления тромбоцитов – день +15 (разброс от +11-го до +28-го дня). Основными проявлениями токсичности режимов кондиционирования были мукозит – у 12 (54%) пациентов, токсидермия – у 6 (27%) и повышение уровня аланинаминотрансферазы – у 4 (18%). Случаев токсической летальности не было. Острая и хроническая РТПХ, потребовавшая медикаментозной терапии, развилась у 15% пациентов. Четверо реципиентов ТГСК рецидивировали в сроки от 3 мес до 3 лет после трансплантации. В группе применения высокодозной ХТ 24 (10%) пациента умерли от инфекционных осложнений и у 79 (37%) развился рецидив ОМЛ. Кумулятивный риск рецидива составил 0,23 ± 0,10 и 0,44 ± 0,4, вероятность общей выживаемости – 0,88 ± 0,08 и 0,83 ± 0,03 у реципиентов ТГСК и высокодозной ХТ соответственно ($p > 0,05$). ТГСК от геноидентичного сиблинга у пациентов промежуточного риска в первой клинико-гематологической ремиссии является безопасной и эффективной процедурой на уровне тенденции, снижающей риск рецидива ОМЛ.

Ключевые слова: *дети, острый миелоидный лейкоз, родственная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток, треосульфан*

Калинина И.И. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2025; 24 (2): 62–72. DOI: 10.24287/1726-1708-2025-24-2-62-72

Results of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation from a genoidentical sibling after high-dose treosulfan-based conditioning in children with intermediate-risk acute myeloid leukemia in first clinical and hematological remission

© 2025 by «D. Rogachev NMRCPHOI»

Received 20.05.2025
Accepted 20.06.2025

I.I. Kalinina[1], L.N. Shelikhova[1], M.A. Ilyushina[1], G.O. Bronin[2], M.M. Antoshin[3], E.V. Skorobogatova[3], M.A. Maschan[1], G.A. Novichkova[1], A.A. Maschan[1]

[1]The Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology of Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow
[2]The Morozov Children's City Clinical Hospital of the Department of Health of Moscow, Moscow
[3]The Russian Children's Clinical Hospital of the N.I. Pirogov Russian National Research Medical University of Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow

The value of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) in first remission in children with intermediate-risk acute myeloid leukemia (AML) remains the matter of debate. We analyze the outcome of HSCT from a genoidentical sibling with high-dose treosulfan-based myeloablative conditioning and enhanced graft-versus-host disease (GVHD) prophylaxis in comparison with continuation of high-dose chemotherapy (CT). 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 the Russian Federation. A group of interest consisted of 22 HSCT recipients and a comparison group consisted of 240 patients who received high-dose CT. The conditioning regimens included treosulfan (n = 15), busulfan (n = 3), and melphalan (n = 4). The graft source was bone marrow in 12 patients and peripheral stem cells in 10 patients. GVHD prophylaxis was intensified either by including 1 or 2 additional immunosuppressive drugs or by increasing the duration of prophylaxis. The comparison group consisted of 240 patients who received 1 or 2 cycles of high-dose cytarabine-based consolidation therapy. The groups were matched for all initial characteristics. Engraftment was achieved in all 22 HSCT recipients: the median time to granulocyte recovery was day +16 (range, day +11 – day +21) and the median time to platelet recovery was day +15 (range, day +11 – day +28). The main toxicities of the conditioning regimens were mucositis in 12 (54%) patients, skin lesions in 6 (27%) patients, and an increase of alanine aminotransferase in 4 (18%) patients. There were no cases of toxicity-related mortality. Acute and chronic GVHD, requiring medical treatment developed in 15% of the patients. Four HSCT recipients relapsed between 3 months to 3 years after HSCT. In the high-dose CT group, 24 (10%) patients died of infectious complications and 79 (37%) patients developed a relapse. The cumulative incidence of relapse was 0.23 ± 0.10 and 0.44 ± 0.4 and the probability of the overall survival was 0.88 ± 0.08 and 0.83 ± 0.03 in the HSCT group and high-dose CT group, respectively (p > 0.05). HSCT from a genoidentical sibling in intermediate-risk AML patients in first clinical and hematological remission is a safe and effective procedure, and tends to reduce the risk of AML relapse.

Key words: *children, acute myeloid leukemia, related hematopoietic stem cell transplantation, treosulfan*

Kalinina I.I., et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology 2025; 24 (2): 62–72.
DOI: 10.24287/1726-1708-2025-24-2-62-72

Correspondence:
Alexey A. Maschan,
Dr. Med. Sci., Professor, Corresponding Member of the RAS, Director of the Institute of Hematology, Immunology and Cell Technologies at 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: amaschan@mail.ru

Результаты лечения острого миелоидного лейкоза (ОМЛ) у детей, несмотря на существенный прогресс, достигнутый за последние 20 лет, остаются субоптимальными. Если при анализе выживаемости при ОМЛ не учитывать пациентов с промиелоцитарным лейкозом, у которых благодаря комбинированной терапии полностью транс-ретиноевой кислотой и препаратами мышьяка показатели безрецидивной выживаемости должны приближаться к 100%, то даже в высокоразвитых странах, в которых на поток поставлены самые совершенные технологии лечения и создана сложная и дорогая инфраструктура сопроводительной терапии, вероятность выздоровления детей с ОМЛ составляет 65–70%, в то время как в менее развитых странах этот показатель находится на отметке 30–50%. В проведенном регистрационном исследовании результатов лечения ОМЛ в Российской Федерации нами показано, что вероятность 5-летней общей и бессобытийной выживаемости составила 0,60 ± 0,025 и 0,42 ± 0,025 соответственно при кумулятивном риске рецидива (КРР) 0,37 ± 0,027 [1].

Следует отметить, что за последние 20 лет улучшение показателей общей выживаемости достигнуто не за счет прорывов в результатах терапии первой линии, которая остается практически неизменной в течение 40 лет, а благодаря улучшению результатов терапии рецидивов и рефрактерных форм ОМЛ. Сегодня интенсивная химиотерапия (ХТ) и как кульминация – аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) позволяют добиться излечения примерно у 40% пациентов с рецидивами и рефрактерными формами ОМЛ [2].

В рамках современной терапевтической парадигмы, основанной на интенсивной индукционной терапии стандартными дозами цитарабина (AraC), стандартными/повышенными дозами антрациклинов и (в большинстве современных протоколов) этопозидом, постремиссионной терапии высокими дозами AraC (HDAraC) с антрациклинами и этопозидом и ТГСК у пациентов высокого риска вероятность достижения клинико-гематологической ремиссии с неопределяемой минимальной резидуальной (детектируемой) болезнью (МОБ) составляет 80–85% при КРР 30–40%. Следует подчеркнуть, что риск недостижения ремиссии, рецидива, а также шансы на успешную «терапию спасения» при данной терапевтической стратегии в наибольшей степени зависят от инициальных цитогенетических и молекулярно-генетических характеристик лейкемических клеток. В соответствии с этим современная стратификация разделяет первичных пациентов на группы стандартного, промежуточного и высокого риска. У пациентов группы стандартного риска, которая помимо CBF-лейкемий в последние годы пополнилась пациентами с ОМЛ с биаллельными мутациями в гене *CEBPA* и мутациями в гене *NPM1* без активирующих мутаций в гене *FLT3*, вероятность

достижения МОБ-негативной ремиссии приближается к 100% и риск рецидива составляет 20–30%. Поскольку большинство пациентов из группы стандартного риска, рецидивировавших после терапии первой линии, достигают повторной ремиссии и выздоровления после ТГСК во второй ремиссии, они не рассматриваются в качестве кандидатов на аллогенную ТГСК в первой полной ремиссии (ПР1). Напротив, у пациентов из группы высокого риска, несмотря на то, что 80% из них достигают полной ремиссии после терапии первой линии, вероятность развития рецидива составляет 50–90% вне зависимости от интенсивности постремиссионной терапии, и, более того, вероятность излечения даже при достижении второй ремиссии и проведении ТГСК не превышает 20–40%. Исходя из этого все пациенты из группы высокого риска расцениваются в качестве кандидатов на ТГСК в первой ремиссии ОМЛ.

У пациентов группы промежуточного риска, определяемого как ОМЛ с отсутствием цито- и молекулярно-генетических характеристик стандартного и высокого риска, вероятность получения МОБ-негативной ремиссии составляет около 90%, а риск рецидива – 30–40%. В связи с этим вопрос о необходимости ТГСК в ПР1 у этих пациентов является дискуссионным.

ТГСК традиционно считалась методом лечения гораздо более токсичным и ассоциированным с высоким по сравнению с ХТ количеством ранних и поздних осложнений и смертностью, особенно это касалось трансплантаций от альтернативных (неродственных и гаплоидентичных) доноров, в связи с чем у пациентов промежуточного риска ТГСК в первой ремиссии выполнялась только от геноидентичного сиблинга. В то же время своевременно проведенная ТГСК не более токсична, чем курсы интенсивной ХТ [3].

Более того, токсичности режимов кондиционирования, по крайней мере, ранней, главным образом связанной с применением высоких доз базового для пациентов с ОМЛ препарата – бусульфана (венооккклюзионная болезнь печени, судороги, тяжелые мукозиты, токсидермия, нарушения роста), можно избежать путем его замены на треосульфан, который в высоких суммарных дозах (36–42 г/м^2) является миелоаблативным агентом с высокой антилейкемической активностью [4, 5].

Использование треосульфана вместо бусульфана в качестве базового миелоаблативного агента делает ТГСК существенно более безопасной процедурой, что особенно важно для пациентов с ОМЛ с промежуточным прогнозом. Кроме того, усовершенствование технологии подбора донора и методов профилактики реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ) существенно снизило остроту проблемы острой и хронической РТПХ.

В данной статье мы проанализировали результаты терапии детей с ОМЛ промежуточного риска, получивших в ПР1 ТГСК от геноидентичного сиблинга с миелоаблативным кондиционированием на основе высоких доз треосульфана в сравнении с пациентами, вышедшими в ПР1 после курса индукционной ХТ, не имевшими HLA-идентичного сиблинга и не получившими трансплантацию.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследование включены пациенты в возрасте от 10 дней до 18 лет на момент установления диагноза ОМЛ промежуточного риска. Исследование одобрено независимым этическим комитетом и утверждено решением ученого совета НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева.

Подробное описание протокола терапии и стратификация на группы риска была опубликована нами ранее. Коротко: до 2018 г. пациенты относились к группе промежуточного риска при отсутствии цитогенетических аномалий, характеризующих стандартный и высокий риск, после 2018 г. – в критерии стандартного риска добавились мутации в гене *NPM1* без дополнительных молекулярных аномалий или с *FLT3*-ITD с аллельным соотношением <0,5, нормальным кариотипом без *FLT3*-ITD, M7-субвариант с t(1;22)(p13;q13)/*RBM15::MKL1* и биаллельными мутациями в гене *CEBPA*. Также после 2018 г. обязательным условием являлось достижение МОБ-негативной ремиссии после курса индукции и сохранение МОБ-негативности до проведения ТГСК.

Пациентам промежуточного риска ТГСК планировалась только при наличии семейного геноидентичного донора. Следует особенно отметить, что пациенты, отвечающие инициальным критериям ОМЛ промежуточного риска, у которых не была достигнута ПР1 после индукционной терапии, получали лечение согласно «ветке» протокола для рефрактерных ОМЛ, и ТГСК (от любого аллогенного донора – родственного, неродственного, гаплоидентичного) планировалась всем. Эти первично рефрактерные пациенты не вошли в настоящий анализ.

Пациентам промежуточного риска, у которых был идентифицирован HLA-совместимый сиблинг (по всем 10 аллелям HLA, A, B, C, DR и DQ по высокому разрешению), ТГСК проводилась после 2 или 3 курсов ХТ – индукции стандартными дозами AraC, антрациклинами и этопозидом и 1–2 курсов постремиссионной терапии на основе HDAraC.

Всего ТГСК в ПР1 от родственного геноидентичного сиблинга была выполнена 22 пациентам. Источником гемопоэтических клеток был костный мозг

(КМ) у 12 и мобилизованные с помощью гранулоцитарного колониестимулирующего фактора гемопоэтические клетки периферической крови (ПСК) – у 10 пациентов. У подавляющего большинства пациентов (n = 15) базовым миелоаблативным препаратом был треосульфан, у 3 – бусульфан и у 4 – мелфалан. У большинства пациентов профилактика РТПХ была усилена по сравнению со стандартной профилактикой ингибитором кальциневрина и коротким курсом метотрексата (*таблица 1*).

Данные по режимам кондиционирования и профилактике РТПХ представлены в *таблице 1*.

Профилактику венооклюзионной болезни печени не проводили. ТГСК осуществлялась в стерильных боксах с HEPA-фильтрацией и положительным давлением воздуха, профилактика/лечение инфекционных осложнений и трансфузионная терапия проводились согласно стандартным протоколам. Плановое назначение гранулоцитарного колониестимулирующего фактора не рекомендовалось, однако оставлялось на усмотрение лечащего врача.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Из 1082 первичных пациентов с ОМЛ 355 относились к группе инициального промежуточного риска (184 мальчика и 171 девочка), медиана возраста 8,5 лет (от 10 дней до 17,8 года) (Q1 2,5; Q3 13,9).

Таблица 1
Режимы кондиционирования и профилактика РТПХ у реципиентов ТГСК

Table 1
The conditioning regimens and prophylaxis of graft-versus-host disease (GVHD) in hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) recipients

Пациент Patient	Кондиционирование Conditioning	Профилактика РТПХ GVHD prophylaxis	Источник трансплантата Graft source
№1	Treo + Flu + VP	ПТЦф + ММФ PTCy + MMF	КМ BM
№2	Treo + Mel + Flu	ПТЦф + руксолитиниб + абатацепт PTCy + ruxolitinib + abatacept	ПСК PBSC
№3	Treo + Mel + Flu	Абатацепт + тофацитиниб Abatacept + tofacitinib	ПСК PBSC
№4	Treo + Mel + Flu	CsA + ММФ CsA + MMF	КМ BM
№5	Treo + Mel + Flu	Mtx + CsA	ПСК PBSC
№6	Treo + Mel + Flu	Mtx + CsA	ПСК PBSC
№7	Treo + Mel + Flu	Mtx + CsA	КМ BM
№8	Treo + Flu + VP	ПТЦф + барицитиниб + абатацепт, ведолизумаб PTCy + baricitinib + abatacept + vedolizumab	КМ BM
№9	Treo + Flu + VP	ПТЦф + барицитиниб + абатацепт, ведолизумаб PTCy + baricitinib + abatacept + vedolizumab	КМ BM
№10	Treo + Thio + Flu	Абатацепт + тоцилизумаб + бортезомиб Abatacept + tocilizumab + bortezomib	ПСК* PBSC*
№11	Treo + Mel + Flu	CsA, ММФ CsA, MMF	КМ BM
№12	Treo + Flu + VP	ПТЦф, CsA PTCy, CsA	ПСК PBSC
№13	Treo + Mel + Flu	CsA, абатацепт, ММФ CsA, abatacept, MMF	КМ BM
№14	Treo + Flu + VP	ПТЦф + руксолитиниб + абатацепт + ведолизумаб PTCy + ruxolitinib + abatacept + vedolizumab	ПСК PBSC
№15	Treo +Flu + VP	ПТЦф + руксолитиниб + абатацепт + ведолизумаб PTCy + ruxolitinib + abatacept + vedolizumab	ПСК PBSC
№16	Bu + Mel + Flu	АТГ + Mtx ATG + Mtx	КМ BM
№17	Bu + Flu + Thio	Tacro + Mtx	ПСК PBSC
№18	Bu + Flu + Thio	Tacro + Mtx	ПСК PBSC
№19	Mel + HDAraC + Mit + Flu	АТГ + CsA + ММФ ATG + CsA + MMF	КМ BM
№20	Mel + HDAraC + Mit + Flu	АТГ + CsA + Mtx ATG + CsA + Mtx	КМ BM
№21	Mel + HDAraC +Mit + Flu	АТГ + CsA + ММФ ATG + CsA + MMF	КМ BM
№22	Mel + Flu + HDAraC + Mit	АТГ + CsA + ММФ ATG + CsA + MMF	КМ BM

*Примечание. Treo – треосульфан 42 г/м²; Bu – бусульфан 16 мг/кг; Mel – мелфалан 180 мг/м² при монотерапии, 140 мг/м² при сочетании с treo; thio – тиотепа 10 мг/мг; ПТЦф – посттрансплантационный циклофосфамид; АТГ – антитимоцитарный глобулин; Mtx – метотрексат; Flu – флударабин 150 мг/м²; VP – этопозид 60 мг/кг; Mit – митоксантрон; ММФ – микофенолата мофетил; CsA – циклоспорин; Tacro – такролимус. * – у этого пациента проводилась α/β-CD19-деплеция трансплантата.*

*Note. Treo – treosulfan 42 g/m²; Bu – busulfan 16 mg/kg; Mel – melfalan 180 mg/m² as monotherapy, 140 mg/m² in combination with treo; thio – thiotepa 10 mg/kg; PTCy – post-transplant cyclophosphamide; ATG – antithymocyte globulin; Mtx – methotrexate; Flu – fludarabin 150 mg/m²; VP – etoposide 60 mg/kg; Mit – mitoxantrone; HDAraC – high dose cytarabine; MMF – mycophenolate mofetil; CsA – cyclosporine; Tacro – tacrolimus. BM – bone marrow; PBSC – peripheral blood stem cell; * – this patient received α/β-CD19 depleted PBSC.*

Медиана числа лейкоцитов в дебюте заболевания составила 17,2 (0,25–540) × 10^9/л (Q1 4,4; Q3 64,2), у 105 пациентов отмечен гиперлейкоцитоз выше 50 × 10^9/л, инициальный нейролейкоз выявлен у 17% пациентов, наличие экстрамедуллярного поражения было зарегистрировано в 30 (8%) случаях. Распределение по FAB-субвариантам было стандартным: наиболее часто встречались M5 и M2 – у 132 (37%) и 85 (24%) пациентов соответственно, далее по частоте встречались M4 – у 47 (13%), M1 – у 41 (11,5%), Mx – у 36 (10%), M7 – у 6 (1,5%), M4 с эозинофилией – у 5 (1,4%) и M0 – у 3 пациентов.

Генетическая характеристика группы представлена в *таблице 2*.

Большинство пациентов получали терапию по протоколам ОМЛ-MRD-2018 (*n* = 193; 55%) и ОМЛ-ММ-2000/2006 (*n* = 101; 28%), остальные – по протоколам группы BFM [6–9].

После индукционного курса ХТ полной ремиссии достигли 283 (80%) пациента, в 44 (12%) случаях ремиссия не была достигнута и 28 (8%) умерли до точки контроля достижения ремиссии.

В дальнейшем 15 (5%) из 283 пациентов, достигших ремиссии, в ходе терапии развернули гематологический или МОБ-рецидив (повышение уровня МОБ >0,1%) и были переведены на ветвь терапии для пациентов с рефрактерным течением заболевания, состоящую из интенсивной ХТ, как правило, HDAraC + идарубицин + флударабин с последующей обязательной ТГСК, чаще всего от гаплоидентичного семейного донора.

При наличии геноидентичного сиблинга после 3 курсов ХТ пациенты в ПР1 направлялись на ТГСК, а пациенты, не имеющие донора, получали еще 1 курс интенсивной ХТ HDAraC + идарубицин. Поддерживающей ХТ после окончания интенсивной фазы протокола пациенты не получали.

Двадцать четыре пациента (8%) умерли в ремиссии до возможного проведения ТГСК или последнего блока полихимиотерапии. Шесть пациентов в ходе терапии при получении данных NGS были рестратифицированы в группу высокого риска, все они получили ТГСК в первой ремиссии от альтернативного донора.

Всего ТГСК от геноидентичного сиблинга проведена 22 пациентам, группа сравнения составила 216 пациентов (блок-схема, *рисунок 1*).

Группы родственной ТГСК и ХТ были сравнимы по инициальным характеристикам (*таблица 3*).

Результаты терапии у реципиентов ТГСК (*n* = 22)

Медиана интервала от даты диагноза до проведения ТГСК составила 3 (1,5–7) мес.

Таблица 2
Генетическая характеристика пациентов, включенных в исследование (*n* = 355)

Table 2
Genetic characteristics of the patients included in the study (*n* = 355)

Генетическая характеристика **Genetic characteristics**	**Число пациентов** **Number of patients**
Нормальный кариотип Normal karyotype	91
t(9;11)(p21;q23)/*KMT2A::MLLT3*	90
Другое (различные цитогенетические перестройки) Other (various cytogenetic rearrangements)	47
Биаллельные мутации *CEBPA* bi*CEBPA*	30
NPM(+) без дополнительных молекулярных аномалий или с *FLT3*-ITD с аллельным соотношением <0,5 *NPM*(+) without additional molecular abnormalities or with *FLT3*-ITD with an allele ratio <0.5	27
Нет митозов No mitoses	27
Нет данных No data	12
Трисомия 8-й хромосомы (+8) Trisomy 8 (+8)	11
Трисомия 21-й хромосомы (+21) Trisomy 21 (+21)	10
t(1;11)(q21;q23)/*KMT2A::MLLT11*	8
M7 + t(1;22)(p13;q13)/*RBM15::MKL1*	2

Органная токсичность кондиционирования заключалась главным образом в мукозитах (гингивит, стоматит, фарингит, эзофагит), зарегистрированных у 12 (54%) пациентов, токсидермии – у 6 (27%), повышении аланинаминотрансферазы – у 4 (18%). У всех пациентов развилась фебрильная нейтропения, по поводу которой проводилась комбинированная антимикробная терапия. Случаев венооклюзионной болезни печени, респираторного дистресс-синдрома, осложнений со стороны центральной или периферической нервной системы не было.

У всех пациентов зарегистрировано приживление трансплантата: гранулоциты – на день +16 (медиана), тромбоциты – на день +15 (медиана). Ни один пациент не умер в результате инфекционных или токсических осложнений в раннем посттрансплантационном периоде.

Оценить развитие РТПХ было возможно только у 13 пациентов, из них острая форма развилась у 2 (15%) пациентов, с максимальной степенью III – у 1 (8%) пациента. Во всех случаях РТПХ полностью регрессировала под влиянием терапии глюкокортикоидами. Хроническая форма развилась у 2 (15%) пациентов и была лимитированной и экстенсивной – по у 1 (8%) случаю.

Рецидив ОМЛ развился у 4 (18%) из 22 реципиентов ТГСК: у 2 – поздний (1,2 и 3,2 года от достижения ПР1) и у 2 – ранний (3 и 6 мес от достижения ПР1). После проведения «терапии спасения» 2 пациентки с рецидивом достигли ПР2 и получили

повторные ТГСК от гаплоидентичных доноров, у 2 пациентов достичь ПР2 не удалось, оба они умерли от прогрессии заболевания.

Таким образом, на момент данного анализа живы 20 пациентов с медианой наблюдения 6,3 года (2 мес – 16,5 лет): 18 в ПР1, 1 – в ПР2 и 1 получает лечение по поводу 2-го рецидива ОМЛ. Расчетная 5-летняя общая выживаемость составила 0,88 ± 0,08, КРР на 5 лет – 0,23 ± 0,10 (*рисунки 2, 3*).

Результаты терапии у пациентов, не получивших ТГСК

Двадцать четыре пациента (10%) умерли от инфекционных осложнений в фазе миелотоксического агранулоцитоза после проведения курсов HDAraC.

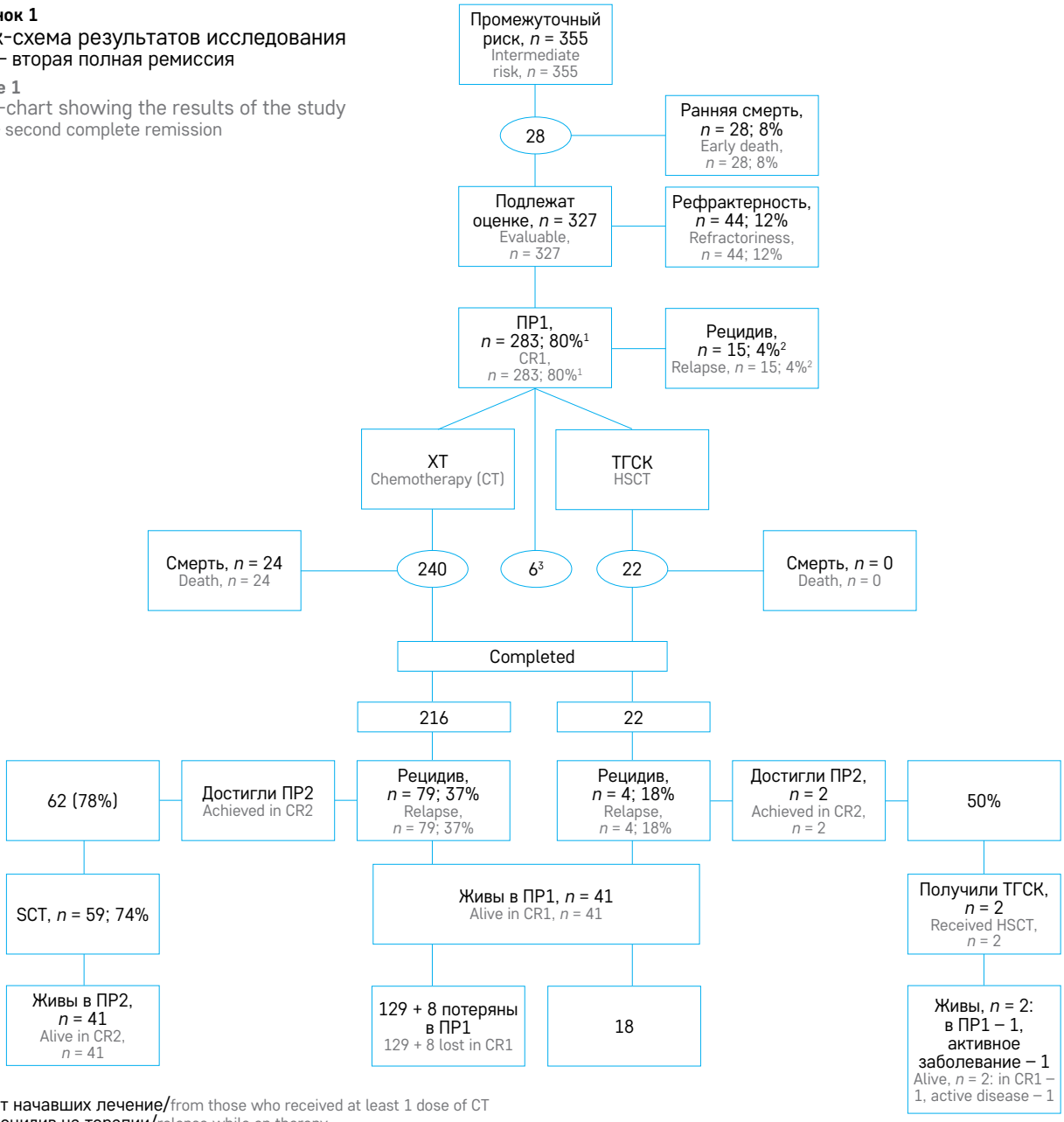
Из 216 пациентов, достигших ПР1, переживших осложнения высокодозной терапии и оставшихся в ПР1 после последнего курса ХТ, рецидив в дальнейшем развился в 79 (37%) случаях. КРР составил 0,44 ± 0,04 (*рисунок 3*).

Повторной ремиссии удалось достичь у 62 (78%) рецидивировавших и 46 (95%) из них проведена ТГСК в ПР2. У 9 из 62 пациентов ПР2 достигнута только после трансплантации. ТГСК в статусе активного заболевания проведена 18 (23%) рецидивировавшим пациентам, у которых не удалось добиться повторной ремиссии. ПР2 достигли 12 пациентов.

Всего на момент настоящего анализа умерли 29 (37%) рецидивировавших пациентов из данной подгруппы. Общая выживаемость в группе паци-

Рисунок 1
Блок-схема результатов исследования
ПР2 – вторая полная ремиссия

Figure 1
Flow-chart showing the results of the study
CR2 – second complete remission



[1] – от начавших лечение/from those who received at least 1 dose of CT
[2] – рецидив на терапии/relapse while on therapy
[3] – рестратификация в группу высокого риска по NGS/restratified in HR after NGS results

Таблица 3
Инициальные характеристики исследуемых групп
Table 3
The initial characteristics of the study groups

Параметр **Parameter**	**ТГСК (*n* = 22)** **HSCT (*n* = 22)**	**ХТ (*n* = 216)** **CT (*n* = 216)**	***p***
Возраст, медиана (разброс, квартили), годы Age, median (range, quartiles), years	5,4 (0,4–17,1) (Q1 1,9; Q3 10,5)	8,1 (0,18–17,7) (Q1 2,4; Q3 13,6)	0,33
Пол, мужской/женский Gender, boys/girls	7/15	104/112	0,14
Клинико-гематологические данные **Clinical and hematological data at diagnosis**			
Лейкоцитоз, медиана (разброс, квартили) WBC count, median (range, quartiles)	21,8 (2,2–231) (Q1 6,8; Q3 29,2)	13,8 (0,25–540) (Q1 4,3; Q3 52,2)	0,49
Гиперлейкоцитоз Hyperleukocytosis	6	55	>0,05
Нейролейкоз CNS leukemia	1	28	>0,05
Экстрамедуллярное поражение Extramedullary involvement	1	12	>0,05
FAB-субвариант **FAB subvariant**			
M0	1	1	>0,05
M1	4	28	
M2	5	47	
M4	2	29	
M4 с эозинофилией M4 with eosinophilia	0	4	
M5	9	80	
M7	0	5	
Mx	1	22	
Цитогенетические данные **Cytogenetic data**			
Нормальный кариотип Normal karyotype	6	52	>0,05
t(9;11)(p21;q23)/*KMT2A::MLLT3* + M5	5	54	
Другое Other	3	25	
NPM1	2	18	
Биаллельные мутации *CEBPA* bi*CEBPA*	1	25	
Нет данных No data	1	7	
Нет митозов No mitoses	1	16	
t(1;11)(q21;q23)/*KMT2A::MLLT11*	1	7	
Трисомия 8-й хромосомы (+8) Trisomy 8 (+8)	1	2	
Трисомия 21-й хромосомы (+21) Trisomy 21 (+21)	0	8	
t(1;22)(p13;q13)/*RBM15::MKL1*	0	2	

ентов, которые не получили ТГСК в ПР1 составила 0,83 ± 0,03 (*рисунок 2*).

Кривые общей выживаемости и КРР в сравниваемых группах представлены на *рисунках 2, 3*.

Статистически достоверной разницы в общей выживаемости получено не было.

Различия в показателях КРР в пользу реципиентов ТГСК прослеживаются на уровне тенденции, однако не достигают статистической значимости.

На настоящее время из 355 пациентов, включенных в исследование, жив 241 (68%) пациент, из них 175 (73%) в ПР1. Восемь пациентов были потеряны из-под наблюдения в ПР1. В рецидиве живы 4 пациента, во второй ремиссии и более – 54.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Проведение аллогенной ТГСК в ПР1 является самым радикальным методом терапии ОМЛ, снижающим риск рецидива заболевания примерно вдвое [3, 10].

В то же время повышенная токсическая летальность, связанная с ТГСК, обусловленная побочными эффектами мегадозной ХТ, а также острой и хронической РТПХ с сопутствующим им тяжелым иммунодефицитом, в достаточно большой мере нивелирует преимущества метода. Главными аргументами оппонентов широкого применения ТГСК у детей с ОМЛ являются ссылки на улучшившиеся

Рисунок 2
Пятилетняя общая выживаемость в исследуемых группах
Figure 2
The 5-year overall survival in the study groups

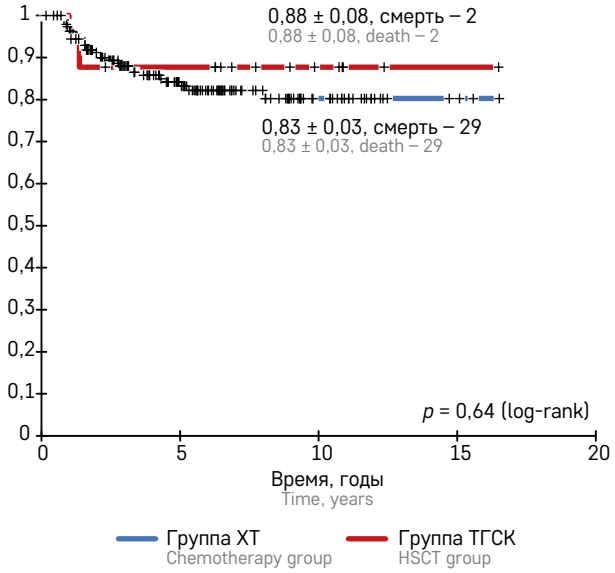
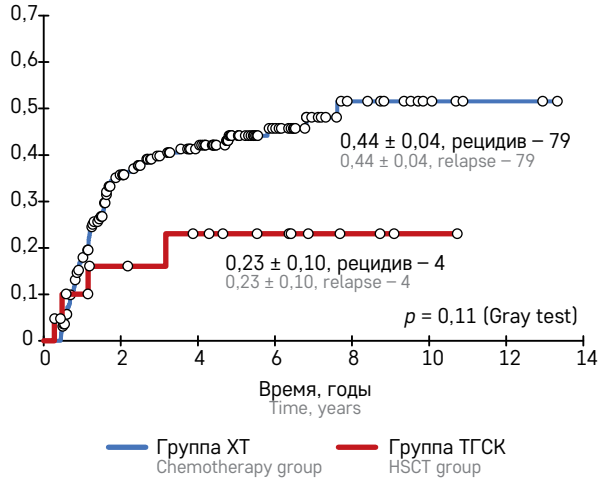


Рисунок 3
КРР на 5 лет наблюдения
Figure 3
The cumulative risk of relapse at 5 years of follow-up



результаты ХТ и высокую вероятность достижения повторной ремиссии у пациентов с рецидивом с возможностью проведения трансплантации во второй ремиссии заболевания. Действительно, у пациентов стандартного риска достаточно высокая вероятность безрецидивной выживаемости (70–80%) и улучшившиеся результаты «терапии спасения» формируют рациональную базу для отказа от ТГСК в ПР1 [11].

Напротив, у пациентов высокого риска результаты ХТ остаются неудовлетворительными, а для некоторых подгрупп (например, с нарушениями экспрессии или мутациями в генах *NUP98*, *TP53*, *MECOM*) – попросту катастрофическими, поэтому проведение ТГСК у пациентов, достигших ПР1, является обязательным для достижения излечения [12, 13].

ТГСК у пациентов промежуточного риска в протоколах ведущих исследовательских групп не предусмотрена при достижении и сохранении ПР1 в течение 3–4 мес постремиссионной терапии. Даже в отношении ТГСК от геноидентичного донора преобладающим является негативное отношение, не говоря о трансплантации от альтернативных доноров, которые вообще не рассматриваются в качестве опции консолидации ремиссии у пациентов промежуточного риска.

Публикаций, в которых анализируются результаты аллогенной ТГСК в ПР1 у пациентов промежуточного риска, практически нет. В самом «свежем» исследовании эффективности гаплоидентичной ТГСК с миелоаблативным кондиционированием у детей с ОМЛ промежуточного риска после получения как минимум 3 курсов интенсивной ХТ показано, что КРР через 3 года составил 25,4 ± 4,5%, при вероятности бессобытийной выживаемости >80% у реципиентов, получивших ТГСК в МОБ-негативной ПР1, значительно превосходя аналогичные показатели пациентов, продолживших интенсивную ХТ. При этом острая и хроническая РТПХ развилась у неприемлемо большой доли пациентов в результате неадекватной профилактики (без посттрансплантационного циклофосфамида или иммуномагнитной деплеции) [14].

В нашем исследовании, в котором «отсортированная» согласно современным критериям популяция пациентов с ОМЛ промежуточного риска получила ТГСК в ПР1 с кондиционированием на основе высоких доз треосульфана, прослежена четкая тенденция к улучшению общей выживаемости и снижению КРР, хотя статистически эта разница недостоверна в связи с малочисленностью группы пациентов, получивших трансплантацию. Важным фактом является то, что ни один из реципиентов ТГСК в ПР1 не умер от токсичности процедуры, в то время как смертность пациентов, получавших дальнейшую высокодозную терапию, составила 10%, что является неприемлемо высоким показателем, хотя статистически разница в летальности оказалась недостоверной (p = 0,1).

Следует особенно подчеркнуть, что результаты анализа сравнительной эффективности ТГСК против ХТ, полученные 15–25 лет назад, экстраполировать на сегодняшние реалии совершенно некорректно, поскольку определение групп промежуточного и высокого риска существенно поменялось. Уже 20 лет назад было очевидно, что группа промежуточного риска, являясь весьма разнородной «группой исключения», должна постепенно уменьшаться вплоть до полного исчезновения по мере накопления данных по эффективности стандартной ХТ у пациентов, у которых идентифицированы новые хромосо-

мные или молекулярные аномалии высокого риска (например, мутации в генах *NUP98*, *ETV6* или активирующие мутации в гене *FLT3*). Кроме того, сегодня для принятия решения о целесообразности трансплантации в ПР1 появилась возможность опираться на такой важнейший критерий, как уровень МОБ, несравненно более объективный, чем морфологическая оценка, показатель качества (глубины) ремиссии, достигаемой с помощью ХТ [15].

Двумя важнейшими аргументами против проведения ТГСК в ПР1 являются достаточно высокая вероятность достижения повторной ремиссии с последующей трансплантацией при рецидиве и высокая общая токсичность процедуры ТГСК.

При этом представление о высокой эффективности терапии рецидива у пациентов инициально высокого или промежуточного риска является ложным. Так, в работе Klein и соавт. показано, что вероятность общей выживаемости пациентов с нормальным кариотипом и хромосомными аномалиями, характеризовавшими инициальный ОМЛ как заболевание промежуточного риска, не превышает 35% [11].

В нашем исследовании лишь 78% пациентов с рецидивом ОМЛ после интенсивной ХТ, достигли ПР2 и лишь 52% были живы на момент анализа.

Представления же о высокой токсичности ТГСК в большой мере сформированы на основании опыта 1980–2000-х годов, когда в качестве базовых миелоаблативных элементов режима кондиционирования использовались либо тотальное облучение тела, либо высокие дозы бусульфана, которые в сочетании с высокими дозами циклофосфамида и несовершенной профилактикой РТПХ действительно приводили к тяжелым ранним и поздним осложнениям в виде тяжелых мукозитов, геморрагических циститов, венооклюзионной болезни печени, тяжелой острой и хронической РТПХ, катаракте, гипофункции щитовидной железы, диспропорционального роста костей и многим другим.

Пополнение арсенала миелоаблативных агентов треосульфаном и замена циклофосфамида на флударабин привели к заметному снижению частоты, тяжести и в целом профиля ранней токсичности режимов кондиционирования [16–18]. В нашем исследовании ни один реципиент ТГСК не умер от токсичности процедуры, в то время как 10% пациентов, которые получали дальнейшую терапию HDAraC с антрациклинами и этопозидом, умерли от инфекционных осложнений.

У пациентов с ОМЛ монотерапия циклоспорином А или в комбинации с метотрексатом (короткий курс) в течение десятилетий оставались базой медикаментозной профилактики РТПХ, обеспечивая реализацию эффекта «трансплантат-против-лейкемии» при приемлемых рисках тяжелой РТПХ. При двойной профилактике вероятность развития острой РТПХ II–IV степени у реципиентов геноидентичной трансплантации составляет не менее 30–40%, а риск хронической РТПХ – 20–25% [19, 20].

В то же время миелоаблативное кондиционирование при ОМЛ промежуточного риска, который является химиочувствительным вариантом заболевания, позволяет полагаться не только на иммунологические эффекты ТГСК, в значительной степени коррелирующие с развитием РТПХ, но и на, собственно, эрадикационный потенциал режима кондиционирования. Понимание этого позволяет оптимизировать (усилить, удлинить) профилактику РТПХ, не рискуя общим антилейкемическим эффектом трансплантации.

В нашем исследовании токсичность режимов кондиционирования, базовым препаратом в которых являлся треосульфан, была по «трансплантационным» меркам умеренной и ограничивалась мукозитами, токсидермией и повышением аланинаминотрансферазы, причем частота этих побочных эффектов практически зеркально отражает данные литературы. У большинства пациентов профилактика РТПХ была усилена за счет либо продления терапии микофенолата мофетилом до 60 дней после ТГСК, либо добавления антитимоцитарного глобулина, либо использования ингибиторов JAK2 и абатацепта, либо посттрансплантационного циклофосфамида (*таблица*). Низкая вероятность развития клинически значимой РТПХ (15%) не привела к увеличению вероятности редицива, которая составила стандартные 23%.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, у пациентов промежуточного риска ТГСК в ПР1, выполненная после миелоаблативного кондиционирования, основанного на высоких дозах треосульфана, является безопасной и эффективной процедурой, способной снизить риск рецидива ОМЛ.

В заключение необходимо подчеркнуть, что после 20 лет стагнации результатов лечения ОМЛ у детей появились препараты, которые способны значительно улучшить прогноз пациентов. Прежде всего, это относится к гемтузумабу озогамицину, венетоклаксу и ингибиторам FLT3, их интеграция в протоколы первой линии изменит и результаты терапии, и наши представления о группах риска. Тем не менее, до того как лечебный потенциал новых препаратов станет окончательно ясен, ТГСК, особенно с учетом достигнутого прогресса в области безопасности технологии, останется важным оружием в арсенале лечения ОМЛ.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ
Не указан.

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

ORCID
Kalinina I.I. ORCID: http://orcid.org/0000-0002-0813-5626
Shelikhova L.N. ORCID: http://orcid.org/0000-0003-0520-5630
Ilyushina M.A. ORCID: https://orcid.org/0000-0001-7652-7704
Bronin G.O. ORCID: http://orcid.org/ 0000-0002-0694-3996
Antoshin M.M. ORCID: http://orcid.org/ 0000-0002-6129-2647
Skorobogatova E.V. ORCID: http://orcid.org/ 0000-0003-4431-1444
Maschan M.A. ORCID: http://orcid.org/ 0000-0003-1735-0093
Novichkova G.A. ORCID: http://orcid.org/0000-0002-2322-5734
Maschan A.A. ORCID: http://orcid.org/ 0000-0002-0016-6698

Литература / References

1. Калинина И.И., Венёв Д.А., Садовская М.Н., Старичкова Ю.В., Воронин К.А., Ольшанская Ю.В. и др. Результаты регистрационного исследования острого миелоидного лейкоза у детей в России. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2025; 24 (1): 26–38. DOI: 10.24287/1726-1708-2025-24-1-26-38 [Kalinina I.I., Venyov D.A., Sadovskaya M.N., Starichkova Yu.V., Voronin K.A. The results of a registry study on acute myeloid leukemia in Russian children. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology 2025; 24 (1): 26–38. (In Russ.)].
2. Kaspers G.J., Zimmermann M., Reinhardt D., Gibson B.E., Tamminga R.Y., Aleinikova O., et al. Improved outcome in pediatric relapsed acute myeloid leukemia: results of a randomized trial on liposomal daunorubicin by the International BFM Study Group. J Clin Oncol 2013; 31 (5): 599–607. DOI: 10.1200/JCO.2012.43.7384
3. Michel G., Leverger G., Leblanc T., Nelken B., Baruchel A., Landman-Parker J., et al. Allogeneic bone marrow transplantation vs aggressive post-remission chemotherapy for children with acute myeloid leukemia in first complete remission. A prospective study from the French Society of Pediatric Hematology and Immunology (SHIP). Bone Marrow Transplant 1996; 17 (2): 191–6.
4. Casper J., Knauf W., Blau I., Ruutu T., Volin L., Wandt H., et al. Treosulfan/fludarabine: a new conditioning regimen in allogeneic transplantation. Ann Hematol 2004; 83 Suppl 1: S70–1. DOI: 10.1007/s00277-004-0850-2
5. Danylesko I., Shimoni A., Nagler A. Treosulfan-based conditioning before hematopoietic SCT: more than a BU look-alike. Bone Marrow Transplant 2012; 47 (1): 5–14. DOI: 10.1038/bmt.2011.88
6. Калинина И.И., Шнейдер М.М., Кирсанова Н.П., Байдильдина Д.Д., Сунцова Е.В., Горонкова О.В. и др. Клинические и генетические особенности острого миелоидного лейкоза с t(8;21) у детей и результаты терапии по протоколу ОМЛ-ММ-2000. Онкогематология 2011; (1): 11–9. [Kalinina I.I., Shneyder M.M., Kirsanova N.P., Baidildina D.D., Suntsova E.V., Goronkova O.V., et al. Clinical and genetic characteristics of acute myeloid leukemia with t(8;21) in children and results of therapy according to protocol AML-MM-2000. Oncogematology 2011; 6 (1): 11–8. (In Russ.)].
7. Васильева М.С., Калинина И.И., Венёв Д.А., Лебедева С.А., Банколе В.А., Абашидзе З.А. и др. Предварительные результаты терапии пациентов группы промежуточного риска по протоколу ОМЛ-МОБ-2018. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2025; 24 (1): 14–25. DOI: 10.24287/1726-1708-2025-24-1-14-25 [Vasilyeva M.S., Kalinina I.I., Venev D.A., Lebedeva S.A., Bankole V.A., Abashidze Z.A., et al. Preliminary results of treatment of intermediate-risk patients according to the AML-MRD-2018 protocol. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology 2025; 24 (1): 14–25. (In Russ.)].
8. 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. 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.)].
9. Rasche M., Zimmermann M., Borschel L., Bourquin J.P., Dworzak M., Klingebiel T., et al. Successes and challenges in the treatment of pediatric acute myeloid leukemia: a retrospective analysis of the AML-BFM trials from 1987 to 2012. Leukemia 2018; 32 (10): 2167–77. DOI: 10.1038/s41375-018-0071-7
10. Woods W.G., Neudorf S., Gold S., Sanders J., Buckley J.D., Barnard D.R., et al.; Children's Cancer Group. A comparison of allogeneic bone marrow transplantation, autologous bone marrow transplantation, and

aggressive chemotherapy in children with acute myeloid leukemia in remission. Blood 2001; 97 (1): 56–62. DOI: 10.1182/blood.v97.1.56
11. Klein K., Beverloo H.B., Zimmermann M., Raimondi S.C., von Neuhoff C., de Haas V., et al. Prognostic significance of chromosomal abnormalities at relapse in children with relapsed acute myeloid leukemia: A retrospective cohort study of the relapsed AML 2001/01 Study. Pediatr Blood Cancer 2022; 69 (1): e29341. DOI: 10.1002/pbc.29341
12. Struski S., Lagarde S., Bories P., Puiseux C., Prade N., Cuccuini W., et al. NUP98 is rearranged in 3.8% of pediatric AML forming a clinical and molecular homogenous group with a poor prognosis. Leukemia 2017; 31 (3): 565–72. DOI: 10.1038/leu.2016.267
13. Cucchi D.G.J., Bachas C., Klein K., Huttenhuis S., Zwaan C.M., Ossenkoppele G.J., et al. TP53 mutations and relevance of expression of TP53 pathway genes in paediatric acute myeloid leukaemia. Br J Haematol 2020; 188 (5): 736–9. DOI: 10.1111/bjh.16229
14. Xue Y.J., Cheng Y.F., Lu A.D., Wang Y., Zuo Y.X., Yan C.H. et al. Efficacy of haploidentical hematopoietic stem cell transplantation compared with chemotherapy as postremission treatment of children with intermediate-risk acute myeloid leukemia in first complete remission. Clin Lymphoma Myeloma Leuk 2021; 21 (2): e126–36. DOI: 10.1016/j.clml.2020.09.004
15. Inaba H., Coustan-Smith E., Cao X., Pounds S.B., Shurtleff S.A., Wang K.Y., et al. Comparative analysis of different approaches to measure treatment response in acute myeloid leukemia. J Clin Oncol 2012; 30 (29): 3625–32. DOI: 10.1200/JCO.2011.41.5323
16. Sykora K.W., Beier R., Schulz A., Cesaro S., Greil J., Gozdzik J., et al. Treosulfan vs busulfan conditioning for allogeneic bmt in children with nonmalignant disease: a randomized phase 2 trial. Bone Marrow Transplant 2024; 59 (1): 107–16. DOI: 10.1038/s41409-023-02135-9
17. Beelen D.W., Trenschel R., Stelljes M., Groth C., Masszi T., Reményi P., et al. Treosulfan or busulfan plus fludarabine as conditioning treatment before allogeneic haemopoietic stem cell transplantation for older patients with acute myeloid leukaemia or myelodysplastic syndrome (MC-FludT.14/L): a randomised, non-inferiority, phase 3 trial. Lancet Haematol 2020; 7 (1): e28–39. DOI: 10.1016/S2352-3026(19)30157-7
18. Huttunen P., Taskinen M., Vettenranta K. Acute toxicity and outcome among pediatric allogeneic hematopoietic transplant patients conditioned with treosulfan-based regimens. Pediatr Hematol Oncol 2020; 37 (5): 355–64. DOI: 10.1080/08880018.2020.1738604
19. Neudorf S., Sanders J., Kobrinsky N., Alonzo T.A., Buxton A.B., Gold S., et al. Allogeneic bone marrow transplantation for children with acute myelocytic leukemia in first remission demonstrates a role for graft versus leukemia in the maintenance of disease-free survival. Blood 2004; 103 (10): 3655–61. DOI: 10.1182/blood-2003-08-2705
20. Pochon C., Detrait M., Dalle J.H., Michel G., Dhédin N., Chalandon Y., et al. Improved outcome in children compared to adolescents and young adults after allogeneic hematopoietic stem cell transplant for acute myeloid leukemia: a retrospective study from the Francophone Society of Bone Marrow Transplantation and Cell Therapy (SFGM-TC). J Cancer Res Clin Oncol 2022; 148 (8): 2083–97. DOI: 10.1007/s00432-021-03761-w

DOI: 10.24287/1726-1708-2025-24-2-74-79

© 2025 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России

Поступила 19.04.2025
Принята к печати 21.05.2025

EDN: JFEYYE

Дефицит фактора свертывания XIII у детей: особенности диагностики, клинического течения и опыт проведения заместительной терапии

Д.Б. Флоринский[1], А.В. Пшонкин[1], А.В. Полетаев[1], Е.А. Серегина[1, 2], П.А. Жарков[1]

[1]ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, Москва
[2]ФГБУН «Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии» РАН, Москва

Контактная информация:
Флоринский Дмитрий Борисович, канд. мед. наук, врач-гематолог ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России
Адрес: 117997, Москва, ул. Саморы Машела, 1
E-mail: dmitriy.florinskiy@dgoi.ru

Дефицит фактора свертывания XIII (FXIII) является крайне редкой коагулопатией с распространенностью 1 случай на 2–3 млн. Данный дефицит характеризуется тяжелыми проявлениями кровоточивости в виде жизнеугрожающих кровотечений, в том числе повторных кровотечений в центральную нервную систему. В НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева на начало 2025 г. наблюдались 16 человек с дефицитом FXIII. Мировым стандартом терапии данной патологии является применение концентрата FXIII. С 2023 г. дети с подтвержденным наследственным дефицитом FXIII получают данный концентрат при помощи фонда «Круг добра». На момент публикации статьи 9 из 12 детей, которым была назначена терапия концентратом FXIII, начали его получать. У всех пациентов на фоне применения данной терапии наблюдается отсутствие спонтанной кровоточивости. В статье описаны особенности клинической картины, фенотипа и проявлений кровоточивости у пациентов с дефицитом FXIII, а также представлен опыт применения терапии концентратом FXIII. В данном исследовании использованы ретроспективные неперсонифицированные данные пациентов, полученные в ходе рутинной клинической практики, поэтому оно не требовало одобрения этическим комитетом.
Ключевые слова: *редкие коагулопатии, дефицит фактора свертывания XIII, профилактика, концентрат фактора свертывания XIII, дети*

Флоринский Д.Б. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2025; 24 (2): 74–9. DOI: 10.24287/1726-1708-2025-24-2-74-79

© 2025 by «D. Rogachev NMRCPHOI»

Received 19.04.2025
Accepted 21.05.2025

Hereditary factor XIII deficiency in children: diagnostic and clinical features and clinical experience with replacement therapy

D.B. Florinskiy[1], A.V. Pshonkin[1], A.V. Poletaev[1], E.A. Seregina[1, 2], P.A. Zharkov[1]

[1]The Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology of Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow
[2]Center for Theoretical Problems of Physical and Chemical Pharmacology, Russian Academy of Sciences, Moscow

Correspondence:
Dmitry B. Florinskiy, Cand. Med. Sci., a hematologist 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: dmitriy.florinskiy@dgoi.ru

Factor XIII deficiency is an extremely rare bleeding disorder with a prevalence of 1 in 2–3 millions. This deficiency is characterized by severe bleeding manifestations: life-threatening bleeding, including recurrent bleeding into the central nervous system. Here, we report 16 cases of factor XIII deficiency in children who were under our observation at the beginning of 2025. The use of factor XIII concentrate is a global standard for the treatment of patients with factor XIII deficiency. Since 2023, children with confirmed hereditary factor XIII deficiency have been receiving this concentrate with the help of the Circle of Kindness Foundation. By the time of publication, 9 out of 12 children who had been prescribed treatment with factor XIII concentrate started to receive it. All the patients receiving this therapy do not have spontaneous bleeding. In this article, we describe clinical and phenotypical features as well as bleeding manifestations in the patients with factor XIII deficiency and present our experience with factor XIII concentrate therapy. Ethical approval was not required since the study involved the use of anonymized retrospective data obtained during routine clinical practice.
Key words: *rare bleeding disorders, factor XIII deficiency, prophylactic treatment, factor XIII concentrate, children*

Florinskiy D.B., et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology 2025; 24 (2): 74–9. DOI: 10.24287/1726-1708-2025-24-2-74-79

Фактор свертывания XIII (FXIII) является фибринстабилизирующим, представлен про-гамма-трансглутаминазой, находящейся в плазме в форме гетеротетрамера (FXIII-A2B2), состоящего из носителя (FXIII-B2) и 2 каталитических субъединиц (FXIII-A2). Синтезируется как в гепатоцитах, так и в моноцитах, макрофагах и мегакариоцитах. Период полужизни составляет около 9–12 дней [1].

В каскаде свертывания крови FXIII участвует в конечной фазе, его активация вызывается тромбином. После активации FXIII ковалентно связывает 2 молекулы фибрина, таким образом происходит стабилизация фибринового сгустка [2]. Однако ролью в гемостазе действие FXIII не ограничивается. Также он принимает активное участие в процессах ангиогенеза, заживлении ран, сохранении беременности и кардиопротекции [2].

Субъединица FXIII-A кодируется геном, состоящим из 15 экзонов и 14 интронов. Этот ген охватывает геномную область 160 kb и находится на хромосоме 6p24–25. Субъединица FXIII-B кодируется геном, расположенным на хромосоме1q31–32.1, и состоит из 12 экзонов, 11 интронов и охватывает геномную область 28 kb [3].

Дефицит FXIII – редкая аутосомно-рецессивная коагулопатия с приблизительной частотой встречаемости около 1 случая на 2–3 млн [4].

По литературным данным, для дефицита FXIII характерна корреляция между проявлениями геморрагического синдрома и количеством фактора, т. е. чем он ниже, тем серьезнее будут кровотечения [5]. По степени тяжести дефицит FXIII делят на тяжелую, когда антиген или активность фактора ниже 1%, среднетяжелую (от 1 до 4%) и легкую (выше 5%) формы. Наиболее тяжелый геморрагический синдром характерен для пациентов с количеством фактора менее 1%. При тяжелой форме отмечается высокая частота внутричерепных кровоизлияний (до 40%), кровотечений со слизистых (до 30%). Особенностью клинических проявлений данного дефицита также является ранний дебют (у большинства пациентов это 1 месяц жизни) и наличие кровотечения из пуповинного остатка, которое нередко требует заместительных гемотрансфузий. У больных с активностью фактора выше 5% наличие жизнеугрожающих кровотечений достаточно нетипично и постановка диагноза у них может быть затруднительна ввиду лимитированного доступа к диагностике дефицита FXIII [6]. Особенностью данного дефицита также являются повторные эпизоды невынашивания беременности, что наблюдается в основном у пациенток с количеством фактора менее 5% [7].

Диагностика

Основой диагностики дефицита FXIII является хорошо собранный анамнез, особенно факт кровотечения из пуповинного остатка и выраженный геморрагический синдром без нарушений со стороны стандартной коагулограммы. Далее необходимо определение активности или антигена FXIII [8].

Так как пациенты с данным дефицитом имеют тяжелый фенотип кровоточивости, во всех случаях с количеством фактора ниже 5% рекомендована профилактическая заместительная терапия FXIII [8].

При наличии концентрата FXIII его вводят в дозе 40 Ед/кг в среднем каждые 4 нед для поддержания дефицитного фактора на уровне выше 5%. Тот же принцип характерен и для профилактики невынашивания беременности у пациенток с данным дефицитом.

Для лечения острых кровотечений также применяется FXIII в дозе 40 Ед/кг с дальнейшим повторным введением 20 Ед/кг при необходимости. Альтернативным методом терапии при отсутствии концентрата является применение криопреципитата – 1 доза на 10 кг массы тела, в случае его отсутствия – свежезамороженной плазмы в дозе 15–25 мл/кг [9]. Использование криопреципитата предпочтительнее, так как содержание FXIII в нем примерно в 3 раза выше, чем в свежезамороженной плазме, соответственно, и объем, требующийся для инфузии, в 3 раза меньше [10].

В целях профилактической терапии также возможно использование криопреципитата – 1 доза на 10 кг массы тела каждые 4–6 нед, либо свежезамороженной плазмы 10 мл/кг каждые 4–6 нед [11].

Ранее нами описан клинический случай попытки профилактического лечения пациентки с тяжелым дефицитом FXIII криопреципитатом с исследованием фармакокинетики FXIII, которое показало, что пациентке для поддержания активности дефицитного фактора требовалось около 2 трансфузий в месяц, соответственно, и 2 госпитализации в стационар в месяц, что, конечно же, не может способствовать комплаентности терапии [12].

На сегодняшний день существует 2 вида концентратов FXIII: плазматический, содержащий субъединицы A и B, и рекомбинантный, содержащий только субъединицу A (около 95% всех пациентов) [13]. Данные препараты не зарегистрированы на территории Российской Федерации (РФ). Однако с 2023 г. в рамках благотворительной программы плазматический концентрат закупается фондом «Круг добра» для детей с дефицитом FXIII, проживающих на территории РФ.

Цель данной работы – продемонстрировать особенности диагностики и клинического течения дефицита FXIII у детей, а также представить опыт применения концентрата FXIII у данных пациентов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В данном исследовании использованы ретроспективные неперсонифицированные данные пациентов, полученные в ходе рутинной клинической практики, поэтому оно не требовало одобрения этическим комитетом. Оценивался геморрагический синдром на основании данных анамнеза и опросника кровоточивости для детей (Pediatric Bleeding Questionnaire, PBQ) [14], исследование антигена FXIII (HemosIL Factor XIII Antigen, Instrumentation Laboratory, США) в большинстве случаев проводилось в лаборатории гемостаза НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева, однако некоторые образцы были исследованы по месту жительства. Оценивались также пол, возраст пациентов, время первого эпизода кровоточивости и возраст постановки диагноза. Концентрат FXIII всегда

назначался специалистами НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева из расчета 40 МЕ/кг каждые 28 дней внутривенно. Его эффективность определялась при помощи повторного сбора геморрагического анамнеза и субъективной оценки лечащими докторами по месту жительства.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На момент анализа в условиях НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева наблюдались 16 детей с дефицитом FXIII в возрасте от 9 месяцев до 16 лет, среди которых преобладали девочки (n = 13; 81%) (*таблица*).

Антиген дефицитного FXIII минимально составлял 0,7%, самое высокое значение – 47,8%. У большинства пациентов (n = 13; 81%) концентрация FXIII не превышала 5%. У 15 (94%) из 16 пациентов первые проявления геморрагического синдрома были зарегистрированы на первом году жизни и у 13 из них – на первом месяце жизни. Медиана возраста постановки диагноза составила 6 лет, при этом минимальный возраст составил 9 месяцев, а максимальный – 16 лет (*таблица*).

Все наблюдаемые пациенты имели значимые проявления геморрагического синдрома. Так, минимальное значение по шкале PBQ составило 7 баллов, максимальное – 16 баллов.

При анализе зависимости выраженности проявлений геморрагического синдрома от количества FXIII не было получено значимой корреляции (*рисунок 1*). Коэффициент корреляции (τ) Кендалла составил –0,31 (p = 0,12). Однако все пациенты, включенные в данный анализ, имели высокое значение по шкале PBQ (*таблица*).

При анализе проявлений кровоточивости (*рисунок 2*) наиболее часто наблюдался кожный геморрагический синдром, характеризовавшийся появлением крупных гематом, которые неоднократно требовали госпитализаций и проведения гемостатической терапии. Также для данной группы пациентов была характерна высокая частота кровотечений из пуповинного остатка (75%) и в центральную нервную систему (ЦНС) (62%), в том числе повторных (у 3 пациентов). Немного реже встречались кровотечения после удаления зубов и при мелких ранах/ссадинах. При этом кровотечения со слизистых, в частности из носа, меноррагии и гемартрозы наблюдались крайне редко, а послеоперационные кровотечения в нашей группе пациентов не встретились вовсе.

С 2023 г. благодаря программе благотворительного фонда «Круг добра» для терапии кровотечений

Таблица
Пациенты с дефицитом FXIII

Table
Patients with factor XIII (FXIII) deficiency

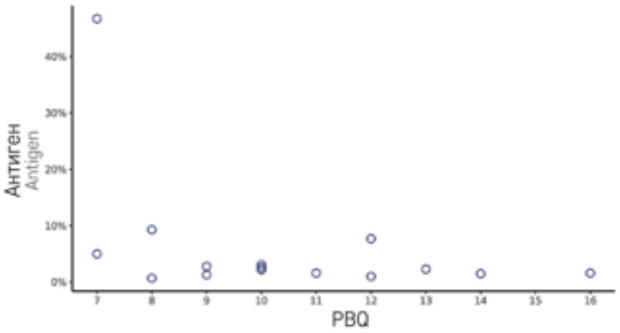
Пациент Patient	Антиген FXIII, % FXIII antigen, %	Шкала PBQ, баллы PBQ The PBQ, scores	Возраст первых проявлений Age of first manifestations	Возраст постановки диагноза Age of diagnosis	Время от первых проявлений до постановки диагноза Time from disease onset to diagnosis
№1	2,6	10	1 месяц 1 month	4 года 4 years	4 года 4 years
№2	9,3	8	1 месяц 1 month	12 лет 12 years	12 лет 12 years
№3	2,3	13	1 месяц 1 month	13 лет 13 years	13 лет 13 years
№4	1,6	16	1 месяц 1 month	16 лет 16 years	16 лет 16 years
№5	2,2	10	1 месяц 1 month	2 года 2 years	2 года 2 years
№6	1,5	14	1 месяц 1 month	2 года 2 years	2 года 2 years
№7	3,1	10	7 месяц 7 months	5 лет 5 years	4,5 года 4.5 years
№8	5	7	7 месяц 7 months	4 года 4 years	3,5 года 3.5 years
№9	1	12	1 месяц 1 month	8 лет 8 years	8 лет 8 years
№10	46,7	7	5 лет 5 years	16 лет 16 years	11 лет 11 years
№11	1,6	11	1 месяц 1 month	16 лет 16 years	16 лет 16 years
№12	0,7	8	1 месяц 1 month	6 лет 6 years	6 лет 6 years
№13	1,3	9	1 месяц 1 month	4 года 4 years	4 года 4 years
№14	2,8	9	1 месяц 1 month	9 месяцев 9 months	9 мес 9 months
№15	7,7	12	1 месяц 1 month	3 года 3 years	3 года 3 years
№16	2,0	12	1 месяц 1 month	9 лет 9 years	9 лет 9 years

и в качестве профилактического лечения пациенты с дефицитом FXIII обеспечиваются плазматическим концентратом FXIII (Фиброгаммин, CSL-Behring, Германия). Для профилактического лечения препарат применяется в стандартной дозе 40 МЕ/кг 1 раз в 28 дней. Из 16 пациентов на момент анализа 9 были обеспечены данным препаратом и применяли его в целях профилактики кровотечений или в случае кровотечения.

Согласно сообщениям лечащих врачей по месту жительства, осуществляющих наблюдение пациентов за период 12 мес профилактических введений в дозе 40 МЕ/кг, ни у одного пациента, начавшего терапию данным концентратом, не отмечалось проявлений спонтанной кровоточивости и/или тяжелых кровотечений. Кроме того, в ходе интервью лечащих врачей не было зарегистрировано ни одного случая нежелательных явлений, ассоциированных с применением данного препарата.

Рисунок 1
Корреляция антигена FXIII и выраженности геморрагического синдрома по данным шкалы PBQ

Figure 1
A correlation between FXIII antigen and bleeding severity evaluated using the PBQ



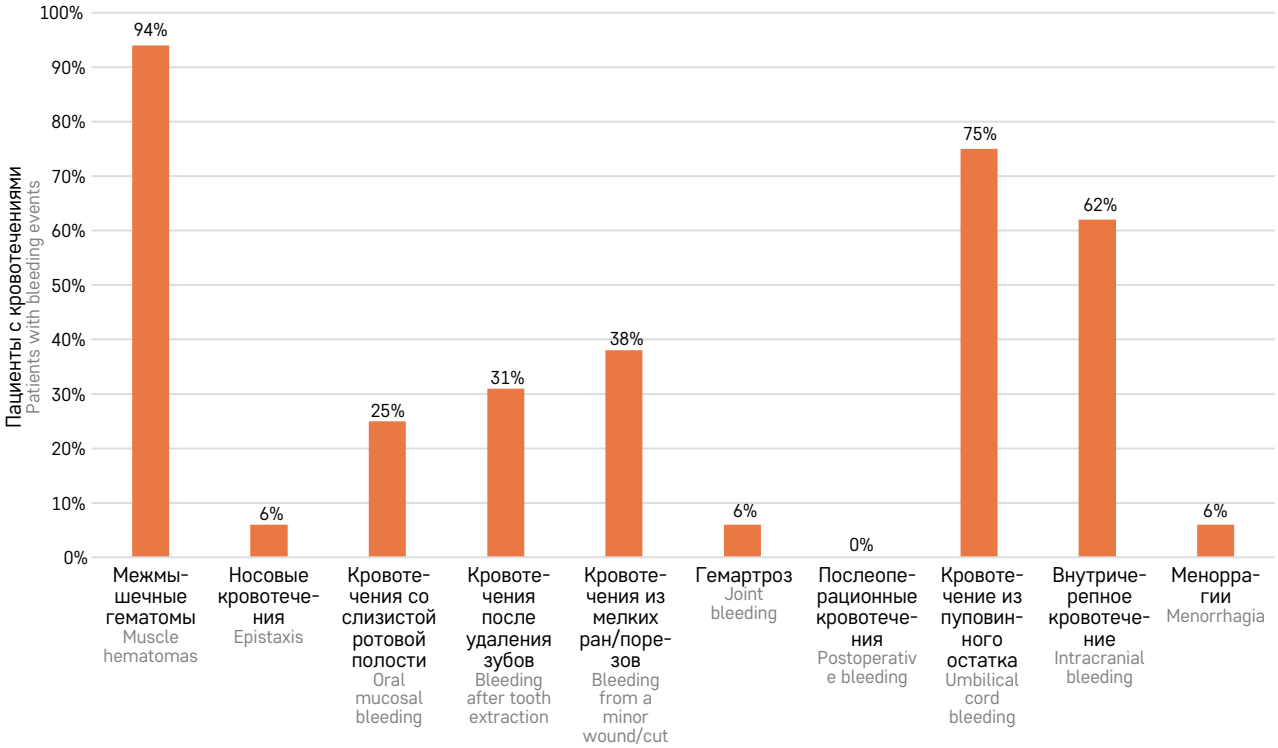
ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Нами представлена достаточно крупная группа пациентов с крайне редким дефицитом FXIII. Учитывая мировой опыт, мы можем подтвердить, что данная патология ассоциирована с крайне тяжелым фенотипом кровоточивости. У всех пациентов, вошедших в исследование, было определено высокое значение баллов по шкале PBQ, отражающее тяжесть кровотечений. Также выявлено большое число пациентов с кровотечением в ЦНС – более половины, что также соотносится с описанными случаями в мировой практике, где выявляется большое число больных с внутричерепными кровоизлияниями [4, 8].

Отдельно стоит отметить длительный период времени, предшествующий установлению диагноза дефицита FXIII. Медиана времени от момента первых клинических проявлений до постановки диагноза составила 6 лет, а время от первых проявлений до начала лекарственного обеспечения – около 7 лет, что характеризует неудовлетворительную диагностику данного дефицита на территории РФ. Хочется также отметить один из достаточно специфичных

Рисунок 2
Виды кровотечений у пациентов с дефицитом FXIII

Figure 2
Types of bleeding in the patients with FXIII deficiency



симптомов, характерных для дефицита FXIII – кровотечение из пуповинного остатка, которое встретилось у более двух третей пациентов и является одним из характерных признаков дефицита FXIII. Наличие малого количества меноррагий и послеоперационных кровотечений связано в основном с возрастом пациенток на момент анализа (медиана 6 лет), а также отсутствием оперативных вмешательств в анамнезе.

В нашем исследовании в основном (81%) были представлены пациенты с крайне низким содержанием FXIII – менее 5%, что изначально предполагает наличие тяжелых кровотечений [7, 8]. Возможно, многие пациенты с легкими формами дефицита FXIII так и остаются без диагноза в связи с низкой доступностью диагностики.

Результаты, полученные по данным корреляции геморрагических проявлений и количества FXIII, не должны нас удивлять и вводить в заблуждение. Хотя в данной работе не было получено достоверно значимой корреляции выраженности геморрагических проявлений по шкале PBQ со степенью снижения концентрации FXIII, это не означает, что она отсутствует в популяции. Во многом отсутствие данной корреляции можно объяснить тем фактом, что у большинства пациентов (11 из 16; 69%) антиген FXIII не превышал 3% и все из них имели выраженные проявления геморрагического синдрома (62% (10 из 16 пациентов) – кровотечения в ЦНС). В то же время у 3 пациентов с количеством фактора выше 3% наблюдались кровотечения в ЦНС, в 2 случаях они были неспровоцированными. Также у пациентки с количеством фактора 5% после минимальной травмы наблюдалось образование обширной забрюшинной гематомы. По литературным данным [3, 4, 8], у пациентов с количеством FXIII менее 5% наблюдаются наиболее выраженные проявления геморрагического синдрома. В наиболее крупной работе [15], где были проанализированы данные о 64 пациентах с дефицитом FXIII, наиболее тяжелый геморрагический синдром наблюдался у больных с количеством фактора ниже 15%, именно поэтому авторы постулируют необходимость проведения обязательной первичной заместительной профилактики пациентам с концентрацией антигена даже менее 15% [15].

Из 16 пациентов, представленных в настоящей работе, 12 детям с медианой концентрации антигена FXIII 2,1% была назначена терапия концентратом FXIII (Фиброгаммин, CSL-Behring, Германия). Девочке с количеством фактора 9,3% было рекомендовано введение концентрата только в случае кровотечения, остальным 11 пациентам в соответствии с международными рекомендациями [15] была назначена терапия концентратом FXIII в качестве профилактики 1 раз в 28 дней. Из 12 пациентов 9 получили хотя бы 1 введение 40 МЕ/кг концентрата FXIII в профилактической дозе и у них полностью отсутствовала спонтанная кровоточивость, что указывает на хорошую эффективность данного препарата. По данным проведенных фармакокинетических исследований, безопасности и эффективности этого препарата было показано, что при его применении у 13 пациентов также не наблюдалось кровотечений и значимых побочных реакций [16]. В другом исследовании [17] при сравнении с группой контроля без факторной терапии у 7 пациентов наблюдалось 0,2 эпизода кровоточивости в год, в группе контроля же – 2,5 эпизода спонтанной кровоточивости, также не было выявлено и значимых побочных реакций на введение концентрата [16, 17].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дефицит FXIII является редкой коагулопатией с тяжелым фенотипом кровоточивости. Специфическими для данного заболевания геморрагическими проявлениями являются кровотечения из пуповинного остатка и высокая частота внутричерепных кровоизлияний, в том числе повторных. Основой терапии данного дефицита является применение концентрата FXIII как по факту кровотечения, так и в профилактическом режиме. Применение данного концентрата позволяет снизить спонтанную кровоточивость и избежать жизнеугрожающих кровотечений.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ
Не указан.

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

ORCID
Florinskiy D.B. ORCID: https://orcid.org/0000-0003-4555-9337
Zharkov P.A. ORCID: https://orcid.org/0000-0003-4384-6754
Poletaev A.V. ORCID: https://orcid.org/0000-0001-5209-2099
Pshonkin A.V. ORCID: https://orcid.org/0000-0002-2057-2036
Seregina E.A. ORCID: https://orcid.org/0000-0002-7534-3863

Литература / References

1. Komáromi I., Bagoly Z., Muszbek L. Factor XIII: novel structural and functional aspects. J Thromb Haemost 2011; 9 (1): 9–20. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2010.04070.x
2. Karimi M., Bereczky Z., Cohan N., Muszbek L. Factor XIII Deficiency. Semin Thromb Hemost 2009; 35 (4): 426–38. DOI: 10.1055/s-0029-1225765
3. Tahlan A., Ahluwalia J. Factor XIII: congenital deficiency factor XIII, acquired deficiency, factor XIII A-subunit, and factor XIII B-subunit. Arch Pathol Lab Med 2014; 138 (2): 278–81. DOI: 10.5858/arpa.2012-0639-RS
4. Dorgalaleh A., Rashidpanah J. Blood coagulation factor XIII and factor XIII deficiency. Blood Rev 2016; 30 (6): 461–75. DOI: 10.1016/j.blre.2016.06.002
5. Kohler H.P., Ichinose A., Seitz R., Ariens R.A.S., Muszbek L.; Factor XIII And Fibrinogen SSC Subcommittee Of The ISTH. Diagnosis and classification of factor XIII deficiencies. J Thromb Haemost 2011; 9 (7): 1404–6. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2011.04315.x
6. Naderi M., Dorgalaleh A., Alizadeh S., Tabibian S., Hosseini S., Shamsizadeh M., Bamedi T. Clinical manifestations and management of life-threatening bleeding in the largest group of patients with severe factor XIII deficiency. Int J Hematol 2014; 100 (5): 443–9. DOI: 10.1007/s12185-014-1664-1
7. Inbal A., Muszbek L. Coagulation factor deficiencies and pregnancy loss. Semin Thromb Hemost 2003; 29 (2): 171–4. DOI: 10.1055/s-2003-38832
8. Hsieh L., Nugent D. Factor XIII deficiency. Haemophilia 2008; 14 (6): 1190–200. DOI: 10.1111/j.1365-2516.2008.01857.x
9. Mumford A.D., Ackroyd S., Alikhan R., Bowles L., Chowdary P., Grainger J., et al.; BCSH Committee. Guideline for the diagnosis and management of the rare coagulation disorders: a United Kingdom Haemophilia Centre Doctors' Organization guideline on behalf of the British Committee for Standards in Haematology. Br J Haematol 2014; 167 (3): 304–26. DOI: 10.1111/bjh.13058
10. Caudill J.S.C., Nichols W.L., Plumhoff E.A., Schulte S.L., Winters J.L., Gastineau D.A., Rodriguez V. Comparison of coagulation factor XIII content and concentration in cryoprecipitate and fresh-frozen plasma. Transfusion 2009; 49 (4): 765–70. DOI: 10.1111/j.1537-2995.2008.02021.x
11. Sharief L.A.T., Kadir R.A. Congenital factor XIII deficiency in women: a systematic review of literature. Haemophilia 2013; 19 (6): e349–57. DOI: 10.1111/hae.12259
12. Флоринский Д.Б., Пшонкин А.В., Полетаев А.В., Фёдорова Д.В., Серёгина Е.А., Урсуленко Е.В. и др. Дефицит XIII фактора – там, где мы можем спасти. Российский журнал детской гематологии и онкологии 2021; 8 (4): 90–4. DOI: 10.21682/2311-1267-2021-8-4-90-94 [Florinsky D.B., Pshonkin A.V., Poletaev A.V., Fedorova D.V., Seregina E.A., Ursulenko E.V., et al. Factor XIII deficiency – where we can save. Russian Journal of Pediatric Hematology and Oncology 2021; 8 (4): 90–4. (In Russ.)].
13. Lassila R. Clinical Use of Factor XIII Concentrates. Semin Thromb Hemost 2016; 42 (4): 440–4. DOI: 10.1055/s-0036-1572324
14. Яфошкина Т.Ю., Флоринский Д.Б., Пшонкин А.В., Федорова Д.В., Полетаев А.В., Серегина Е.А. и др. Оценка чувствительности и специфичности детского опросника кровоточивости при различных геморрагических заболеваниях. Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского 2021; 100 (3): 35–41. [Yafoshkina T.Yu., Florinskiy D.B., Pshonkin A.V., Fedorova D.V., Poletaev A.V., Seregina E.A., et al. Evaluation of the sensitivity and specificity of the Pediatric bleeding questionnaire in various hemorrhagic disorders. Pediatria n.a. G.N. Speransky 2021; 100 (3): 35–41. (In Russ.)].
15. Menegatti M., Palla R., Boscarino M., Bucciarelli P., Muszbek L., Katona E., et al.; PRO-RBDD study group. Minimal factor XIII activity level to prevent major spontaneous bleeds. J Thromb Haemost 2017; 15 (9): 1728–36. DOI: 10.1111/jth.13772
16. Nugent D., Ashley C., García-Talavera J., Lo L., Mehdi A., Mangione A. Pharmacokinetics and safety of plasma-derived factor XIII concentrate in patients with congenital factor XIII deficiency. Haemophilia 2015; 21 (1): 95–101.
17. Lusher J., Pipe S.W., Alexander S., Nugent D. Prophylactic therapy with Fibrogammin P is associated with a decreased incidence of bleeding episodes: a retrospective study. Haemophilia 2010; 16 (2): 316–21. DOI: 10.1111/j.1365-2516.2009.02123.x

DOI: 10.24287/1726-1708-2025-24-2-80-85

© 2025 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России

Поступила 19.05.2025
Принята к печати 09.06.2025

EDN: LCDFRG

Цитофлуориметрический анализ свойств эритроцитной взвеси: результаты пилотного исследования

И.А. Чабин[1], Н.А. Подоплелова[1, 2], Е.О. Артеменко[1, 2], Н.Н. Старостин[1], П.Е. Трахтман[1, 3], Н.С. Сметанина[1], М.А. Пантелеев[1, 2, 4]

[1]ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, Москва
[2]ФГБУН «Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии» РАН, Москва
[3]ФГБОУ «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России, Москва
[4]ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», Москва

Контактная информация:
Чабин Иван Андреевич, лаборант-исследователь лаборатории клеточного гемостаза и тромбоза ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России
Адрес: 117997, Москва, ул. Саморы Машела, 1
E-mail: ivan.chabin@dgoi.ru

Широкое применение препаратов крови неизбежно ведет к увеличению числа осложнений, связанных с ним. Одним из редких и трудноконтролируемых осложнений являются тромбоэмболические события. В настоящее время механизмы и возможные лабораторные предикторы таких осложнений неясны. В данной работе представлен опыт применения проточной цитофлуориметрии для оценки параметров экспрессии фосфатидилсерина (детектируемой по связыванию аннексина V) и описаны нарушения деформируемости эритроцита (детектируемого по данным прямого и бокового светорассеяния), которые обусловливают прокоагулянтные свойства клеток. Полученные результаты демонстрируют спорную возможность применения аннексина V для оценки процесса постепенной гибели клеток в образцах эритроцитной взвеси, одновременно показывая большую чувствительность оценки накопления эритроцитов измененной формы для детекции программируемой клеточной гибели – эриптоза. Результаты данной работы могут быть использованы для улучшения детекции погибших эритроцитов в рутинной практике хранения эритроцитной взвеси. Настоящее исследование одобрено независимым этическим комитетом и утверждено решением ученого совета ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России.

Ключевые слова: *эритроцитная взвесь, проточная цитофлуориметрия, фосфатидилсерин, лактадхерин, аннексин V*

Чабин И.А. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2025; 24 (2): 80–5.
DOI: 10.24287/1726-1708-2025-24-2-80-85

© 2025 by «D. Rogachev NMRCPHOI»

Received 19.05.2025
Accepted 09.06.2025

Cytofluorometry analysis of red blood cell suspension properties: results of a pilot study

I.A. Chabin[1], N.A. Podoplelova[1, 2], E.O. Artemenko[1, 2], N.N. Starostin[1], P.E. Trakhtman[1, 3], N.S. Smetanina[1], M.A. Panteleev[1, 2, 4]

[1]The Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology of Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow
[2]Center for Theoretical Problems of Physical and Chemical Pharmacology, Russian Academy of Sciences, Moscow
[3]Russian Medical Academy of Continuous Professional Education of Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow
[4]The M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow

Correspondence:
Ivan A. Chabin, a research technician at the Laboratory of Cellular Hemostasis and Thrombosis at 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: ivan.chabin@dgoi.ru

A wide use of blood products inevitably leads to an increase in the number of complications associated with it. These complications include thromboembolic events that are considered to be rare and difficult-to-manage. Currently, the mechanisms and possible laboratory predictors of such complications are unclear. This paper presents our experience of using flow cytometry to assess the parameters of phosphatidylserine expression (detected by Annexin V binding) and describes impairments in the deformability of red blood cells (detected using forward and side scatter data) which determine the procoagulant properties of cells. According to our findings, the use of Annexin V for the assessment of gradual cell death in the samples of red blood cell (RBC) suspension is controversial. At the same time, our results show a higher sensitivity of the assessment of the accumulation of RBCs with an altered shape for the detection of programmed cell death – eryptosis. The obtained results can be used to improve the detection of dead RBCs during the routine storage of RBC suspension. 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 the Russian Federation.

Key words: *red blood cell suspension, flow cytometry, phosphatidylserine, lactadherin, annexin V*

Chabin I.A., et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology 2025; 24 (2): 80–5.
DOI: 10.24287/1726-1708-2025-24-2-80-85

Эритроцитная взвесь – один из самых распространенных и повсеместно применяемых компонентов крови. Так, в США ежегодно проводится более 10 млн трансфузий эритроцитсодержащих препаратов крови, и это число продолжает ежегодно увеличиваться [1, 2]. Спектр причин состояний, требующих их применения, крайне обширен, а вопрос определения показаний продолжает интенсивно обсуждаться [3–5]. В 2008 г. в крупном многоцентровом исследовании было продемонстрировано, что длительность хранения эритроцитсодержащих препаратов крови коррелирует с частотой осложнений при их применении [6]. В недавнем исследовании, проведенном в педиатрической популяции, была показана взаимосвязь длительности хранения препаратов эритроцитов с таким редким и тяжелым

осложнением, как венозные тромбоэмболические события после выполнения оперативного вмешательства. Частота таких осложнений ежегодно растет, в том числе и за счет увеличения количества проводимых операций [7].

Точные механизмы, посредством которых переливание эритроцитсодержащих препаратов приводит к возникновению тромбоэмболии, остаются неясными. Основными причинами принято считать накопление микровезикул [8], изменение формы клеток [9], а также увеличение экспрессии фосфатидилсерина на внешней мембране эритроцитов [10, 11]. Известны сообщения о кратном детектируемом росте экспрессии фосфатидилсерина при хранении эритроцитной взвеси, который наиболее заметен при использовании в качестве маркера экспрессии фосфатидилсерина лактадхерина в сравнении с аннексином V [12]. В то же время в ряде работ по изучению экспрессии фосфатидилсерина, например для эритроцитарных ($CD235^+$) микровезикул в хранимых продуктах крови, сообщается об отсутствии значимых различий для данных маркеров [8].

Что касается вопросов изменения формы клеток, то в недавних работах была продемонстрирована возможность детекции особой субпопуляции клеток методом проточной цитофлуориметрии с окраской CFDA-SE (carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester). Эта популяция характеризуется изменением ряда параметров: увеличением экспрессии фосфатидилсерина, необратимой деградацией внутриклеточных белков, исчерпанием внутриклеточных энергетических субстратов, а также изменением формы клеток (по данным сканирующей электронной микроскопии) [9].

Собственный опыт ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России в оценке параметров эритроцитсодержащих препаратов крови представлен в ряде публикаций [10, 13]. В этих работах уровень экспрессии фосфатидилсерина на мембранах клеток оценивался с использованием одного маркера – аннексина V. Отмечался статистически значимый прирост количества фосфатидилсерин-положительных клеток только при сравнении точек начала и окончания хранения препаратов. В остальном различия оставались незначимыми, и, что более интересно, статистически значимой разницы при сравнении хранившихся образцов эритроцитной взвеси с образцом цельной крови (в день заготовки препаратов крови) выявлено не было [10].

В данной работе представлены результаты пилотного исследования хранения лейкофильтрованной облученной эритроцитной взвеси, включающего оценку экспрессии фосфатидилсерина с использованием 2 маркеров – лактадхерина и аннексина V, а также анализ изменений морфологии клеток по параметрам прямого и бокового светорассеяния с использованием проточной цитофлуориметрии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

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

Приготовление эритроцитной взвеси и общая схема эксперимента

Цельную кровь здоровых доноров, подписавших добровольное информированное согласие на участие в исследовании, заготавливали в соответствии со стандартным протоколом, принятым в НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева. В качестве антикоагулянта использовался CPD (цитрат натрия, лимонная кислота, дигидрофосфат натрия, глюкоза, IMUFLEX-WB-RP, Terumo, Бельгия), в качестве добавочного раствора – SAGM (хлорид натрия, аденин, глюкоза, маннитол, IMUFLEX-WB-RP, Terumo, Бельгия). Далее кровь подвергалась лейкофильтрации, после чего облучалась на аппарате «АРДОК-1» (ООО НПП «Велит», Истра, Россия) в дозе 25 Гр. Хранение готовых препаратов крови осуществлялось при температуре 6 ± 2°C. Забор образцов для анализа на проточном цитофлуориметре проводился из проб на 1-е (начало), 14-е (середина) и 28-е (окончание) сутки хранения.

Протокол цитофлуориметрического исследования

Для цитофлуориметрического анализа образцы разводили в 1000 раз буфером Тироде (150 мМ хлорида натрия, 2,7 мМ хлорида калия, 1 мМ хлорида магния, 0,4 мМ дигидрофосфата натрия, 20 мМ HEPES (4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота), 5 мМ глюкозы и 0,5% бычьего сывороточного альбумина; pH 7,4). Разведенная кровь инкубировалась с рекомбинантными лактадхерином – mNeonGreen и аннексином V, конъюгированным с флуоресцентной меткой AF647, в присутствии 2 мМ хлорида кальция в течение 15 мин [14]. Рабочие концентрации маркеров фосфатидилсерина (аннексин V и лактадхерин) составляли в анализируемой пробе 100 нМ. В качестве отрицательного контроля связывания для аннексина V использовалась окрашенная проба в присутствии 2 мМ ЭДТА (динатриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты, хелатор ионов кальция). После инкубации пробы измеряли на проточном цитофлуориметре FACSCanto II (BD Biosciences, США) при средней скорости потока. Общее число событий, собираемых для анализа в пробе, составляло 150 000.

Обработка результатов и статистический анализ

Результаты проточной цитофлуориметрии анализировали с помощью оригинального программного обеспечения FACSDiva (BD Biosciences, США). Для статистического анализа использовалось программное обеспечение Origin 2018b (OriginLab Corporation, США) с применением метода дисперсионного анализа (ANOVA). Для оценки значимости связывания маркеров фосфатидилсерина использовался одновыборочный t-критерий Стьюдента. Отличия считались статистически достоверными при значении $p < 0{,}05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В ходе работы для 3 временных точек в течение срока хранения эритроцитной взвеси при помощи проточной цитофлуориметрии были оценены 3 параметра:

1) процент клеток с измененной формой (по прямому и боковому светорассеянию);

2) процент клеток, связывающих лактадхерин;

3) процент клеток, связывающих аннексин V (*рисунок 1*).

Рисунок 1
Проточная цитофлуориметрия эритроцитной взвеси
А – представлены стратегии гейтирования эритроцитов, а также выделения субпопуляции измененной формы (окрашена голубым); Б – в качестве контроля того, что события региона измененной формы являются эритроцитами, приведены результаты окрашивания образца эритроцитной взвеси антителами к гликофорину А (CD235a); В, Г – представлены стратегии выделения лактадхерин- и аннексин V-связывающих клеток соответственно

Figure 1
Flow cytometry analysis of red blood cell suspension
A – the figure presents strategies for gating red blood cells as well as identifying a subpopulation of RBCs with an altered shape (colored blue); Б – the figure provides the results of staining of a sample of RBC suspension with antibodies to glycophorin A (CD235a) as evidence that the events of the region with an altered shape are erythrocytes; В, Г – the figures present strategies for identifying lactadherin binding and Annexin V binding cells, respectively

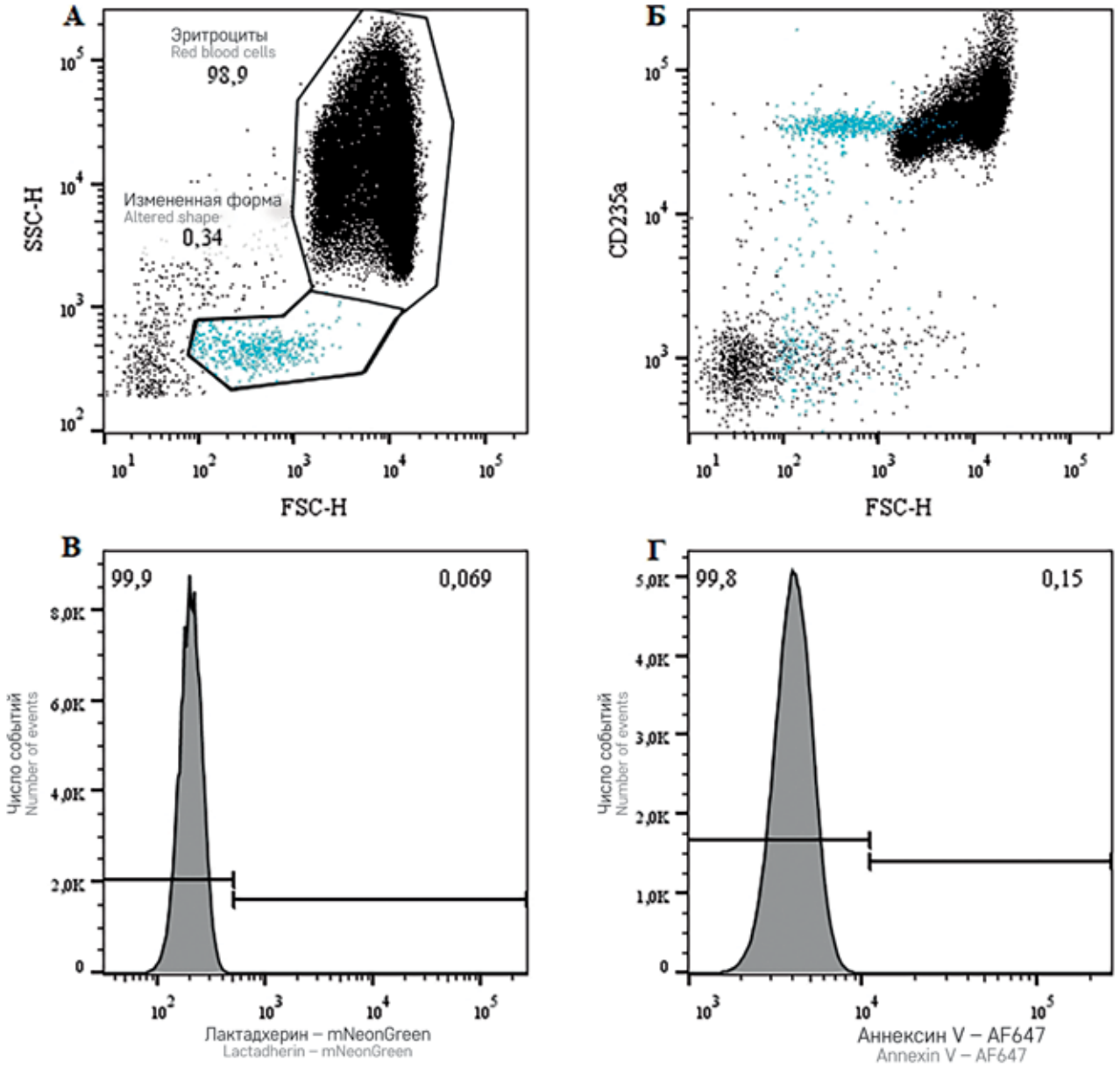
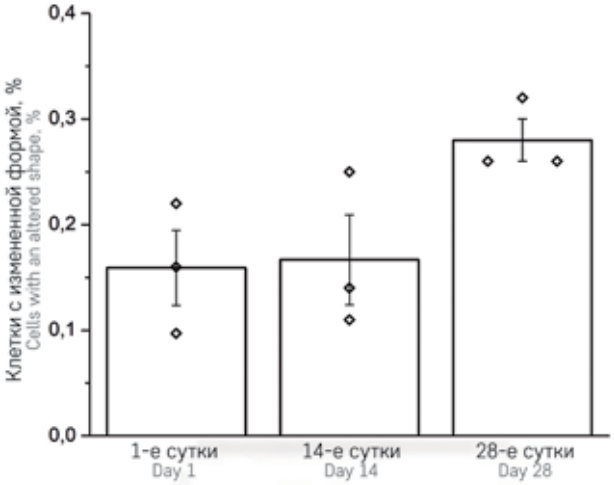


Рисунок 2
Процент клеток с измененными параметрами светорассеяния в образцах эритроцитной взвеси
Продемонстрирована зависимость процента клеток измененной формы от срока хранения эритроцитной взвеси. Данные приведены для 3 образцов в каждой точке хранения. Гистограммы представлены как средние значения ± их стандартные ошибки. Точками обозначены измеренные данные для каждого образца

Figure 2
The percentage of cells with altered light scatter parameters in the RBC suspension samples
The dependence of the percentage of cells with an altered shape on the duration of RBC suspension storage is shown. The data are presented for 3 samples at each time point during the storage. The histograms are presented as mean values ± standard errors. The dots represent the measured data for each sample



По данным цитофлуориметрического анализа с течением времени отмечался постепенный прирост субпопуляции клеток с измененными показателями прямого и бокового светорассеяния и клеток, потерявших свою дискоидную форму, вероятно, вследствие хранения (*рисунок 2*). Изменение формы клетки является одним из признаков протекания процесса программируемой клеточной гибели – эриптоза. При дисперсионном анализе между группами отмечена лишь тенденция к статистически значимому различию (p = 0,08), что, вероятно, объясняется малым размером выборки (n = 3).

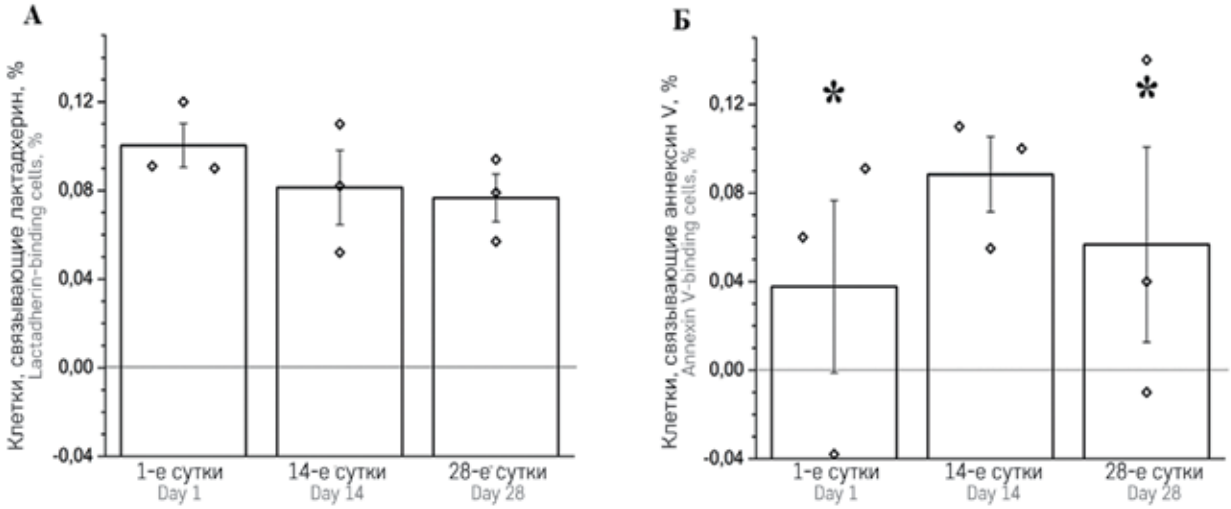
При исследовании уровня экспрессии фосфатидилсерина при помощи лактадхерина и аннексина V видимой динамики изменения процента фосфатидилсерин-положительной субпопуляции эритроцитов не отмечалось вне зависимости от используемого маркера (*рисунок 3*). Однако результаты специфического связывания аннексина V (после вычитания процента фосфатидилсерин-положительных событий в контрольной пробе) достоверно не детектировались для измерений на 1-е (p = 0,45) и 28-е (p = 0,33) сутки.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование, а возможно, и рутинная характеристика свойств эритроцитной взвеси могут

Рисунок 3
Процент фосфатидилсерин-экспрессирующих эритроцитов в эритроцитной взвеси
Продемонстрирована зависимость процента фосфатидилсерин-положительных эритроцитов от длительности хранения эритроцитов при оценке с использованием лактадхерина (А) и аннексина V (Б). Процент фосфатидилсерин-положительных клеток для аннексина V представлен как разность процента в присутствии 2 мМ хлорида кальция и 2 мМ ЭДТА. Статистически значимого изменения с течением времени не отмечалось. Связывание в образцах, отмеченных знаком «*», по данным одновыборочного t-критерия Стьюдента достоверно не отличалось от 0 (p > 0,05). Гистограммы представлены как средние значения ± их стандартные ошибки. Точками обозначены измеренные данные для каждого образца

Figure 3
The percentage of phosphatidylserine-expressing RBCs in the RBC suspension
The figure shows the dependence of the percentage of phosphatidylserine-positive erythrocytes on the duration of erythrocyte storage when assessed using lactadherin (A) and Annexin V (Б). The percentage of phosphatidylserine-positive cells for Annexin V is presented as a difference in the percentage of phosphatidylserine-positive cells for annexin V in the presence of 2 mM calcium chloride and 2 mM EDTA. No statistically significant changes were observed over time. According to the one-sample Student's t-test, binding in the samples marked with "*" was not significantly different from 0 (p > 0.05). The histograms are presented as mean values ± standard errors. The dots represent the measured data for each sample



быть использованы в дальнейшем для снижения частоты посттрансфузионных осложнений. Продолжаются исследования возможностей улучшения качества эритроцитной взвеси при помощи манипулирования препаратами крови [15, 16]. Использование проточной цитофлуориметрии для решения этих задач в настоящее время постепенно становится рутиной.

Представленные в данной работе результаты ставят под сомнение эффективность использования аннексина V для оценки параметров хранимой эритроцитной взвеси. Однако даже использование более чувствительного маркера фосфатидилсерина, лактадхерина, не позволило достоверно выявить накопление потенциально прокоагулянтных эритроцитов по мере хранения эритроцитарной взвеси. Возможно, этот результат обусловлен недостаточным объемом выборки, и он нуждается в дальнейшей проверке. В литературе представлено описание во многом обратных результатов [12], но это расхождение, скорее всего, обусловлено различиями в методике пробоподготовки.

В то время как использование маркеров фосфатидилсерина не позволило зафиксировать значимые различия во время хранения, оценка морфологии эритроцитов через параметры прямого и бокового светорассеяния выявила постепенное накопление эритроцитов измененной формы, что соотносится с известными литературными данными. Одновременно открывается возможность соотнесения данных проточной цитофлуориметрии с результатами других методов, например эритроцитометрии. Другим направлением развития может стать добавление других известных маркеров повреждения эритроцитов, например CFDA-SE [9].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе представлены результаты пилотного исследования цитофлуориметрических параметров эритроцитной взвеси, приведен протокол такой оценки, а также определены перспективы развития данного метода. В ходе сравнительного анализа эффективности применения различных маркеров фосфатидилсерина (аннексин V и лактадхерин) не удалось выявить значимых различий в динамике накопления фосфатидилсерин-экспрессирующих клеток при хранении эритроцитной взвеси. Однако также продемонстрирован отрицательный опыт использования аннексина V для этих целей. В то же время в работе была продемонстрирована возможность применения проточной цитофлуориметрии для детекции эритроцитов с измененной формой, которые могут рассматриваться как вступившие в фазу эриптоза.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ
Работа поддержана грантом Российского научного фонда №25-25-20101.

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

ORCID
Chabin I.A. ORCID: https://orcid.org/0000-0003-0625-1743
Podoplelova N.A. ORCID: https://orcid.org/0000-0001-8013-1112
Artemenko E.O. ORCID: https://orcid.org/0000-0002-0193-0723
Starostin N.N. ORCID: http://orcid.org/0000-0002-1219-8654
Trakhtman P.E. ORCID: https://orcid.org/0000-0002-0231-1617
Smetanina N.S. ORCID: https://orcid.org/0000-0003-2756-7325
Panteleev M.A. ORCID: https://orcid.org/0000-0002-8128-7757

Литература / References

1. McDavid K., Lien R., Chavez Ortiz J., Bradley T., Luciano A., Griffin I., et al. Have we reached a new baseline for blood collection and transfusion in the United States? National Blood Collection and Utilization Survey, 2023. Transfusion 2025. DOI: 10.1111/trf.18187
2. Free R.J., Sapiano M.R.P., Chavez Ortiz J.L., Stewart P., Berger J., Basavaraju S.V., et al. Continued stabilization of blood collections and transfusions in the United States: Findings from the 2021 National Blood Collection and Utilization Survey. Transfusion 2023; 63 (Suppl 4): S8–18.
3. Sokou R., Gounari E.A., Tsantes A.G., Piovani D., Bonovas S., Tsantes A.E., Iacovidou N. Bridging the evidence-to-practice gap: Advancing neonatal blood transfusion. A narrative review of recent guidelines. Blood Rev 2025; 71: 101282.
4. Garozzo G., Messina R., Manca P., Aquilina A. Transfusion in hemoglobinopathies and red blood cell alloimmunization: data from Sicily, Sardinia and Malta. Blood Transfus 2024; 22 (2): 111–21.
5. Аксельрод Б.А., Балашова Е.Н., Баутин А.Е., Баховадинов Б.Б., Бирюкова Л.С., Буланов А.Ю. и др.

Клиническое использование эритроцитсодержащих компонентов донорской крови. Гематология и трансфузиология 2018; 63 (4): 372–435. [Akselrod B.A., Balashova E.N., Bautin A.E., Bakhovadinov B.B., Biryukova L.S., Bulanov A.Yu., et al. Clinical guidelines for red blood cell transfusion. Gematologiya i transfusiologiya 2018; 63 (4): 372–435. (In Russ.)].
6. Koch C.G. et al. Duration of red-cell storage and complications after cardiac surgery. N Engl J Med. N Engl J Med, 2008. Vol. 358, № 12. P. 1229–1239.
7. Goel R., Josephson C.D., Patel E.U., Petersen M.R., Makhani S., Frank S.M., et al. Perioperative Transfusions and Venous Thromboembolism. Pediatrics 2020; 145 (4): e20192351.
8. Aung H.H., Tung J.-P., Dean M.M., Flower R.L., Pecheniuk N.M. Procoagulant role of microparticles in routine storage of packed red blood cells: potential risk for prothrombotic post-transfusion complications. Pathology 2017; 49 (1): 62–9.
9. Peltier S., Marin M., Dzieciatkowska M., Dussiot M., Kalani Roy M., Bruce J., et al. Proteostasis and metabolic dysfunction characterize a subset of storage-induced senescent erythrocytes targeted for post-transfusion clearance. J Clin Invest 2025; 135 (9): e183099.
10. Кумукова И.Б., Трахтман П.Е., Старостин Н.Н., Борсакова Д.В., Игнатова А.А., Федотов А.Ю. и др. Сравнение лабораторных показателей патогенредуцированных и рентгеноблученных эритроцитных взвесей. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2018; 17 (1): 64–74. DOI: 10.24287/1726-1708-2018-17-1-64-74 [Kumukova I.B., Trakhtman P.E., Starostin N.N., Borsakova D.V., Ignatova A.A., Fedotov A.Yu., et al. Comparison of laboratory parameters of X-ray irradiated erythrocyte suspensions and suspensions, prepared from whole blood pre-treated with ultraviolet in the presence of riboflavin. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology 2018; 17 (1): 64–74. (In Russ.)].
11. Lang E., Pozdeev V.I., Xu H.C., Shinde P.V., Behnke K., Hamdam J.M., et al. Storage of erythrocytes induces suicidal erythrocyte death. Cell Physiol Biochem 2016; 39 (2): 668–76.
12. Lu C., Shi J., Yu H., Hou J., Zhou J. Procoagulant activity of long-term stored red blood cells due to phosphatidylserine exposure. Transfus Med 2011; 21 (3): 150–7.
13. Кумукова И.Б., Старостин Н.Н., Левин П.А., Трахтман П.Е., Солопова Г.Г. Патоген-редуцированная эритроцитная взвесь в детской трансфузионной практике. Гематология и трансфузиология 2025; 70 (1): 51–61. DOI: 10.35754/0234-5730-2025-70-1-51-61 [Kumukova I.B., Starostin N.N., Levin P.A., Trakhtman P.E., Solopova G.G. Pathogen-reduced red blood cell suspension in pediatric transfusion practice. Russian journal of hematology and transfusiology 2025; 70 (1): 51–61. (In Russ.)].
14. Koltsova E., Avilova A., Nikolaeva E., Kolchin N., Butov K. Engineered Fluorescent Variants of Lactadherin C2 Domain for Phosphatidylserine Detection in Flow Cytometry. Biomolecules 2025; 15: 673.
15. Pulliam K.E., Joseph B., Makley A.T., Caldwell C.C.1, Lentsch A.B., Goodman M.D., Pritts T.A., et al. Washing packed red blood cells decreases red blood cell storage lesion formation. Surgery 2021; 169 (3): 666–70.
16. Xia H., Khanal G., Strachan B.C., Vörös E., Piety N.Z., Gifford S.C., Shevkoplyas S.S. Washing in hypotonic saline reduces the fraction of irreversibly-damaged cells in stored blood: a proof-of-concept study. Blood Transfus 2017; 15 (5): 463–71.

DOI: 10.24287/1726-1708-2025-24-2-86-94

© 2025 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России

Поступила 27.02.2025
Принята к печати 21.05.2025

EDN: LZDMEC

Влияние двух стратегий трансфузии эритроцитсодержащих компонентов крови на исходы и частоту анемии после выписки у недоношенных детей с экстремально низкой массой тела при рождении

Д.Р. Шарафутдинова[1, 2], Е.Н. Балашова[1, 2], А.А. Пучкова[1], А.В. Дегтярева[1, 2], А.Р. Киртбая[1, 2], Р.А. Лутфуллина[1], Т.К. Цечоева[1], А.А. Козловская[1], О.В. Ионов[1, 2]

[1]ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И. Кулакова» Минздрава России, Москва
[2]ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва

Контактная информация:
Шарафутдинова Дияна Рашидовна, канд. мед. наук, старший научный сотрудник, врач-анестезиолог-реаниматолог отделения реанимации и интенсивной терапии им. проф. А.Г. Антонова Института неонатологии и педиатрии, ассистент кафедры непрерывного профессионального образования и симуляционных технологий ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России; доцент кафедры неонатологии Клинического института детского здоровья им. Н.Ф. Филатова ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет)
Адрес: 119435, Москва, ул. Большая Пироговская, 2, стр. 4
E-mail: dikarush@gmail.com

Недоношенные новорожденные с экстремально низкой массой тела при рождении являются основной категорией детей, получающих одну трансфузию донорских эритроцитсодержащих компонентов (ЭСК) крови и более в течение неонатального периода для коррекции анемии. Существующие стратегии переливания подразделяются на либеральную, направленную на поддержание более высокого уровня гемоглобина, и рестриктивную, при которой трансфузия назначается на более низких уровнях гемоглобина. Цель: сравнить неонатальные исходы и частоту развития анемии после выписки в течение 24 месяцев жизни у детей с экстремально низкой массой тела при рождении, получавших трансфузии донорских ЭСК крови по либеральной и рестриктивной стратегиям. Исследование одобрено комиссией по этике биомедицинских исследований (протокол №12 от 17 ноября 2016 г.) и утверждено решением ученого совета (протокол №19 от 29 ноября 2016 г.) ФГБУ «НМИЦ АГП им. акад. В.И. Кулакова» Минздрава России. На базе клинических отделений Института неонатологии и педиатрии ФГБУ «НМИЦ АГП им. акад. В.И. Кулакова» Минздрава России проведено одноцентровое ретроспективное когортное исследование. Пациенты были разделены на 2 группы: дети, которым проводились трансфузии донорских ЭСК крови по либеральной (1-я группа) и рестриктивной (2-я группа) стратегиям. Определяли частоту таких исходов, как ретинопатия недоношенных (РН) ≥ III степени, некротизирующий энтероколит (НЭК) ≥ II степени, бронхолегочная дисплазия (БЛД), внутрижелудочковые кровоизлияния (ВЖК) ≥ II степени, перивентрикулярная лейкомаляция (ПВЛ); анемия после выписки в скорректированных возрастах (СВ) 1, 3, 6, 12 18 и 24 месяца жизни. Гестационный возраст новорожденных составил от 24 до 28 недель. В 1-й и 2-й группах частота переливания ЭСК крови составила 136/164 (82,9%) против 149/216 (68,9%), медиана объема переливания – 29,3 мл/кг (IQR 17,5–51,8 мл/кг) против 19,5 мл/кг (IQR 15,0–29,5 мл/кг), $p < 0,05$. Статистически значимых отличий в частоте БЛД, ВЖК ≥ II степени, ПВЛ, РН ≥ III степени в исследуемых группах не выявлено. Частота НЭК ≥ II степени во 2-й группе была выше в 1,6 раза, чем в 1-й группе. Частота анемии после выписки была ниже в 1-й группе по сравнению со 2-й группой в СВ 1 и 3 месяца (в возрасте 1 месяца – 32/72 (44,4%) против 106/166 (63,8%), $p = 0,026$, в возрасте 3 месяцев – 28/72 (38,9%) против 90/166 (54,2%), $p = 0,042$). Тяжелая анемия после выписки не регистрировалась ни в одной группе. После СВ 6 месяцев жизни разницы в частоте анемии между группами не наблюдалось. Применение рестриктивной стратегии гемотрансфузии не приводит к клинически значимому увеличению частоты РН ≥ III степени, БЛД, ПВЛ, ВЖК ≥ II степени, а также анемии после 6 месяцев жизни. Однако шансы развития НЭК ≥ II степени в группе рестриктивной стратегии были выше в 1,6 раза, чем в либеральной, что требует дополнительного анализа.

Ключевые слова: *рестриктивная стратегия переливания крови, либеральная стратегия переливания крови, недоношенные новорожденные, анемия*

Шарафутдинова Д.Р. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2025; 24 (2): 86–94. DOI: 10.24287/1726-1708-2025-24-2-86-94

© 2025 by «D. Rogachev NMRCPHOI»

Received 27.02.2025
Accepted 21.05.2025

The effect of two red-cell transfusion strategies on outcomes and incidence of anemia after discharge in premature infants with extremely low birth weight

D.R. Sharafutdinova[1, 2], E.N. Balashova[1], A.A. Puchkova[1], A.V. Degtyareva[1, 2], A.R. Kirtbaya[1, 2], R.A. Lutfullina[1], T.K. Tsechoeva[1], A.A. Kozlovskaya[1], O.V. Ionov[1, 2]

[1]The V.I. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology of Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow
[2]The I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of Ministry of Healthcare of the Russian Federation (the Sechenov University), Moscow

Premature newborns with extremely low birth weight are the main category of infants having to undergo one or more red-cell transfusions during the neonatal period in order to treat anemia. Presently, there are two major transfusion strategies: the liberal strategy aimed at maintaining higher hemoglobin levels, and the restrictive one when blood is transfused at lower hemoglobin levels. In our study, we aimed to compare outcomes and the incidence of anemia after discharge during the first 24 months of corrected age in infants with extremely low birth weight who had received red-cell transfusions according to the restrictive or liberal strategy. The study was approved by the Biomedical Research Ethics Committee (minutes No.12 of 17 November 2016) and the Scientific Council (minutes No.19 of 29 November 2016) of the V.I. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology of Ministry of Healthcare of Russia. This was a single-center retrospective cohort study carried out at clinical departments of the Institute of Neonatology and Pediatrics of the V.I. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology of Ministry of Healthcare of Russia. The included infants were divided into 2 groups: group 1 – infants who had received RBC transfusions following the liberal strategy; group 2 – infants in whom the restrictive transfusion strategy had been used. We looked at the incidence of such outcomes as retinopathy of prematurity (ROP) ≥ stage III, necrotizing enterocolitis (NEC) ≥ stage II, bronchopulmonary dysplasia (BPD), intraventricular hemorrhages (IVH) ≥ grade II, periventricular leukomalacia (PVL), anemia after discharge at a corrected age (CA) of 1, 3, 6, 12, 18 and 24 months. The gestational age of the newborns ranged from 24 to 28 weeks. The frequency of red-cell transfusions was 136/164 (82.9%) in group 1 versus 149/216 (68.9%) in group 2, with the median volume of transfusions of 29.3 mL/kg (IQR 17.5–51.8 mL/kg) in group 1 and 19.5 mL/kg (IQR 15.0–29.5 mL/kg) in group 2, $p < 0.05$. There were no significant differences in the incidence of BPD, IVH ≥ grade II, PVL, ROP ≥ stage III between the study groups. The incidence of NEC ≥ stage II was 1.6 times higher in group 2 than in group 1. The incidence of anemia after discharge was lower in group 1 compared to group 2 at a CA of 1 and 3 months (32/72 (44.4%) vs. 106/166 (63.8%), $p = 0.026$ at 1 month, 28/72 (38.9%) vs. 90/166 (54.2%), $p = 0.042$ at 3 months). There were no reports of severe anemia after discharge in either of the groups. After 6 months CA there was no difference in the incidence of anemia between the groups. The use of the restrictive red-cell transfusion strategy did not lead to a clinically significant increase in the incidence of ROP ≥ stage III, BPD, PVL, IVH ≥ grade II or anemia after 6 months of CA. However, the risk of NEC ≥ stage II in the restrictive strategy group was 1.6 times higher than in the liberal one, which requires further analysis.

Key words: *restrictive blood transfusion strategy, liberal blood transfusion strategy, premature newborns, anemia*

Sharafutdinova D.R., et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology 2025; 24 (2): 86–94.
DOI: 10.24287/1726-1708-2025-24-2-86-94

Correspondence:
Diiana R. Sharafutdinova,
Cand. Med. Sci., a senior researcher,
an anesthesiologist-intensivist
at the A.G. Antonov Intensive Care Unit at
the Institute of Neonatology and Pediatrics,
an assistant lecturer at the Department of
Continuing Professional Education
and Simulation Technologies
of the V.I. Kulakov National Medical Research
Center for Obstetrics, Gynecology
and Perinatology of Ministry of Healthcare of
Russia; an associate professor
at the Department of Neonatology
of the N.F. Filatov Clinical Institute
for Children's Health, the I.M. Sechenov First
Moscow State Medical University
of Ministry of Healthcare of Russia
(the Sechenov University)
Address: 2 bldg. 4 Bolshaya Pirogovskaya St.,
Moscow 119435, Russia
E-mail: dikarush@gmail.com

В течение неонатального периода более чем в 80% случаев недоношенным детям с очень низкой и экстремально низкой (ЭНМТ) массой тела при рождении требуется проведение трансфузии донорских эритроцитсодержащих компонентов (ЭСК) крови в связи с развитием анемии [1–3]. Существуют 2 основные стратегии переливания донорских ЭСК крови: либеральная и рестриктивная. Либеральная стратегия направлена на поддержание более высокого уровня гемоглобина, тогда как рестриктивная стратегия является более выжидательной и предполагает проведение трансфузий при более низком уровне гемоглобина.

Несмотря на высокую частоту переливания донорских ЭСК крови недоношенным детям, потенциальные преимущества и/или отрицательное влияние дополнительного переливания крови до конца не изучены. На сегодня проведены и опубликованы результаты крупных рандомизированных контролируемых исследований (РКИ), сравнивающих либеральную и рестриктивную стратегии трансфузий донорских ЭСК крови у детей с ЭНМТ при рождении, анализирующих отдаленные исходы, преимущественно неврологические [1, 4]. Эти исследования не выявили значимых различий в когнитивном развитии детей в скорректированном возрасте (СВ) 22–26 месяцев жизни [1–4]. Тем не менее в проведенных исследованиях есть ряд ограничений. В частности, в них не оценивались частота развития и тяжесть анемии у исследуемых пациентов после выписки.

Цель данного исследования – сравнить неонатальные исходы и частоту развития анемии после выписки в течение 24 месяцев жизни у детей с ЭНМТ при рождении, получавших трансфузии донорских ЭСК крови по либеральной и рестриктивной стратегиям.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На базе клинических отделений Института неонатологии и педиатрии ФГБУ «НМИЦ АГП им. акад. В.И. Кулакова» Минздрава России проведено одноцентровое двойное ретроспективное когортное исследование. Исследование одобрено комиссией по этике биомедицинских исследований (протокол №12 от 17 ноября 2016 г.) и утверждено решением ученого совета (протокол №19 от 29 ноября 2016 г.) ФГБУ «НМИЦ АГП им. акад. В.И. Кулакова» Минздрава России.

Критерии включения: недоношенные новорожденные с ЭНМТ при рождении, наличие информированного согласия, подписанного законными представителями пациентов.

Критерии исключения: врожденные пороки развития, требующие хирургической коррекции в неонатальном периоде, наследственные болезни обмена, внутриутробные гемотрансфузии, тяжелая форма гемолитической болезни новорожденных, синдром анемии-полицитемии при монохориальных беременностях, недоношенные дети, умершие до проведения первой гемотрансфузии.

Выполнен анализ 380 случаев выхаживания недоношенных детей с ЭНМТ, рожденных в период с 2014 по 2023 г. в ФГБУ «НМИЦ АГП им. акад. В.И. Кулакова» Минздрава России.

С учетом исторически сложившихся периодов, связанных с изменениями показаний к проведению трансфузий донорских ЭСК крови в НМИЦ АГП им. акад. В.И. Кулакова, выделено 2 группы детей:

• 1-я группа – недоношенные дети с ЭНМТ, которым проводились трансфузии донорских ЭСК крови по либеральной стратегии – до апреля 2018 г.;

• 2-я группа – недоношенные дети с ЭНМТ, которым проводились трансфузии донорских ЭСК крови по рестриктивной стратегии – с апреля 2018 г.

На 1-м этапе проводилась оценка неонатальных исходов при выписке из стационара, на 2-м этапе – оценка частоты и тяжести анемии после выписки.

Конечными точками были следующие: оценка частоты развития таких исходов, как ретинопатия недоношенных (РН) ≥ III степени, некротизирующий энтероколит (НЭК) ≥ II степени, бронхолегочная дисплазия (БЛД), внутрижелудочковые кровоизлияния (ВЖК) ≥ II степени, постгеморрагическая гидроцефалия, перивентрикулярная лейкомаляция (ПВЛ); анемия после выписки и в СВ 1, 3, 6, 12, 18, 24 месяца жизни.

На различных этапах из исследования выбыли 142 ребенка. Причиной исключения явились летальный исход до выписки из стационара (*n* = 23), отсутствие данных о наблюдении и результатах обследований детей после выписки (*n* = 119).

Формирование выборки новорожденных детей, включенных в исследование, представлено на *рисунке 1*.

Критериями диагностики ранней анемии недоношенных являлось снижение уровня гемоглобина и/или гематокрита (Ht) более чем на 2 стандартных отклонения от средних значений этих показателей для данного постнатального возраста [5]. После выписки из стационара и до СВ 6 месяцев критерием анемии являлось снижение гемоглобина менее 100 г/л, после 6 месяцев до 2 лет – менее 110 г/л. [6, 7]. Анемия тяжелой степени диагностировалась при гемоглобине < 70 г/л [8, 9].

Показания для проведения трансфузии донорских эритроцитсодержащих компонентов крови

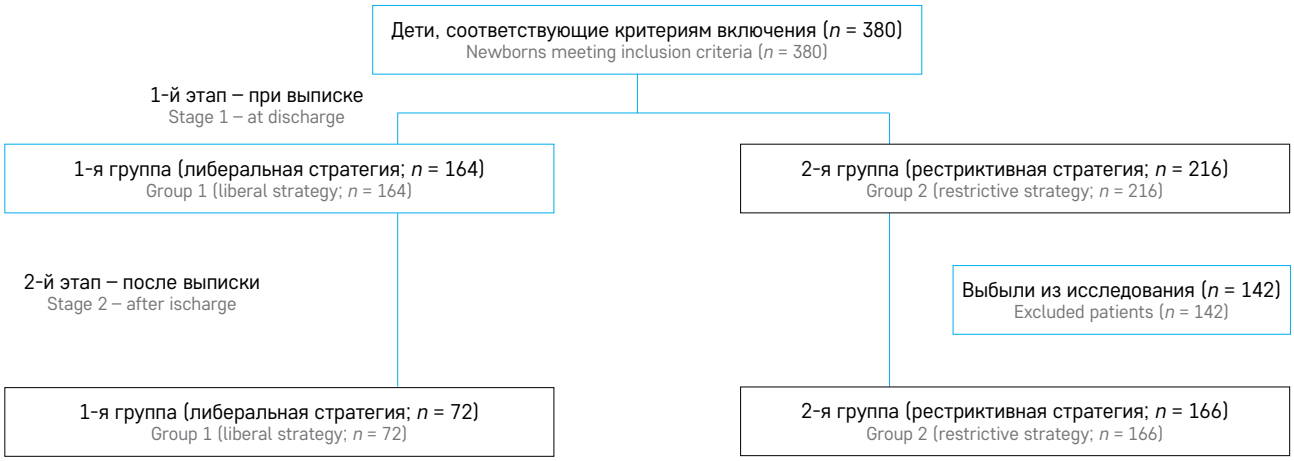
Проведение трансфузий по либеральной стратегии не имеют четких критериев, они отличаются во многих учреждениях. До апреля 2018 г. в клинических отделениях Института неонатологии и педиатрии НМИЦ АГП им. акад. В.И. Кулакова трансфузии донорских ЭСК крови проводились согласно внутреннему протоколу отделения реанимации и интенсивной терапии новорожденных: при потребности в искусственной вентиляции легких (ИВЛ) с уровнем среднего давления в дыхательных путях (mean airway pressure, MAP) > 8 см H_2O, концентрацией подаваемого кислорода (FiO_2) > 0,4 и уровнем Ht венозной крови ≤ 35%; ИВЛ с MAP < 8 см H_2O или неинвазивной вентиляции легких и FiO_2 ≤ 0,4 и значениях венозного Ht ≤ 30%; при венозном Ht ≤ 25% и отсутствии потребности в ИВЛ, но сохраняющейся зависимости в кислороде или потребности в неинвазивной респираторной терапии в возрасте старше 28 суток жизни плюс один или несколько из следующих симптомов: сохраняющейся > 24 ч тахикардии (частота сердечных сокращений > 180 уд/мин) или тахипноэ (частота дыхательных движений > 80/мин); повышении потребности в дополнительном кислороде ≥ 10%; прибавке массы тела < 10 г/кг/сут в течение 4 дней, несмотря на калорийность питания > 100 ккал/кг/сут; учащении эпизодов апноэ; повышении лактата > 2,5 ммоль/л. Значения венозного Ht ≤ 20% являлось абсолютным показанием для проведения гемотрансфузии.

С апреля 2018 г. в клинических отделениях Института неонатологии и педиатрии трансфузии донорских ЭСК крови начали проводить согласно рестриктивной стратегии [5].

Учитывая, что дети получали лечение в клинических отделениях одного учреждения, тактика

Рисунок 1
Формирование выборки новорожденных детей, включенных в исследование

Figure 1
A flowchart of patient enrollment



проводимой терапии между исследуемыми группами не отличалась. Всем новорожденным при отсутствии противопоказаний проводилось сцеживание или отсроченное пережатие пуповины в родильном блоке по схожей методике. Все дети получали препараты рекомбинантного человеческого эритропоэтина эпоэтина альфа согласно инструкции в целях профилактики и лечения анемии у недоношенных новорожденных по схеме после 3-го дня жизни в дозе 200 МЕ/кг 3 раза/нед подкожно или внутривенно в течение первых 3–4 недель жизни. Длительность терапии рекомбинантным человеческим эритропоэтином во всех группах не отличалась. В течение периода госпитализации все дети получали препараты трехвалентного железа перорально в дозе 4–6 мг/кг/сут с момента достижения объема энтерального питания 100 мл/кг/сут. После выписки из стационара продолжалась терапия препаратами трехвалентного железа при наличии показаний под контролем уровней гемоглобина, эритроцитов и ферритина в крови. В случае снижения уровня ферритина в крови менее 35 мкг/л дозу препаратов железа увеличивали до 3–4 (максимум до 6) мг/кг/сут на ограниченный период. При повышении уровня ферритина в крови более 300 мкг/л терапию препаратами железа прекращали до снижения данного показателя до уровня ниже 300 мкг/л [10].

Проанализированы масса-ростовые параметры при рождении, гестационный возраст (ГВ), оценка по шкале Апгар на 1-й и 5-й минутах жизни, пол, частота антенатальной профилактики респираторного дистресс-синдрома, отсроченного пережатия/сцеживания пуповины, врожденной анемии, полицитемии; возраст проведения первой трансфузии донорских ЭСК крови, частота и общий объем трансфузий донорских ЭСК крови, длительность терапии препаратами железа после выписки, вид вскармливания в течение периода госпитализации и после выписки, сроки введения прикорма в исследуемых группах. При проведении смешанного или искусственного вскармливания выбор смеси формировался на основе оценки антропометрических показателей, нутритивного статуса детей.

Диагноз РН устанавливался согласно международной классификации, БЛД – согласно критериям A.H. Jobe и E. Bancalari в СВ 36 недель [11], НЭК – по клинико-лабораторным и инструментальным критериям по Bell, ВЖК – согласно классификации, предложенной Российской ассоциацией специалистов перинатальной медицины.

Статистический анализ

Статистическая обработка данных выполнена с помощью электронных таблиц Microsoft Excel и программы SPSS v.17.0. Перед проведением сравнительного анализа количественных данных в исследуемых группах проверяли соответствие нормальному распределению (тест Колмогорова–Смирнова, графический анализ данных). Учитывая отсутствие нормального распределения данных, для количественных параметров определены медиана (Me), значения 25-го и 75-го квартилей (IQR), для качественных данных – показатели частоты (%); для сравнения данных в группах применяли тест Манна–Уитни. Значимость различий между исходами проводилась с помощью критерия χ^2 и критерия Фишера. Статистически значимыми считались различия при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

ГВ детей составил от 24 до 28 недель. Анализируемые данные пациентов представлены в *таблице 1*.

Исследуемые группы статистически значимо не различались по ГВ, массе, длине тела при рождении, оценке по шкале Апгар на 1-й и 5-й минутах жизни (*таблица 1*). Частота врожденной анемии, полицитемии между группами не отличалась. Проведения частичной обменной трансфузии ни в одной группе не потребовалось.

Между исследуемыми группами выявлены статистически значимые отличия в возрасте проведения 1-й трансфузии, частоте, общем объеме и количестве трансфузий донорских ЭСК крови в течение периода госпитализации и уровне гемоглобина при выписке (*таблица 2*). В группе либеральной стратегии трансфузии донорских ЭСК крови потребовали 136/164 (82,9%) детей против 149/216 (68,9%) в группе рестриктивной стратегии, отношение шансов = 2,2 (95% доверительный интервал 1,3–3,6); Me объема переливания составила 29,3 мл/кг (IQR 17,5–51,8 мл/кг) против 19,5 мл/кг (IQR 15,0–29,5 мл/кг) соответственно. Таким образом, возраст проведения 1-й трансфузии был более ранним в 1-й группе детей, общие количество и объем трансфузий за период госпитализации были больше в 1-й группе по сравнению со 2-й. Уровень гемоглобина при выписке был ниже во 2-й группе по сравнению с 1-й (*таблица 2*).

Проведен сравнительный анализ таких исходов и осложнений, как БЛД, РН, ПВЛ, ВЖК, постгеморрагическая гидроцефалия, НЭК у исследуемых групп детей при выписке из стационара (*рисунок 2*).

Статистически значимых отличий в частоте БЛД, в том числе тяжелой формы, ПВЛ, ВЖК ≥ II степени в исследуемых группах не выявлено. Частота НЭК ≥ II степени во 2-й группе по сравнению с 1-й группой была выше, отношение шансов = 1,6 (95% доверительный интервал 1,1–2,6), $p = 0,034$.

Сравнительный анализ частоты развития и тяжести анемии после выписки в исследуемых группах пациентов представлен в *таблице 3*.

Сравнительный анализ показал, что частота анемии после выписки была выше во 2-й группе по сравнению с 1-й в СВ 1 и 3 месяца (*таблица 3*). Все случаи анемии были железодефицитные. Тяжелой анемии после выписки не наблюдалась ни в одной группе.

Уровень сывороточного ферритина у детей в течение 6 месяцев жизни представлен в *таблице 4*.

Как видно из данных, представленных в *таблице 4*, Me уровня ферритина в обеих группах соответствовала возрастной норме. У части детей отмечалось снижение уровня ферритина в крови менее рекомендуемых значений, в связи с чем увеличивали дозу препаратов железа до 3–4 мг/кг/сут (максимум до 6 мг/кг/сут) на ограниченный период с последующим контролем. Более длительная продолжительность терапии препаратами железа после выписки отмечалась во 2-й группе по сравнению с 1-й (Me (IQR) 4 (3–5,5) месяца и 3 (2–4) месяца соответственно, $p = 0{,}002$).

Вид вскармливания в течение периода госпитализации и после выписки, сроки введения прикорма в исследуемых группах представлены в *таблице 5*.

Как видно из данных, представленных в *таблице 5*, в течение периода госпитализации частота исключительно грудного вскармливания во 2-й группе была выше, чем в 1-й, значения *p* приближены к статистически значимым. Большинство детей как на этапе госпитализации, так и после выписки получали смешанное вскармливание. Не выявлено отличий между группами по срокам введения прикорма.

Таблица 1
Данные пациентов, включенных в исследование
Table 1
Data of the enrolled patients

Параметр Parameter	**1-я группа (либеральная стратегия; *n* = 164)** Group 1 (liberal strategy; *n* = 164)	**2-я группа (рестриктивная стратегия; *n* = 216)** Group 2 (restrictive strategy; *n* = 216)	***p***
Антенатальная профилактика респираторного дистресс-синдрома, *n* (%) Antenatal prevention of respiratory distress syndrome, *n* (%)	111 (67,7)	166 (76,8)	0,118
Отсроченное пережатие/сцеживание пуповины, *n* (%) Delayed umbilical cord clamping/milking, *n* (%)	1431 (79,8)	175 (81,0)	0,332
ГВ, Me (IQR), недели GA, Me (IQR), weeks	26,0 (25,0–28,0)	25,5 (24,2–27,5)	0,997
Масса при рождении, Me (IQR), г Birth weight, Me (IQR), g	625 (480–900)	620 (493–714)	0,975
Длина тела при рождении, Me (IQR), см Birth length, Me (IQR), cm	31 (28–33)	30 (28–33)	0,593
Шкала Апгар, 1-я минута, Me (IQR), баллы Apgar score at 1 minute, Me (IQR)	4 (2–5)	3 (1–5)	0,110
Шкала Апгар, 5-я минута, Me (IQR), баллы Apgar score at 5 minutes, Me (IQR)	6 (5–7)	5 (4–7)	0,069
Мужской пол, *n* (%) Male, *n* (%)	88 (53,6)	133 (61,6)	0,128
Врожденная анемия, *n* (%) Congenital anemia, *n* (%)	6 (3,6)	8 (3,7)	0,209
Полицитемия, *n* (%) Polycythemia, *n* (%)	5 (3,0)	5 (2,3)	0,111

Notes. GA – gestational age.

Таблица 2
Оценка возраста, общего объема и частоты трансфузий донорских ЭСК в исследуемых группах
Table 2
An analysis of age, total volume and frequency of donor red-cell transfusions in the study groups

Параметр Parameter	**1-я группа (либеральная стратегия; *n* = 164)** Group 1 (liberal strategy; *n* = 164)	**2-я группа (рестриктивная стратегия; *n* = 216)** Group 2 (restrictive strategy; *n* = 216)	***p***
Дети, потребовавшие проведения трансфузии донорских ЭСК крови, *n* (%) Patients in need of a donor red-cell transfusion, *n* (%)	136 (82,9)	149 (68,9)	0,024*
Возраст 1-й трансфузии донорских ЭСК крови, Me (IQR), сутки жизни Age of the 1st donor red-cell transfusion, Me (IQR), days of life	7 (3–13)	10 (6–21)	0,041*
Количество трансфузий донорских ЭСК крови в течение госпитализации, Me (IQR) The number of donor red-cell transfusions during the hospital stay, Me (IQR)	3 (2–5)	2 (1–4)	0,037*
Общий объем трансфузий донорских ЭСК крови за период госпитализации на 1 ребенка, Me (IQR), мл/кг The total volume of donor red-cell transfusions during the hospital stay per 1 infant, Me (IQR), mL/kg	29,3 (17,5–51,8)	19,5 (15,0–29,5)	0,035*
Гемоглобин при выписке, Me (IQR), г/л Hemoglobin levels at discharge, Me (IQR), g/L	109 (100–129)	95 (88–113)	0,006*

*Примечание. * – различия показателей статистически значимы (p < 0,05).*
*Notes. * – the differences are statistically significant (p < 0.05).*

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

В проведенном исследовании выявлено, что частота развития анемии на момент выписки из стационара, а также после (в СВ 1 и 3 месяца жизни) выше в группе детей, которым проводились трансфузии донорских ЭСК крови по рестриктивной стратегии в отличие от либеральной. Случаев тяжелой анемии после выписки ни в одной группе не обнаружено. После СВ 6 месяцев частота анемии значительно снижалась в обеих группах, что, с высокой

Рисунок 2
Сравнительный анализ частоты БЛД, РН, ПВЛ, ВЖК, постгеморрагической гидроцефалии, НЭК у пациентов при разных стратегиях трансфузии донорских ЭСК крови (%)

Figure 2
A comparative analysis of the incidence of BPD, ROP, PVL, IVH, posthemorrhagic hydrocephalus, NEC in the patients in different strategies of red-cell transfusion (%)
ROP – retinopathy of prematurity; NEC – necrotizing enterocolitis; PVL – periventricular leukomalacia; BPD – bronchopulmonary dysplasia; IVH – intraventricular hemorrhage

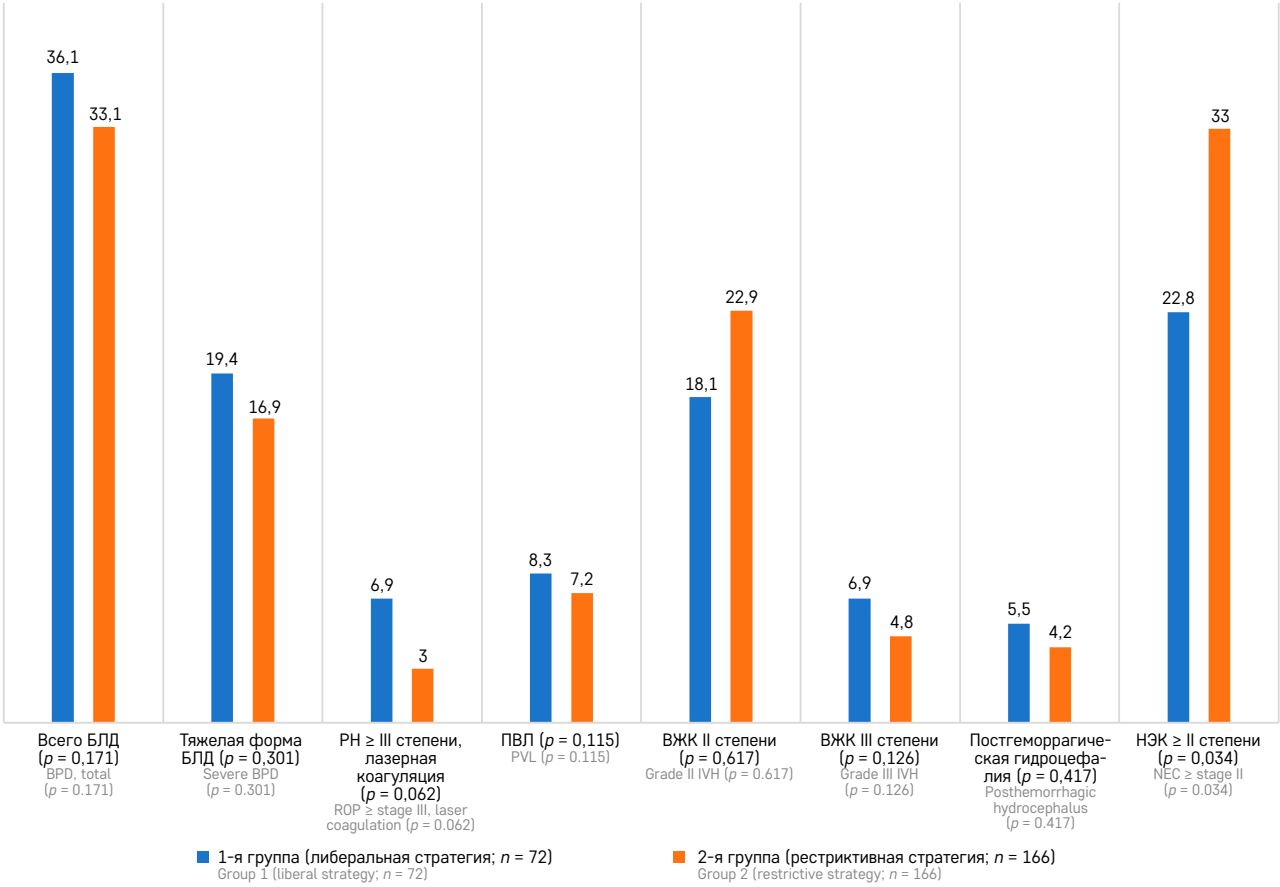


Таблица 3
Сравнительный анализ частоты развития анемии после выписки в исследуемых группах

Table 3
A comparative analysis of incidence of anemia after discharge in the study groups

Параметр Parameter	1-я группа (либеральная стратегия; *n* = 164) Group 1 (liberal strategy; *n* = 164)	2-я группа (рестриктивная стратегия; *n* = 216) Group 2 (restrictive strategy; *n* = 216)	Отношение шансов (95% доверительный интервал) Odds ratio (95% confidence Interval)	*p*
Частота анемии в СВ 1 месяц, *n* (%) Anemia incidence at a CA of 1 month, *n* (%)	32 (44,4)	106 (63,8)	2,2 (1,3–3,9)	0,026*
Частота анемии в СВ 3 месяца, *n* (%) Anemia incidence at a CA of 3 months, *n* (%)	28 (38,9)	90 (54,2)	1,8 (1,1–3,3)	0,042*
Частота анемии в СВ 6 месяцев, *n* (%) Anemia incidence at a CA of 6 months, *n* (%)	18 (25,0)	27 (16,3)	0,6 (0,3–1,1)	0,149
Частота анемии в СВ 12 месяцев, *n* (%) Anemia incidence at a CA of 12 months, *n* (%)	1 (1,4)	0	–	–
Частота анемии в СВ 18 месяцев, *n* (%) Anemia incidence at a CA of 18 months, *n* (%)	1 (1,4)	0	–	–
Частота анемии в СВ 24 месяца, *n* (%) Anemia incidence at a CA of 24 months, *n* (%)	1 (1,4)	0	–	–

*Примечание. * – различия показателей статистически значимы (p < 0,05).*
*Notes. CA – corrected age. * – the differences are statistically significant (p < 0.05).*

Таблица 4
Уровень ферритина в сыворотке крови у детей в исследуемых группах в течение 6 месяцев жизни
Table 4
Serum ferritin levels in the study groups within 6 months of corrected age

Параметр Parameter	**1-я группа (либеральная стратегия; *n* = 72)** Group 1 (liberal strategy; *n* = 72)	**2-я группа (рестриктивная стратегия; *n* = 166)** Group 2 (restrictive strategy; *n* = 166)	***p***
Уровень ферритина в сыворотке крови, 1 месяц, Me (IQR), мкг/л Serum ferritin levels, 1 month of CA, Me (IQR), μg/L	62 (40–82)	51 (38–57)	0,126
Уровень ферритина в сыворотке крови, 3 месяца, Me (IQR), мкг/л Serum ferritin levels, 3 months of CA, Me (IQR), μg/L	32 (20,5–55,5)	25 (21–28,5)	0,287
Уровень ферритина в сыворотке крови, 6 месяцев, Me (IQR), мкг/л Serum ferritin levels, 6 months of CA, Me (IQR), μg/L	16 (12–25)	17,5 (12–23)	0,188

Таблица 5
Вид вскармливания в течение периода госпитализации и после выписки, сроки введения прикорма в исследуемых группах
Table 5
Type of feeding during the hospital stay and after discharge and timing of weaning in the study groups

Вид вскармливания Type of feeding	**1-я группа (либеральная стратегия)** Group 1(liberal strategy)	**2-я группа (рестриктивная стратегия)** Group 2 (restrictive strategy)	***p***
В течение периода госпитализации During the hospital stay	**(*n* = 164)**	**(*n* = 216)**	
Исключительно грудное вскармливание, *n* (%) Exclusive breastfeeding, *n* (%)	49 (29,9)	75 (34,7)	0,071
Смешанное вскармливание, *n* (%) Mixed feeding, *n* (%)	89 (54,3)	100 (46,3)	0,473
Искусственное вскармливание, *n* (%) Formula feeding, *n* (%)	26 (15,8)	41 (19)	0,362
После выписки After discharge	**(*n* = 72)**	**(*n* = 166)**	
Грудное вскармливание, *n* (%) Exclusive breastfeeding, *n* (%)	12 (16,7)	46 (27,7)	0,085
Смешанное вскармливание, *n* (%) Mixed feeding, *n* (%)	41 (56,9)	77 (46,4)	0,369
Искусственное вскармливание, *n* (%) Formula feeding, *n* (%)	19 (26,4)	43 (25,9)	0,819
Введение прикорма, Me (IQR), месяцы Age at weaning, Me (IQR), months	6,5 (5,5–7)	6 (5–7)	0,253

вероятностью, связано с рационально проводимой антианемической терапией, своевременным введением прикорма.

Известно, что длительные эпизоды гипоксемии у детей с очень низкой массой тела связаны с неблагоприятными долгосрочными исходами [12]. Доказывая свою позицию, сторонники либеральной стратегии трансфузий главным образом основываются на этом аргументе. В то же время в ряде исследований приводятся данные о том, что трансфузии донорских ЭСК крови ассоциированы с такими неблагоприятными исходами и осложнениями, как летальный исход [13], РН [14, 15], БЛД [16, 17], ВЖК [18, 19], НЭК [20].

В соответствии с наиболее крупными исследованиями: The Premature Infants in Need of Transfusion (PINT) [21], Effects of Liberal vs Restrictive Transfusion Thresholds on Survival and Neurocognitive Outcomes (ETTNO) и Transfusion of Prematures (TOP) (NCT01702805) [4] неонатальные исходы между группами недоношенных детей, получавших трансфузии по либеральной и рестриктивной стратегиям, существенно не отличались. В настоящей работе мы также сравнивали частоту БЛД, РН ≥ II степени, ПВЛ, ВЖК ≥ II степени, НЭК ≥ III степени у недоношенных детей с ЭНМТ в группах либеральных и рестриктивных стратегий переливания донорских ЭСК крови. Повышения частоты анализируемых неонатальных исходов в группе рестриктивной стратегии за исключением НЭК ≥ III степени не обнаружено. Патогенез НЭК является мультифакторным и для установления причин увеличения его частоты во 2-й группе требуется дополнительный анализ, что не являлось непосредственной целью данного исследования. Полученные результаты позволяют утверждать об отсутствии прямой причинно-следственной ассоциации между проведением гемотрансфузий и развитием описанных осложнений и исходов у недоношенных новорожденных, по крайней мере, в рамках 2 сравниваемых стратегий трансфузий. Высокая частота анемии и потребность в проведении гемотрансфузии с высокой вероятностью отражают тяжесть состояния крайне недоношенных детей. Важным является тот факт, что использование более низких пороговых значений для переливания крови сокращает количество трансфузий.

В большинстве РКИ, посвященных сравнению 2 стратегий трансфузии, конечными точками являются оценки неврологических исходов. Сведения о частоте анемии у детей после выписки в вышеописанных РКИ отсутствуют. Поэтому мы не можем сопоставить полученные нами результаты. Частота анемии после выписки была относительно невысокой. В СВ 1 месяц она встречалась у 32/72 (44,4) детей в группе либеральной тактики против 106/166 (63,8) – в группе рестриктивной, p = 0,026, в СВ 3 месяца – у 28 (38,9) в группе либеральной стратегии против 90 (54,2) – в группе рестриктивной, p = 0,042, после СВ 6 месяцев она значительно снижалась, и отличий между группами до СВ 24 месяца жизни не наблюдалось.

Многократные гемотрансфузии могут сопровождаться увеличением уровня ферритина в сыворотке крови и приводить к перегрузке железом. По результатам нашего исследования уровень сывороточного ферритина у детей в течение 6 месяцев жизни между группами не отличался. Тем не менее отмечалось более высокое содержание ферритина в 1-й группе в первые 3 месяца СВ. Также интересен и тот факт, что в группе либеральной стратегии повышения уровня ферритина в крови более 300 мкг/л и признаков перегрузки железом не встречалось. Длительность терапии препаратами железа после выписки была достоверно продолжительнее во 2-й группе по сравнению с 1-й. Это может быть связано, с одной стороны, с повторным использованием организмом железа, полученного при разрушении перелитых эритроцитов в 1-й группе, и тем, что во 2-й группе частота исключительно грудного вскармливания как на этапе госпитализации, так и после выписки была выше. Согласно рекомендациям, детям, находящимся на грудном вскармливании и не получающим обогатитель грудного молока, необходимо получать дотацию препаратами трехвалентного железа до 6 месяцев или до введения прикорма или смесей, обогащенных железом, что соответствует нашим данным. В то время как дети, получающие специализированную смесь для недоношенного ребенка или обогатитель грудного молока и имеющие нормальный уровень железа и ферритина в крови, не нуждаются в дополнительной дотации препаратов трехвалентного железа.

Исходя из полученных нами результатов, а также данных РКИ, можно сделать вывод о том, что рестриктивные стратегии трансфузии донорских ЭСК крови столь же безопасны, как и либеральные. Безусловно, РКИ выполняют важную задачу в доказательной медицине, тем не менее следует обратить внимание на следующие моменты. При детальном изучении данных РКИ выявляется, что зачастую они проводятся среди достаточно разнородной когорты пациентов, а выводы не всегда корректно толкуются. Поверхностно ознакомившись с рекомендациями по рестриктивной стратегии трансфузий, легко предположить следующее: рестриктивная практика применима ко всем недоношенным детям, она не повышает риски неблагоприятных исходов по сравнению с более либеральными стратегиями и, следовательно, от либеральной практики следует воздерживаться, когда есть какие-либо сомнения в ее пользе. Эти предположения можно рассматривать как логичные выводы, за исключением случаев, когда тщательный анализ имеющихся данных исследований диктует иное. Коррекцию анемического синдрома у пациента необходимо проводить с учетом комплексной оценки клинической картины и данных дополнительных лабораторно-инструментальных исследований. В частности, в случаях крупных хирургических вмешательств, необходимости проведения экстракорпоральной мембранной оксигенации, кардиореспираторных заболеваний (пороки сердца, БЛД, шок), сепсиса, кровотечений или симптомов, присущих анемии (тахикардия, тахипноэ) не рекомендуется применять рестриктивные стратегии трансфузий. В этих случаях оптимальный критерий для проведения трансфузии в настоящее время остается малоизученным. Решение о трансфузии донорских ЭСК крови должно иметь персонализированный подход, оценивая как пользу, так и риски.

Ограничения исследования

Наше исследование имеет ряд ограничений. Во-первых, оно является одноцентровым, что обусловлено различиями применяемых технологий при выхаживании глубоко недоношенных детей в медицинских учреждениях нашей страны, в частности отличиями в пороговых значениях гемоглобина при гемотрансфузиях донорских ЭСК крови до утверждения клинических рекомендаций по анемиям у недоношенных детей. Во-вторых, исследование было ретроспективным, отсутствует рандомизация пациентов, так как проводился сравнительный анализ с учетом исторически сложившейся тактики. Также в связи с ретроспективным анализом проведенного исследования недостатком его являлось отсутствие таких дополнительных лабораторных данных у детей, как уровень ретикулоцитов, содержание гемоглобина в них. Тем не менее настоящая работа дополняет существующие данные о неонатальных исходах и является единственной, где представлены сведения о частоте развития анемии после выписки из стационара у недоношенных детей с ЭНМТ, которым проводились трансфузии по рестриктивной и либеральной стратегиям.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты проведенного анализа демонстрируют, что применение рестриктивной стратегии гемотрансфузии не приводит к клинически значимому увеличению частоты таких исходов, как РН ≥ III степени, БЛД, ПВЛ, ВЖК ≥ II степени, а также анемии после 6 месяцев жизни в изучаемой группе недоношенных детей с ЭНМТ. Частота НЭК ≥ II степени в группе рестриктивной стратегии была выше, что требует дополнительного анализа.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ
Не указан.

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

ORCID
Sharafutdinova D.R. ORCID: https://orcid.org/0000-0001-9626-5481
Balashova E.N. ORCID: https://orcid.org/0000-0002-3741-0770
Puchkova A.A. ORCID: https://orcid.org/0000-0001-6897-247X
Degtyareva A.V. ORCID: https://orcid.org/0000-0003-0822-751X
Kirtbaya A.R. ORCID: https://orcid.org/0000-0002-7628-8157
Lutfullina R.A. ORCID: https://orcid.org/0009-0003-7186-1182
Tsechoeva T.K. ORCID: https://orcid.org/0000-0001-5985-3540
Kozlovskaya A.A. ORCID: https://orcid.org/0009-0001-2541-3667
Ionov O.V. ORCID: https://orcid.org/0000-0002-4153-133X

Литература / References

1. Franz A.R., Engel C., Bassler D., Rüdiger M., Thome U.H., Maier R.F., et al. ETTNO Investigators. Effects of liberal vs restrictive transfusion thresholds on survival and neurocognitive outcomes in extremely low-birth-weight infants: the ETTNO randomized clinical trial. JAMA 2020; 324 (6): 560–70.
2. Colombatti R., Sainati L., Trevisanuto D. Anemia and transfusion in the neonate. Semin Fetal Neonatal Med 2016; 21 (1): 2–9.
3. Holzapfel L.F., Rysavy M.A., Bell E.F. Red blood cell transfusion thresholds for anemia of prematurity. Neoreviews 2023; 24 (6): 370–6.
4. Kirpalani H., Bell E.F., Hintz S.R. Eunice Kennedy Shriver NICHD Neonatal Research Network. Higher or lower hemoglobin transfusion thresholds for preterm infants. N Engl J Med 2020; 383 (27): 2639–51.
5. Балашова Е.Н., Шарафутдинова Д.Р., Нароган М.В., Пучкова А.А., Дегтярева А.В., Сапун О.И. и др. Ранняя анемия недоношенных (клинические рекомендации). Неонатология: новости, мнения, обучение. 2021; 9 (3): 47–61. [Balashova E.N., Sharafutdinova D.R., Narogan M.V., Puchkova A.A., Degtyareva A.V., Sapun O.I., et al. Early anemia of premature infants (clinical recommendations). Neonatology: news, opinions, education. 2021; 9 (3): 47–61. (In Russ.)].
6. Dallman P.R. Anemia of prematurity. Annu Rev Med 1981; 32: 143–60.
7. Girelli G., Antoncecchi S., Casadei A.M., Del Vecchio A., Isernia P., Motta M., et al. Recommendations for transfusion therapy in neonatology. Blood Transfus 2015; 13 (3): 484–97.
8. Железодефицитная анемия у детей и подростков. Клинические рекомендации. [Электронный ресурс] URL: https://nodgo.org/sites/default/files/ЖДА%20%28альтернативная%20версия%29.pdf. (дата обращения 03.06.2025) [Iron deficiency anemia in children and adolescents. Clinical guidelines. [Electronic resource] URL: https://nodgo.org/sites/default/files/ЖДА%20%28альтернативная%20версия%29.pdf. (accessed 03.06.2025) (In Russ.)].
9. World Health Organization: Haemoglobin concentrations for the diagnosis of anaemia and assessment of severity. Vitamin and Mineral Nutrition Information System. Geneva: World Health Organization; 2011. [Electronic resource] URL: https://www.who.int/vmnis/indicators/haemoglobin.pdf. Accessed 29 Mar 2015.
10. Domellöf M. Meeting the iron needs of low and very low birth weight infants. Ann Nutr Metab 2017; 71 (3): 16–23.
11. Jobe A.H., Bancalari E. Bronchopulmonary dysplasia. Am J Respir Crit Care Med 2001; 163 (7): 1723–9.
12. Poets C.F., Roberts R.S., Schmidt B. Canadian Oxygen Trial Investigators. Association between intermittent hypoxemia or bradycardia and late death or disability in extremely preterm infants. JAMA 2015; 314 (6): 595–603.
13. Dos Santos A.M., Guinsburg R., de Almeida M.F., Procianoy R.S., Rodrigues Leone C., Martins Marba S.T., et al; Brazilian Network on Neonatal Research. Red blood cell transfusions are independently associated with intra-hospital mortality in very low birth weight preterm infants. J Pediatr 2011; 159 (3): 371–6.
14. Slidsborg C., Jensen A., Forman J.L., Rasmussen S., Bangsgaard R., Callø Fledelius H., et al. Neonatal risk factors for treatment-demanding retinopathy of prematurity: a Danish national study. Ophthalmology 2016; 123 (4): 796–803.
15. Inder T.E., Clemett R.S., Austin N.C., Graham P., Darlow B.A. High iron status in very low birth weight infants is associated with an increased risk of retinopathy of prematurity. J Pediatr 1997; 131 (4): 541–4.
16. Valieva O.A., Strandjord T.P., Mayock D.E., Juul S.E. Effects of transfusions in extremely low birth weight infants: a retrospective study. J Pediatr 2009; 155 (3): 331–7.
17. Ghirardello S., Dusi E., Cortinovis I., Villa S., Fumagalli M., Agosti M., et al. Effects of red blood cell transfusions on the risk of developing complications or death: an observational study of a cohort of very low birth weight infants. Am J Perinatol 2017; 34 (1): 88–95.
18. Christensen R.D., Baer V.L., Del Vecchio A., Henry E. Unique risks of red blood cell transfusions in very-low-birth-weight neonates: associations between early transfusion and intraventricular hemorrhage and between late transfusion and necrotizing enterocolitis. J Matern Fetal Neonatal Med 2013; 26 (2): 60–3.
19. Baer V.L., Lambert D.K., Henry E., Snow G.L., Butler A., Christensen R.D. Among very-low-birth-weight neonates is red blood cell transfusion an independent risk factor for subsequently developing a severe intraventricular hemorrhage? Transfusion 2011; 51 (6): 1170–8.
20. Mohamed A., Shah P.S. Transfusion associated necrotizing enterocolitis: a meta-analysis of observational data. Pediatrics 2012; 129 (3): 529–40.
21. Whyte R.K., Kirpalani H., Asztalos E.V., Andersen C., Blajchman M., Heddle N., et al; PINTOS Study Group. Neurodevelopmental outcome of extremely low birth weight infants randomly assigned to restrictive or liberal hemoglobin thresholds for blood transfusion. Pediatrics 2009; 123 (1): 207–13.

DOI: 10.24287/1726-1708-2025-24-2-96-103

© 2025 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России

Поступила 15.08.2024
Принята к печати 03.02.2025

EDN: OXXNJI

Морфология чистой популяции гематогонов, изолированной из нормального и обогащенного гематогонами костного мозга

А.О. Закирова[1, 2], М.В. Кормилицина[3], О.С. Федянина[1, 2], А.Н. Хвастунова[1, 2], А.В. Филатов[4], С.А. Кузнецова[1, 2]

[1]ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, Москва
[2]ФГБУН «Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии» РАН, Москва
[3]ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)», Московская область, Долгопрудный
[4]ФГБУ «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства, Москва

Контактная информация:
Кузнецова Софья Алексеевна, канд. физ.-мат. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории биофизики ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России
Адрес: 117997, Москва, ул. Саморы Машела, 1
E-mail: kuznetsova.sonya@gmail.com

В-клеточные предшественники (гематогоны) составляют менее 5% нормальных ядросодержащих клеток костного мозга (КМ), но при некоторых клинических состояниях их процентное содержание может увеличиваться. Морфология гематогонов была охарактеризована у пациентов с их повышенным количеством. Однако малочисленность гематогонов и невозможность получения их чистой популяции затрудняют детальный морфологический анализ этих клеток в нормальном КМ. У 14 пациентов с повышенным содержанием гематогонов и 12 здоровых доноров с помощью биочипов с иммобилизованными антителами к антигенам кластеров дифференцировки (CD) была выделена чистая популяция гематогонов как $CD10^+$-фракция мононуклеарных клеток КМ. Были описаны основные морфологические подтипы гематогонов здорового КМ и проанализирована доля этих клеток среди $CD19^+$-, $CD22^+$-, $CD20^+$- и $CD10^+CD34^+$-мононуклеаров КМ. От 1 до 9% гематогонов имеют диаметр 13–17 мкм, базофильную цитоплазму, кружевную или мелкосетчатую бластную структуру хроматина и ярко выраженные ядрышки. Остальные гематогоны представляют собой незрелые лимфоидные клетки с широким распределением по размерам (7–15 мкм в диаметре), скудной цитоплазмой, «смазанным» хроматином и отсутствием ядрышек. От 3 до 25% клеток в последней категории имеют размер более 10 мкм. Клетки $CD10^+CD34^+$ не имеют преимущественно бластной морфологии, в то время как некоторые бластоподобные гематогоны экспрессируют CD20. Гематогоны в нормальном КМ неоднородны по морфологии и размеру. Явной корреляции между морфологией гематогонов и их иммунологической стадией созревания обнаружено не было. Исследование одобрено независимым этическим комитетом и утверждено решением ученого совета ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России. Было получено согласие доноров и пациентов на забор КМ и будущие биомедицинские исследования.
Ключевые слова: *гематогоны, нормальные В-клеточные предшественники, клеточный биочип, CD-антигены, морфология, иммуноцитохимия*

Закирова А.О. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2025; 24 (2): 96–103. DOI: 10.24287/1726-1708-2025-24-2-96-103

© 2025 by «D. Rogachev NMRCPHOI»

Received 15.08.2024
Accepted 03.02.2025

Morphology of a pure hematogone population isolated from normal and hematogone-rich bone marrow

A.O. Zakirova[1, 2], M.V. Kormilitsina[3], O.S. Fedyanina[1, 2], A.N. Khvastunova[1, 2], A.V. Filatov[4], S.A. Kuznetsova[1, 2]

[1]The Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology of Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow
[2]Center for Theoretical Problems of Physical and Chemical Pharmacology, Russian Academy of Sciences, Moscow
[3]Moscow Institute of Physics and Technology (National Research University), Moscow Region, Dolgoprudny
[4]National Research Center "Institute of Immunology" of the Federal Medical Biological Agency of the Russian Federation, Moscow

Correspondence:
Sofya A. Kuznetsova, Cand. Sci. in Physics and Mathematics, a leading researcher at the Laboratory of Biophysics 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: kuznetsova.sonya@gmail.com

B-cell precursors (hematogones) account for less than 5% of normal bone marrow (BM) nucleated cells but in some clinical conditions the number of hematogones can be transiently increased. Their morphology has been characterized in patients with increased numbers of hematogones. However, the scarcity of hematogones and inability to obtain their pure population make it difficult to thoroughly investigate the morphology of these cells in normal BM. A pure population of hematogones was isolated as a fraction of $CD10^+$ BM mononuclear cells from 14 patients with increased numbers of hematogones and 12 healthy donors using microarrays with immobilized antibodies to cluster of differentiation (CD) antigens. We described the main morphological subtypes of hematogones of normal BM and analyzed the proportion of these cells among $CD19^+$, $CD22^+$, $CD20^+$, and $CD10^+CD34^+$ BM mononuclear cells. One to nine percent of hematogones are 13–17 μm in diameter and have basophilic cytoplasm, lacy or finely reticulated, blastic chromatin and prominent nucleoli. The remaining hematogones are immature lymphoid cells that vary considerably in size (7–15 μm in diameter) and have scanty cytoplasm, smudged chromatin and absent nucleoli. Three to twenty-five percent of these cells are larger than 10 μm. $CD10^+CD34^+$ cells do not show predominantly blastic morphology, however some blast-like hematogones express CD20. Hematogones in normal BM are heterogeneous in morphology and size. We found no apparent correlation between the morphology of hematogones and their stages of maturation. 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 the Russian Federation. All donors and patients gave their informed consent to BM aspiration and participation in future biomedical studies.
Key words: *hematogone, normal B-cell precursors, microarray, CD antigens, morphology, immunocytochemistry*

Zakirova A.O., et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology 2025; 24 (2): 96–103. DOI: 10.24287/1726-1708-2025-24-2-96-103

Гематогоны впервые были описаны как незрелые лимфоидные клетки, присутствующие в мазках костного мозга (КМ) [1]. По мере накопления данных о поверхностных антигенах, специфичных для В-лимфоцитов на различных стадиях созревания, было доказано, что гематогоны являются нормальными предшественниками В-клеток и нормальными аналогами бластов при В-клеточном остром лимфобластном лейкозе (В-ОЛЛ) [2–9]. Созревание предшественников В-клеток можно разделить на несколько стадий, распознаваемых по экспрессии нескольких поверхностных или внутриклеточных маркеров. Наименее зрелыми гематогонами (стадия 1) являются $CD34^{bright}$, $CD10^{bright}$, $CD19^{dim}$, $CD22^{dim}$, $CD20^{-}$; промежуточные пре-В-клетки (стадия 2) отрицательны по CD34 и имеют слабую экспрессию CD10, CD20, CD22 и $CD19^{bright}$. На 3-й стадии созревания гематогоны $CD10^{dim}$ и $CD22^{dim}$ не только положительны по CD19, но и приобретают экспрессию CD20 и частично поверхностных иммуноглобулинов [10–12]. Гематогоны составляют не более 5% клеток аспирата здорового КМ [10]. Однако их количество может временно увеличиться более чем на 50% во время восстановления после химиотерапии или трансплантации КМ у пациентов с негематопоэтическими новообразованиями, аутоиммунными заболеваниями или инфекциями [13–15]. Это временное увеличение количества нормальных предшественников В-клеток может быть ошибочно принято за В-ОЛЛ, поскольку гематогоны и опухолевые клетки при В-ОЛЛ имеют схожие морфологию и иммунофенотип [7].

Гематогоны были подробно исследованы методом проточной цитометрии у пациентов с их транзиторным доброкачественным увеличением. Большинство этих исследований посвящено критериям дифференциации между гематогонами и бластами, характерными для В-ОЛЛ [11, 15–19]. Основные морфологические характеристики гематогонов также были получены из образцов КМ пациентов с их повышенным количеством [11, 13]. В нескольких исследованиях сообщалось о морфологической гетерогенности гематогонов [19–21] по сравнению с несколько более однородной морфологией бластов при В-ОЛЛ. Полученная таким образом информация является неполной, поскольку незрелые клетки в мазках КМ без дополнительного окрашивания не всегда могут быть надежно классифицированы как гематогоны, а не как клетки-предшественники другой линии.

B.Y.P. Hokland и соавт. [7] и T. Fukushima и соавт. [22] использовали более строгий подход к очистке гематогонов и выделили $CD10^{+}$-мононуклеарные клетки из аспиратов КМ пациентов с острыми лейкозами в стадии полной ремиссии, негемопоэтическими опухолями с отсутствием метастазов в КМ, доброкачественными заболеваниями крови (идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура, наследственный сфероцитоз) и другими заболеваниями (инфекционный мононуклеоз, гистиоцитоз из клеток Лангерганса) для последующего морфологического исследования с использованием проточного клеточного сортера. Помимо предшественников В-клеток CD10 экспрессируются на зрелых гранулоцитах и лишь небольшой части Т-клеток [23], так что в отсутствие В-ОЛЛ всю популяцию $CD10^{+}$-мононуклеарных клеток КМ можно рассматривать как гематогоны. Однако морфология гематогонов в нормальном КМ не изучалась из-за малого их количества.

В данной работе описана морфология $CD10^{+}$-фракции мононуклеарных клеток, выделенной из аспиратов КМ 12 здоровых доноров и 14 пациентов с новообразованиями, не связанными с созреванием В-клеток или незлокачественными заболеваниями крови, приводящими к реактивному увеличению гематогонов. $CD10^{+}$-клетки получали из мононуклеарной фракции аспирата КМ путем инкубации с клеточным биочипом, прозрачной пластиковой подложкой с иммобилизованными моноклональными антителами к дифференцировочным CD-антигенам [24]. Ранее было показано, что связывание клеток с биочипом является высокоспецифичным, а захваченные биочипом лейкоциты морфологически идентичны лейкоцитам в мазках крови и КМ. В данном исследовании описаны основные морфологические типы $CD10^{+}$ В-клеточных предшественников и исследована экспрессия CD34, CD19, CD20, CD22 и иммуноглобулина класса М (IgM) на их поверхности, чтобы соотнести иммунологические стадии созревания гематогонов с их морфологией.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Пациенты

Были исследованы аспираты КМ 12 здоровых доноров в возрасте от 4 до 22 лет (средний возраст 9 лет, 8 пациентов мужского пола, 4 – женского), полученные в ходе подготовки к гаплоидентичной трансплантации КМ, и 14 пациентов в возрасте от 1 до 15 месяцев (средний возраст 8,5 месяцев, 9 мальчиков, 5 девочек) с различными новообразованиями или незлокачественными заболеваниями (8 пациентов с нейробластомой, 2 – с острым миелоидным лейкозом, 2 – с агранулоцитозом, 1 – с аутоиммунным лимфопролиферативным синдромом, 1 – с неизвестным диагнозом, у которого острый лейкоз был исключен) и повышенным уровнем гематогонов по данным проточной цитометрии. Данное исследование одобрено независимым этическим комитетом и утверждено решением ученого совета НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева. Было получено согласие

доноров и пациентов на забор КМ и будущие биомедицинские исследования.

Изготовление клеточных биочипов

Клеточные биочипы были изготовлены путем адсорбции анти-CD-антител на пластиковые покровные стекла, как описано в работе A.N. Khvastunova и соавт. [24]. При изготовлении клеточных биочипов были использованы моноклональные мышиные антитела к человеческому CD2 (клон LT2), CD10 (клон LT10), CD19 (клон LT19), CD20 (клон LT20), CD22 (клон LT22) и IgM (ООО «Сорбент», Россия), к человеческому CD45RA (клон HI100; eBioscience, США) и изотипический контроль (P3.6.2.8.1; eBioscience, США) в качестве отрицательного контроля.

Сортировка лейкоцитов при помощи клеточного биочипа

Мононуклеарную фракцию аспирата КМ сортировали с помощью клеточного биочипа в соответствии с ранее описанным протоколом [24]. Мононуклеарную фракцию выделяли из аспирата КМ путем центрифугирования в градиенте Histopaque 1077 (Sigma, США) в соответствии с инструкцией производителя, отмывали и ресуспендировали в фосфатно-солевом буфере (PBS), pH 7,2–7,4, с 1% бычьим сывороточным альбумином (BSA; Sigma, США) и 20% фетальной телячьей сывороткой (FCS; Sigma, США) в концентрации 5×10^6 клеток/мл, заливали на биочип и инкубировали в течение 45 мин при 11°C без перемешивания. Далее биочип промывали в PBS с добавлением 1% BSA, затем в PBS, заливали 20 мкл чистой FCS и высушивали в лабораторной цитоцентрифуге. Для морфологического анализа клетки, связавшиеся с биочипами, окрашивали по Май-Грюнвальду–Гимзе и исследовали с помощью микроскопии в светлом поле. Процент мононуклеарных клеток, положительных по каждому CD, включенному в панель биочипа, определяли как плотность связывания мононуклеаров на соответствующем пятне иммобилизованных антител к данному CD на биочипе, нормализованную на плотность связывания клеток в пятне положительного контроля (анти-CD45RA), как было обосновано ранее [24]. Плотность связывания клеток оценивали полуавтоматически на основе анализа микрофотографий клеток, связавшихся с биочипом, при увеличении в 200 раз.

Иммунофлуоресценция

Мононуклеарную фракцию аспирата КМ, выделенную, как описано выше, и ресуспендированную в PBS с 1% BSA и 20% FCS в концентрации 10^7 клеток/мл окрашивали моноклональными мышиными антителами к CD34-FITC (клон 561; Biolegend, США) в 1% BSA в PBS при комнатной температуре в течение 30 мин, затем промывали в том же буфере. Меченые клетки инкубировали с биочипом, отмывали и сушили, как описано ранее [24]. Затем клетки, связавшиеся с биочипом, фиксировали в 1% растворе формальдегида в PBS при комнатной температуре в течение 1 ч. Затем альдегидные группы инактивировали в 100 мМ растворе глицина при комнатной температуре в течение 1 мин, далее биочип со связанными клетками промывали в PBS и визуализировали либо непосредственно с помощью конфокальной флуоресцентной микроскопии (Axio Observer.Z1, Carl Zeiss, Германия), либо с помощью протокола ферментативного усиления флуоресцентного сигнала.

Ферментативное усиление флуоресцентного сигнала

Окрашенные анти-CD34-FITC клетки, связанные с биочипами, приготовленные, как описано выше, инкубировали со вторичными козьими антителами против FITC, конъюгированными со щелочной фосфатазой (ЩФ) (ab6657, Abcam, США) в течение 30 мин при комнатной температуре во влажной камере, промывали TBS (набор для определения PNA ISH, Dako, Дания), а затем инкубировали с субстратом ЩФ BCIP/NBT (набор для определения PNA ISH, Dako, Glostrup, Дания) в течение 45–60 мин при комнатной температуре во влажной камере. Затем образец промывали водопроводной водой, высушивали и хранили при комнатной температуре до 1 нед перед анализом. Анализ проводился методом световой микроскопии в светлом поле.

Микроскопия светлого поля

Морфологию клеток и результаты иммуноцитохимии с ферментативным усилением изучали с помощью микроскопа Nikon Eclipse Ni, оснащенного камерой Nikon DS-Ri1 (Nikon, Нидерланды), при увеличении в 1000 и 200 раз. Измерение размера клеток проводилось с использованием программного обеспечения ImageJ. Морфологическая классификация клеток для каждого донора или пациента проводилась независимо двумя морфологами. Для каждого донора или пациента было проанализировано не менее 100 клеток для каждого пятна анти-CD-антител. В качестве контроля для зрелых В-клеток был измерен размер 50 мононуклеаров периферической крови, связавшихся с анти-CD19.

Оценка количества $CD34^+$-клеток

Фотографии мононуклеаров КМ, меченых анти-CD34-FITC, в светлом поле после ферментативного усиления, в пятнах биочипов анти-CD10 (эксперимент) и анти-CD3 (отрицательный контроль) были

сделаны в одинаковых условиях, после чего их преобразовали в оттенки серого, инвертировали и вычли фон. Фотографии флуоресценции анти-CD34-FITC анализировали непосредственно после вычитания фона. Интенсивность сигнала анти-CD34 для каждой клетки оценивали как среднюю в пределах границ клеток. Весь анализ изображений проводился с использованием программного обеспечения ImageJ. В каждом эксперименте строили гистограмму интенсивности сигнала для отрицательного контроля; пороговая интенсивность для CD34⁺ была установлена выше 95% клеток отрицательного контроля.

Статистический анализ

Данные представлены либо в виде среднего значения ± стандартное отклонение, либо в виде диапазона (медианы). При сравнении данных для нормального КМ и КМ, богатого гематогонами, использовался критерий Манна–Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Доля мононуклеаров, положительных по различным В-клеточным маркерам, в нормальном костном мозге и костном мозге пациентов с повышенным уровнем гематогонов

На *рисунке 1* представлена доля клеток, положительных по различным маркерам лимфоцитов, среди мононуклеаров, выделенных из аспирата КМ 14 пациентов с повышенным количеством гематогонов и 12 здоровых доноров. У пациентов с повышенным количеством гематогонов количество Т- и NK-клеток (CD2⁺) было ниже, а общее количество В-клеток (CD19⁺), гематогонов (CD10⁺), зрелых В-клеток (sIgM⁺) – выше, чем у здоровых доноров.

Морфологические характеристики предшественников В-лимфоцитов в нормальном костном мозге

В результате детального анализа CD10⁺-мононуклеаров, выделенных из аспирата нормального КМ, было выделено 3 группы, морфологически отличающиеся между собой (*рисунок 2*). Самые крупные клетки с высоким и средним ядерно-цитоплазматическим соотношением, синей цитоплазмой с перинуклеарным просветлением, кружевной или мелкосетчатой структурой хроматина и 1–2 ядрышками (*рисунок 2А–Г*) далее будут иметь название «бласты», поскольку они морфологически наиболее близки к бластам при В-ОЛЛ [21]. Клетки среднего размера с высоким ядерно-цитоплазматическим соотношением и нежным рисунком хроматина, синей цитоплазмой без перинуклеарной зоны и четко видимых ядрышек (*рисунок 2Д–З*) далее будут называться крупными предшественниками. Клетки этих 2 морфологических типов обычно идентифицируют в мазках КМ как гематогоны. Третья морфологическая группа включает оставшиеся клетки, связавшиеся с антителами к CD10 на биочипе: небольшие клетки с наибольшим соотношением ядра и цитоплазмы, незрелым хроматином и отсутствием видимых ядрышек (*рисунок 2И–М*). Бласты имеют наибольший размер – 13–17 мкм в диаметре, диаметр крупных предшественников – более 10 мкм и до 15 мкм. Третья группа CD10⁺-клеток имеет наименьший размер – 7–10 мкм в диаметре.

Большинство более мелких CD10⁺-клеток похожи по морфологии на крупные предшественники, имеют сходную структуру с хроматином и ядерно-цитоплазматическое соотношение, но меньший размер, хотя у некоторых из них наблюдается более конденсированный или более грубый хроматин. Средний диаметр зрелых В-клеток, выделенных из периферической крови здоровых доноров, измеренный тем же методом, составляет 10 ± 1 мкм.

Доля бластов и крупных предшественников среди CD10⁺-, CD19⁺-, CD20⁺-, CD22⁺- и sIgM⁺-мононуклеаров костного мозга

Процент бластов и крупных предшественников среди мононуклеаров КМ, положительных по основным В-клеточным маркерам, у здоровых доноров и пациентов с повышенным количеством

Рисунок 1
Процент мононуклеаров, положительных по CD2, CD10, CD19, CD20, CD22 и sIgM, в нормальном КМ (доноры) и КМ пациентов с повышенным уровнем гематогонов (пациенты), рассчитанный как плотность связывания клеток с различными анти-CD-антителами на биочипе, нормализованная на плотность связывания клеток с анти-CD45 (положительный контроль)
Столбиками представлены средние значения, усы – 95% доверительный интервал

Figure 1
The percentage of mononuclear cells positive for CD2, CD10, CD19, CD20, CD22 and sIgM in the normal BM obtained from the donors and in the BM of the patients with an increased number of hematogones calculated as the density of cell binding to different anti-CD-antibodies on a microarray normalized to the density of cell binding to anti-CD45 (positive control)
The bars indicate the mean values, while the whiskers represent a 95% confidence interval

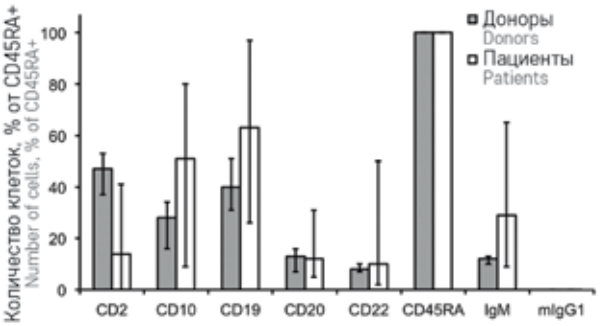


Рисунок 2
Морфологические группы гематогонов в КМ: А–Г – бласты; Д–З – крупные предшественники; И–М – другие. Стрелки указывают на клетки соответствующих типов. Окраска по Романовскому–Гимзе, × 1000; Н – распределение по размеру гематогонов различных морфологических групп. Размеры гематогонов были проанализированы у 3 здоровых доноров, не менее 100 клеток для каждого донора
Ящики обозначают межквартильный интервал, усы – минимальное и максимальное значения, горизонтальная линия – медиану, квадрат – среднее значение

Figure 2
Morphological groups of hematogones in BM: А–Г – blast cells; Д–З – large precursor cells; И–М – others. The arrows show cells of the corresponding groups. The Romanowsky–Giemsa staining, × 1000; Н – the distribution of morphologically different hematogones by size. The size of hematogones was analyzed in 3 healthy donors, at least 100 cells for each donor
The boxes show the interquartile interval, the whiskers represent the minimal and maximal values, the horizontal lines show the medians, and the squares indicate the mean values

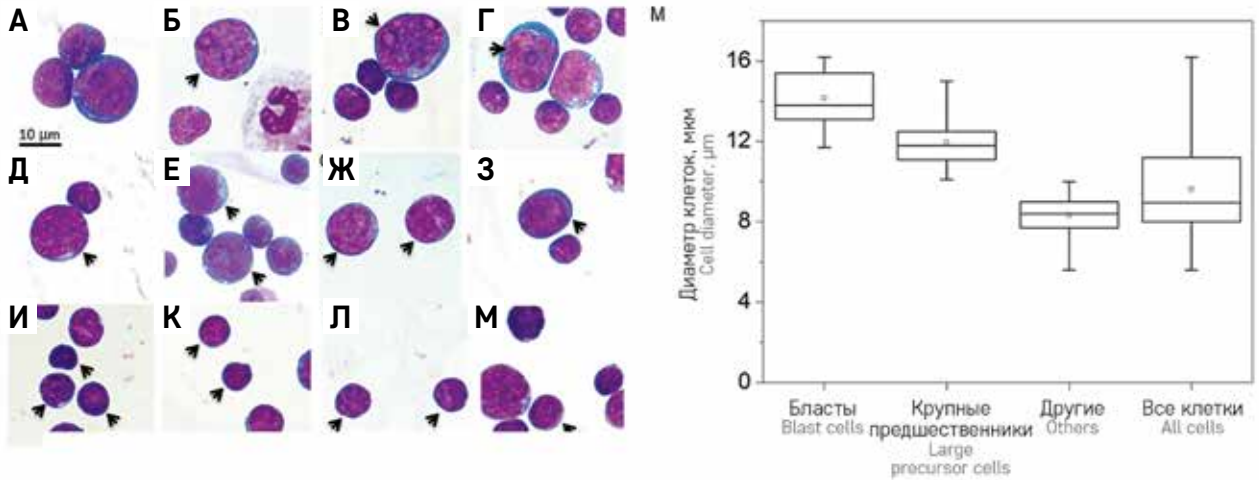
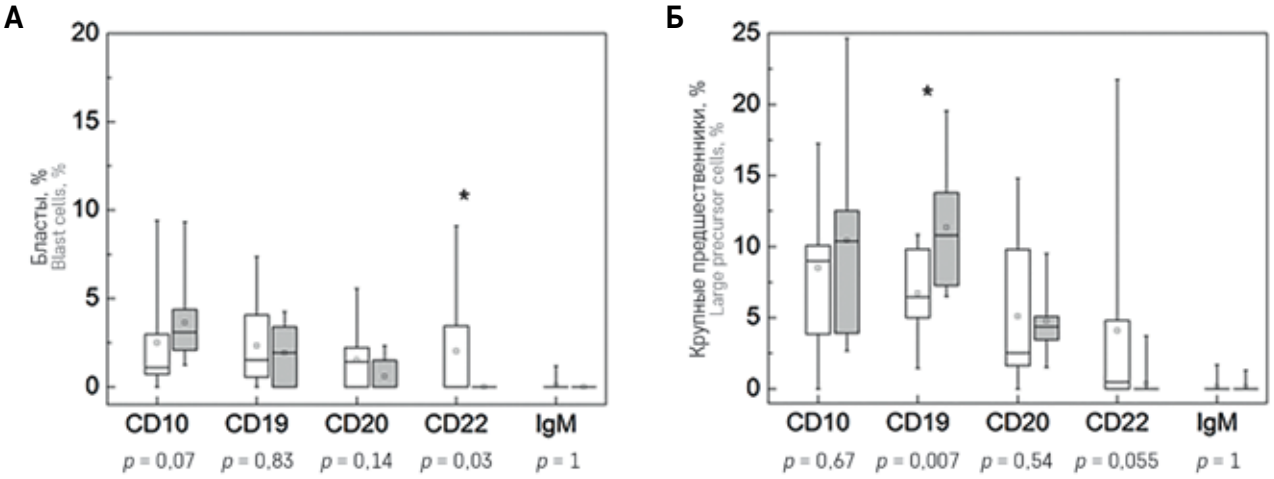


Рисунок 3
Процент клеток с морфологией бластов (А) и крупных предшественников (Б) среди мононуклеаров, связавшихся с анти-CD10, анти-CD19, анти-CD20, анти-CD22 и анти-IgM на клеточном биочипе, для здоровых доноров (серые ящики) и пациентов с повышенным уровнем гематогонов (белые ящики)
Ящики обозначают межквартильный интервал, усы – минимальное и максимальное значения, горизонтальная линия – медиану, квадрат – среднее значение; значения *p* рассчитаны на основе критерия Манна–Уитни, звездочкой обозначены значимые различия ($p < 0,05$)

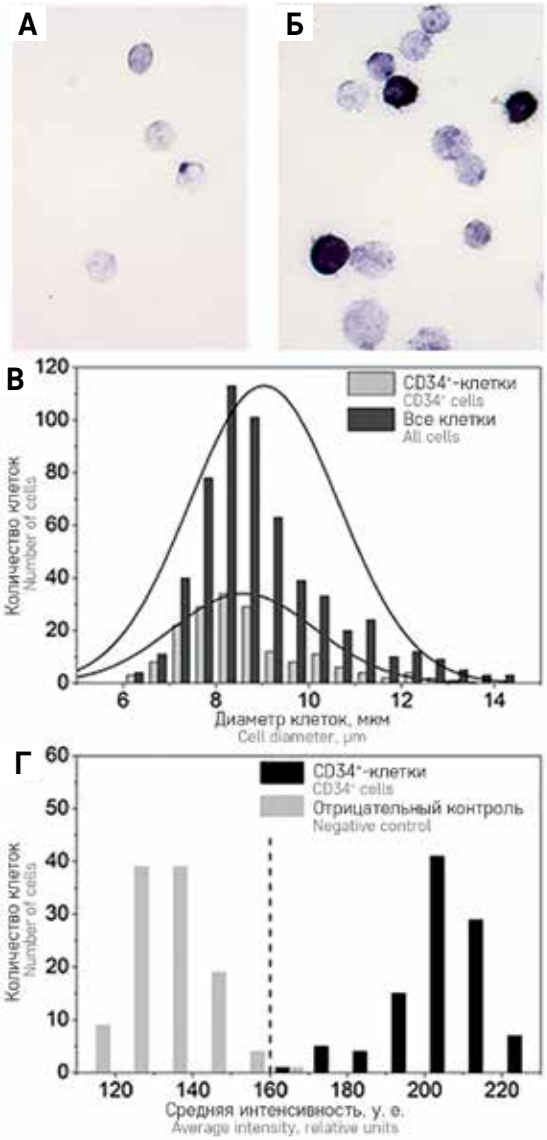
Figure 3
The percentage of cells with blast cell morphology (A) and large precursor cell morphology (Б) among mononuclear cells bound to anti-CD10, anti-CD19, anti-CD20, anti-CD22, and anti-IgM on a cell biochip, for the healthy donors (grey boxes) and for the patients with increased numbers of hematogones (white boxes)
The boxes show the interquartile interval, the whiskers represent the minimal and maximal values, the horizontal lines show the medians, the squares indicate the mean values; *p*-values are calculated using the Mann–Whitney test, the asterisks indicate significant differences ($p < 0.05$)



гематогонов представлен на *рисунке 3*. У здоровых доноров количество бластов варьирует в пределах 1,4–9,3% (медиана 3%), доля крупных предшественников составляет 2,7–24,6% (медиана 11%) $CD10^+$-мононуклеаров. В КМ у большинства здоровых доноров бласты и крупные предшественники также присутствовали среди $CD19^+$- и $CD20^+$-клеток, но отсутствовали среди $CD22^+$- или $sIgM^+$-клеток,

Рисунок 4
Иммуноцитохимическое окрашивание гематогонов анти-CD34: А, Б – фотографии окрашенных анти-CD34-FITC мононуклеаров КМ, связавшихся на биочипе с анти-CD3 (А) и анти-CD10 (Б) после ферментативного усиления с использованием вторичных антител к FITC, конъюгированных с щелочной фосфатазой, и субстрата BCIP/NBT (см. раздел «Материалы и методы исследования»), × 1000; В – распределение по размеру CD10⁺- (черный цвет) и CD10⁺CD34⁺- (серый цвет) мононуклеаров, выделенных из нормального КМ (объединенные данные из 3 нормальных образцов КМ, 750 отдельных клеток); Г – определение порогового значения (пунктирная линия) по интенсивности сигнала CD34⁺-клеток (черный цвет) по сравнению с отрицательным контролем (серый цвет)

Figure 4
Immunocytochemical staining of hematogones for CD34 (anti-CD34 stain): А, Б – images of mononuclear cells of BM stained with FITC anti-human CD34 antibody that bound on a microarray to anti-CD3 (А) and anti-CD10 (Б) after enzyme enhancement using FITC secondary antibodies conjugated with alkaline phosphatase and BCIP/NBT substrate (see Materials and Methods), × 1000; В – the distribution of CD10⁺ (black color) and CD10⁺CD34⁺ (grey color) mononuclear cells isolated from normal BM (collective data obtained from 3 normal BM samples, 750 individual cells) by size; Г – the determination of a threshold value (dash line) of the signal intensity of CD34⁺ cells (black color) in comparison with the negative control (grey color)



только в 1 образце здорового КМ были найдены несколько крупных предшественников в пятне анти-CD22. Отсутствие клеток с бластной морфологией и крупных предшественников среди CD22⁺- и sIgM⁺-клеток указывает на их иммунологическую незрелость и согласуется с ранее опубликованными данными [10, 25].

У пациентов с повышенным количеством гематогонов 0–9,4% (медиана 1,1%) среди CD10⁺-мононуклеаров составляли бласты, а 0–17,2% (медиана 9%) – крупные предшественники. Интересно, что у пациентов с повышенным количеством гематогонов значительно больше бластов имели экспрессию CD22 (*рисунок 3*). Кроме того, крупные предшественники составляли значительно меньший процент клеток CD19⁺ у пациентов с повышенным количеством гематогонов, чем в контрольной группе. Это согласуется с тем фактом, что реактивное увеличение количества гематогонов сопровождается увеличением количества зрелых В-клеток (*рисунок 1*).

CD34⁺-гематогоны морфологически не являются преимущественно бластами или крупными предшественниками

Клетки КМ с бластной морфологией обычно считаются наиболее незрелыми. Чтобы выяснить, имеют ли CD34⁺-гематогоны на первой стадии их созревания преимущественно бластную морфологию, мы построили распределение CD34⁺CD10⁺-клеток по размерам в нормальных аспиратах КМ и сравнили его с распределением по размерам всей популяции CD10⁺. Клетки с бластной морфологией имеют диаметр более 13 мкм (*рисунок 2*), таким образом, если они преобладают среди клеток CD34⁺, то это повлияет на распределение последних по размерам.

Мононуклеарные клетки, выделенные из КМ здоровых доноров, были помечены анти-CD34-FITC и затем проинкубированы с биочипом. Относительное количество CD10⁺CD34⁺ и CD10⁺CD34⁻ было определено у 6 здоровых доноров, у 3 из них методом прямой иммунофлуоресценции, а у остальных 3 – после ферментативного усиления флуоресценции (*рисунок 4А, Б*). В среднем 20 ± 8% мононуклеарных клеток, связавшихся на биочипе с анти-CD10, были положительны по CD34. На *рисунке 4В* показано распределение по диаметру клеток CD34⁺CD10⁺ и всех CD10⁺-клеток. Большинство CD34⁺-клеток имеют диаметр менее 12 мкм, и существенных различий между распределением по размеру CD34⁺CD10⁺ и всех CD10⁺-клеток нет. Это означает, что CD34⁺CD10⁺-клетки морфологически не являются преимущественно бластами или крупными предшественниками.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Детальный анализ морфологии гематогонов нормального КМ затруднен из-за их малого количества. Большая часть данных о морфологии гематогонов была получена на образцах КМ пациентов с их реактивным увеличением, поэтому прежде всего необходимо было проверить, можно ли экстраполировать эти данные на нормальный КМ. Анализ гематогонов в мазках КМ дополнительно осложняется неопределенностью в отнесении некоторых клеток незрелой морфологии к гематогонам, а не к миелоидным или Т-клеточным предшественникам. В данной работе проведен морфологический анализ чистой популяции гематогонов, выделенных как $CD10^+$-фракция мононуклеарных клеток КМ, с помощью биочипа с иммобилизованными антителами к CD и выполнено сравнение результатов, полученных у пациентов с повышенным содержанием гематогонов и у здоровых доноров. Следует отметить, что в данном исследовании все пациенты с повышенным уровнем гематогонов были младше 2 лет, так как реактивное повышение гематогонов гораздо чаще наблюдается у маленьких детей, в то время как здоровые доноры намного старше.

По своим морфологическим особенностям гематогоны в нормальном КМ делятся на 2 категории: бласты диаметром 13–17 мкм с кружевным или тонкосеточным хроматином и одним или несколькими ядрышками и незрелые лимфоидные клетки с очень высоким ядерно-цитоплазматическим соотношением, нежным рисунком хроматина и отсутствием ядрышек. Небольшая часть клеток последнего морфологического типа имеет диаметр 10–15 мкм и отнесена нами к предварительной категории «крупные предшественники». Стоит отметить, что гематогоны с бластной морфологией по некоторым морфологическим критериям [26] имеют много общих черт с миелоидными бластами, поэтому их нелегко идентифицировать в качестве предшественников В-клеток в мазках КМ.

Фракции $CD10^+$-мононуклеаров с бластной морфологией и крупных предшественников в нормальном КМ и КМ пациентов с повышенным процентом гематогонов существенно не различаются, и у пациентов не было обнаружено новых морфологических типов предшественников В-клеток. Эти данные оправдывают использование образцов с повышенным содержанием гематогонов для их морфологического исследования. Доля крупных предшественников в общей популяции В-клеток ($CD19^+$) была значительно меньше у пациентов с повышенным содержанием гематогонов по сравнению со здоровыми донорами. Это может быть объяснено тем фактом, что процент зрелых $sIgM^+$ В-клеток при реактивном увеличении гематогонов также растет (*рисунок 1*).

Увеличение количества $sIgM^+$ В-клеток одновременно с ростом количества гематогонов является одним из признаков, отличающих реактивное увеличение гематогонов от В-ОЛЛ, поскольку это показывает отсутствие характерного для В-ОЛЛ блока дифференцировки В-клеток [11, 15]. Хотя среднее процентное содержание $CD20^+$- и $CD22^+$-клеток в аспиратах КМ здоровых доноров и пациентов с повышенным уровнем гематогонов было одинаковым (*рисунок 1*), у некоторых пациентов с повышенным уровнем гематогонов оно было выше, чем у здоровых доноров. Эта разница не связана с возрастом, так как процент $CD20^+$-клеток в КМ, напротив, с возрастом увеличивается [25]. Поскольку процентное содержание $CD20^+$- и $CD22^+$-клеток с бластной морфологией и крупных предшественников у некоторых пациентов выше, чем в контрольной группе, это может указывать на то, что увеличение популяций этих двух видов клеток, по крайней мере, частично обусловлено увеличением количества гематогонов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Самый интересный вопрос заключается в том, существует ли корреляция между морфологией гематогонов и стадией их созревания. Мы частично ответили на этот вопрос, проанализировав распределение по размерам $CD34^+CD10^+$-клеток, что соответствует 1-й стадии созревания гематогонов. Показано, что диаметр $CD34^+$-клеток изменяется в пределах от 7 до 14 мкм и, следовательно, морфологически они не относятся исключительно к бластам или крупным предшественникам (*рисунок 4В*). С другой стороны, некоторые клетки, положительные по CD20 – маркеру, который отсутствует на поверхности В-клеток до 2-й стадии созревания гематогонов, также имеют бластную морфологию (*рисунок 3А*). Таким образом, корреляции между морфологией и стадией созревания гематогонов не обнаружено. Поскольку нормальные предшественники В-клеток продолжают пролиферировать до стадии малых пре-В-клеток, на которой начинается перестройка легких цепей иммуноглобулинов [27, 28], можно предположить, что разница в морфологии отражает положение клетки в клеточном цикле, а не стадию ее созревания.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа частично поддержана грантом Российского научного фонда №23-45-10039 (https://rscf.ru/en/project/23-45-10039/).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ORCID

Zakirova A.O. ORCID: https://orcid.org/0000-0001-9475-3318
Fedyanina O.S. ORCID: https://orcid.org/0000-0001-7131-8006
Khvastunova A.N. ORCID: https://orcid.org/0000-0002-7117-0168
Filatov A.V. ORCID: https://orcid.org/0000-0002-6460-9427
Kuznetsova S.A. ORCID: https://orcid.org/0000-0001-5946-0026

Литература / References

1. Vogel P., Erf L.A., Rosenthal N. Hematological Observations on Bone Marrow Obtained by Sternal Puncture. Am J Clin Pathol 1937; 7: 498–515.
2. Muehleck S.D., McKenna R.W., Gale P.F., Brunning R.D. Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-positive cells in bone marrow in the absence of hematologic malignancy. Am J Clin Pathol 1983; 79: 277–84.
3. Janossy G., Bollum F.J., Bradstock K.F., McMichael A., Rapson N., Greaves M.F. Terminal transferase-positive human bone marrow cells exhibit the antigenic phenotype of common acute lymphoblastic leukemia. J Immunol 1979; 123: 1525–9.
4. Janossy G., Bollum F., Bradstock K., Ashley J. Cellular phenotypes of normal and leukemic hematopoietic cells determined by analysis with selected antibody combinations. Blood 1980; 56: 430–41.
5. LeBien T.W., Wörmann B., Villablanca J.G., Law C.L., Steinberg L.M., Shah V.O., Loken M.R. Multiparameter flow cytometric analysis of human fetal bone marrow B cells. Leukemia 1990; 4: 354–8.
6. Schmitt C., Eaves C.J., Lansdorp P.M. Expression of CD34 on human B cell precursors. Clin Exp Immunol 1991; 85: 168–73.
7. Hokland B.Y.P., Rosenthal P., Griffin J.D., Nadler L.M., Daley J., Hokland M., et al. Purification and characterization of fetal hematopoietic cells that express the common acute lymphoblastic leukemia antigen (CALLA). J Exp Med 1983; 157: 114–29.
8. Brady K.A., Atwater S.K., Lowell C.A. Flow cytometric detection of CD10 (cALLA) on peripheral blood B lymphocytes of neonates. Br J Haematol 1999; 107: 712–5.
9. Loken M.R., Shah V.O., Dattilio K.L., Civin C.I. Flow cytometric analysis of human bone marrow. II. Normal B lymphocyte development. Blood 1987; 70: 1316–24.
10. Chantepie S.P., Cornet E., Salaün V., Reman O. Hematogones: an overview. Leuk Res 2013; 37: 1404–11.
11. McKenna R.W. Immunophenotypic analysis of hematogones (B-lymphocyte precursors) in 662 consecutive bone marrow specimens by 4-color flow cytometry. Blood 2001; 98: 2498–507.
12. Mckenna R.W., Asplund S.L., Kroft S.H. immunophenotypic analysis of hematogones (B-lymphocyte precursors) and neoplastic lymphoblasts by 4-color flow cytometry. Leuk Lymphoma 2004; 45: 277–85.
13. Longacre T.A., Foucar K., Crago S., Chen I.M., Griffith B., Dressler L., et al. Hematogones: a multiparameter analysis of bone marrow precursor cells. Blood 1989; 2: 543–53.
14. Schuurmans Stekhoven J.H., Langenhuysen C.A., Bakkeren J.A., Holland R., Höller I., De Vaan G.A., Schretlen E.D. Morphology and incidence of the “posttherapeutic lymphoid cell” in the bone marrow of children with acute lymphoblastic leukemia. Am J Pathol 1986; 124: 46–52.
15. Rimsza L.M., Larson R.S., Winter S.S., Foucar K., Chong Y.Y., Garner K.W., Leith C.P. Benign hematogone-rich lymphoid proliferations can be distinguished from B-lineage acute lymphoblastic leukemia by integration of morphology, immunophenotype, adhesion molecule expression, and architectural features. Am J Clin Pathol 2000; 114: 66–75.
16. Ryan D., Chapple C., Kossover S., Sandberg A.A., Cohen H.J. Phenotypic similarities and differences between CALLA-positive acute lymphoblastic leukemia cells and normal marrow CALLA-positive B cell precursors. Blood 1987; 70: 814–21.
17. Al-Shieban S., Byrne E., Trivedi P., Morilla R., Matutes E., Naresh K.N. Immunohistochemical distinction of haematogones from B lymphoblastic leukaemia/lymphoma or B-cell acute lymphoblastic leukaemia (B-ALL) on bone marrow trephine biopsies: A study on 62 patients. Br J Haematol 2011; 154 (4): 466–70.
18. Don M.D., Lim W., Lo A., Cox B., Huang Q., Kitahara S., et al. Improved recognition of hematogones from precursor B-lymphoblastic leukemia by a single tube flow cytometric analysis. Am J Clin Pathol 2020; 153: 790–8.
19. Sevilla D.W., Colovai A.I., Emmons F.N., Bhagat G., Alobeid B. Hematogones: a review and update. Leuk Lymphoma 2010; 51: 10–9.
20. Fenneteau O., Lainey E. Valeur diagnostique du myélogramme au cours des pathologies constitutionnelles de l’enfant. Ann Biol Clin (Paris) 2007; 65: 483–503.
21. Braham Jmili N., Nsaibia S., Jacob M.C., Omri H., Laatiri M.A., Yacoub S., et al. Immunophenotypic analysis of bone marrow B lymphocyte precursors (hématogones) by flow cytometry. Clin Lab Sci 2009; 22: 208–15.
22. Fukushima T., Sumazaki R., Koike K., Tsuchida M., Matsui A., Nakauchi H. Multicolor flow-cytometric, morphologic and clonogenic analysis of marrow CD10-positive cells in children with leukemia in remission of nonmalignant diseases. J Pediatr Hematol Oncol 1998; 20: 222–8.
23. Ortolani C. Flow Cytometry of Hematological Malignancies. Wiley-Blackwell; 2021.
24. Khvastunova A.N., Kuznetsova S.A., Al-Radi L.S., Vylegzhanina A.V., Zakirova A.O., Fedyanina O.S., et al. Anti-CD antibody microarray for human leukocyte morphology examination allows analyzing rare cell populations and suggesting preliminary diagnosis in leukemia. Sci Rep 2015; 5: 12573.
25. van Lochem E.G., van der Velden V.H.J., Wind H.K., te Marvelde J.G., Westerdaal N.A.C., van Dongen J.J.M. Immunophenotypic differentiation patterns of normal hematopoiesis in human bone marrow: reference patterns for age-related changes and disease-induced shifts. Cytometry B Clin Cytom 2004; 60: 1–13.
26. Rosenthal S., Canellos G.P., Whang-Peng J., Gralnick H.R. Blast crisis of chronic granulocytic leukemia. Morphologic variants and therapeutic implications. Am J Med 1977; 63: 542–7.
27. Mårtensson I.L., Almqvist N., Grimsholm O., Bernardi A.I. The pre-B cell receptor checkpoint. FEBS Lett 2010; 584: 2572–9.
28. Karasuyama H., Rolink A., Shinkal Y., Young F., Alt F.W., Melchers F. The expression of Vpre-B/λ5 surrogate light chain in early bone marrow precursor B cells of normal and B cell-deficient mutant mice. Cell 1994; 77: 133–43.

DOI: 10.24287/1726-1708-2025-24-2-104-110

© 2025 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России

Поступила 16.05.2025
Принята к печати 06.06.2025

EDN: PWYNRG

Детекция фосфатидилсерин-экспрессирующих эритроцитов в цельной крови

И.А. Чабин[1], Н.А. Подоплелова[1, 2], Е.М. Кольцова[1, 2], К.Р. Бутов[1–3], С.И. Обыденный[1, 2], Н.С. Сметанина[1], М.А. Пантелеев[1, 2, 4]

[1]ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, Москва
[2]ФГБУН «Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии» РАН, Москва
[3]ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, Москва
[4]ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», Москва

Контактная информация:
Чабин Иван Андреевич,
лаборант-исследователь лаборатории клеточного гемостаза и тромбоза ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России
Адрес: 117997, Москва, ул. Саморы Машела, 1
E-mail: ivan.chabin@dgoi.ru

Механизмы клиренса эритроцитов из кровотока разнообразны и могут включать такие процессы, как эриптоз и гемолиз. При этом несомненна роль селезенки, которая удаляет эритроциты из кровотока в связи с их способностью проходить сквозь узкие пространства, однако отдельные аспекты, такие как роль белков в этом процессе, которые могут связывать фосфатидилсерин, продолжают вызывать вопросы. Таким образом, точные механизмы элиминации эритроцитов до сих пор не установлены. В данной работе приведен цитофлуориметрический протокол детекции эритроцитов цельной крови, которые могут быть отнесены к предэлиминационной стадии, с использованием маркеров фосфатидилсерина. Также представлены результаты анализа крови здоровых доноров, которые позволяют говорить о возможности надежной детекции эриптоза в цельной крови. Настоящее исследование одобрено независимым этическим комитетом и утверждено решением ученого совета ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России.

Ключевые слова: *эритроциты, клеточная смерть, эриптоз, проточная цитофлуориметрия*

Чабин И.А. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2025; 24 (2): 104–10.
DOI: 10.24287/1726-1708-2025-24-2-104-110

© 2025 by «D. Rogachev NMRCPHOI»

Received 16.05.2025
Accepted 06.06.2025

Detection of phosphatidylserine-expressing red blood cells in whole blood

I.A. Chabin[1], N.A. Podoplelova[1, 2], E.M. Koltsova[1, 2], K.R. Butov[1-3], S.I. Obydennyi[1, 2], N.S Smetanina[1], M.A. Panteleev[1, 2, 4]

[1]The Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology of Ministry of Healthcare of Russia, Moscow
[2]Center for Theoretical Problems of Physical and Chemical Pharmacology, Russian Academy of Sciences, Moscow
[3]The N.I. Pirogov Russian National Research Medical University of Ministry of Healthcare of Russia, Moscow
[4]The M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow

Correspondence:
Ivan A. Chabin,
a research technician at the Laboratory of Cellular Hemostasis and Thrombosis at 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: ivan.chabin@dgoi.ru

There are various mechanisms of red blood cell (RBC) clearance from the circulation, including eryptosis and hemolysis. The spleen plays a major role in eliminating RBCs from the blood flow thanks to their ability to pass through narrow spaces. Still, some questions such as the role of phosphatidylserine-binding proteins in this process remain unanswered. Thus, RBC elimination mechanisms are still not very well explored. Here, we report on a flow cytometry protocol using phosphatidylserine markers for the detection of whole blood erythrocytes that can be classified as pre-elimination RBCs. We also provide the results of healthy donors' blood testing suggesting that reliable detection of eryptosis in whole blood is indeed possible. 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: *red blood cells, cell death, eryptosis, flow cytometry*

Chabin I.A., et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology 2025; 24 (2): 104–10.
DOI: 10.24287/1726-1708-2025-24-2-104-110

Эритроциты – самые распространенные клетки крови человека, их основной задачей является доставка кислорода ко всем клеткам тела. Гемоглобин, занимающий до 80% объема клетки, является токсичным для внутренних органов белком, в связи с чем предотвращение его высвобождения вследствие внутрисосудистого лизиса представляет собой важный вопрос. Другой причиной убрать эритроциты из кровотока до их окончательной смерти является нарушение способности «старых» клеток к изменению формы и, как следствие, возможность застревания в капиллярах [1]. Основную роль в их элиминации отводят селезенке – лимфоидному органу, который содержит ретикуло-эндотелиальную систему, ответственную за клиренс эритроцитов. Но каким образом селезенке удается элиминировать все клетки, которые могут погибнуть в ближайшее время? Могут ли эритроциты в стадии гибели циркулировать в общем кровотоке?

Считается, что решающую роль в клиренсе эритроцитов играет их фильтрация через особые ходы в селезенке, которые имитируют крайне узкие капилляры [1, 2]. В ходе старения эритроцит теряет способность менять свою форму [3] и в конце концов

застревает там. У данной гипотезы есть ряд недостатков. Так, в экспериментах на мышиных моделях было продемонстрировано, что элиминация эритроцитов замедляется при нокауте по лактадхерину (белок, способный связываться с фосфатидилсерином на поверхности клетки и опосредовать фагоцитоз) [4, 5]. Другое важное замечание (чисто математический расчет) – через селезенку в час проходит около 9 л крови, что приблизительно составляет 2 объема циркулирующей крови (ОЦК), однако до 90% этого объема проходит сквозь «закрытую» систему кровотока, в которой фильтрации сквозь ретикулоэндотелиальную систему не происходит. Несложно посчитать, что характерное время фильтрации 1 ОЦК через «открытую» систему, где и происходит клиренс, составит примерно 5 ч. Возможно, что некоторые эритроциты могут не попадать туда в течение и более длительного времени.

Таким образом, для того чтобы в кровотоке не было ни одного эритроцита в «мертвом» или «практически мертвом» состоянии, необходима система, элиминирующая их за несколько часов до теоретически возможной смерти с достаточно высокой степенью точности и, что немаловажно, специфичности. Данная задача представляется достаточно тяжелой, однако на сегодняшний день в крови здоровых доноров в ряде исследований достоверно не было детектировано ни одного «мертвого» эритроцита с достаточной степенью уверенности, чтобы не считать это проблемой метода (оценка спустя длительное время – 24–48 ч, определение эритроцитов после центрифугирования цельной крови в плазме, богатой тромбоцитами [6] и др.), но специалисты верят в их существование [3, 7–9]. А что такое «мертвый» или «практически мертвый» эритроцит? Основываясь на каких параметрах можно так сказать о клетке, у которой нет ни ядра, ни митохондрии?

Всего около 20 лет назад появилось и в дальнейшем закрепилось такое понятие, как «эриптоз», или запрограммированная гибель эритроцита [10]. Она характеризуется, во первых, нарушением мембранной асимметрии – появлением фосфатидилсерина на внешней мембране эритроцита, во-вторых, уменьшением объема клетки и, в-третьих, образованием микровезикул [10–12]. Данные признаки характерны и для апоптоза ядерных клеток. Для детекции эриптоза может быть использована проточная цитофлуориметрия, позволяющая оценивать форму/размер (через прямое (FSC) и боковое (SSC) светорассеяние), а также экспрессию фосфатидилсерина на внешней мембране клетки с использованием специальных маркеров.

В данной работе мы приводим собственный протокол проточной цитофлуориметрии для детекции эриптотических эритроцитов в цельной крови.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Взятие крови

Для исследования выполнялось взятие крови у здоровых добровольцев, подписавших добровольное информированное согласие в соответствии с Хельсинкской декларацией. Работа одобрена независимым этическим комитетом и утверждена решением ученого совета ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России. Взятие крови проводилось посредством венепункции в вакуумные пробирки с цитратом натрия (3,2%) в качестве антикоагулянта, объем крови во время хранения был не менее 1 мл. Перед анализом допускалось хранение крови до 6 ч при комнатной температуре.

Окрашивание и анализ образцов с помощью проточной цитофлуориметрии

Общая пробоподготовка и окраска подробно представлены в *таблице*. Цельная кровь для анализа разводилась модифицированным буфером Тироде

Таблица
Протокол выполнения проточной цитофлуориметрии

Table
The protocol for flow cytometry

Параметр Parameter	Значение Value			
Шаг 1. Разведение цельной крови Step 1. Dilution of whole blood				
Буфер Тироде, мкл Tyrode's buffer, μL	1000			
Цельная кровь, мкл Whole blood, μL	1			
Шаг 2. Пробоподготовка Step 2. Sample preparation				
	Проба 1 Sample 1	Проба 2 Sample 2	Проба 3 Sample 3	Проба 4 Sample 4
Разведенная кровь, мкл Diluted blood, μL	150	150	150	150
Хлорид кальция (100 мМ), мкл Calcium chloride (100 mM), μL	3	3	3	–
ЭДТА (100 мМ), мкл EDTA (100 mM), μL	–	–	–	3
Шаг 3. Окрашивание маркерами фосфатидилсерина Step 3. Staining with phosphatidylserine markers				
Аннексин V – AF647 (5 мкМ), мкл Annexin V – AF647 (5 μM), μL	3	3	–	3
Лактадхерин – mNeonGreen (10 мкл), мкл Lactadherin – mNeonGreen (10 μL), μL	1,5	1,5	–	–
mNeonGreen (10 мкМ), мкл mNeonGreen (10 μM), μL	–	–	1,5	–
Инкубация, мин Incubation, min	10	10	10	10
Шаг 4. Окрашивание антителами Step 4. Staining with antibodies				
Антитела к CD235a, мкл Antibodies to CD235a, μL	–	3	–	–
Инкубация, мин Incubation, min	5	5	5	5
Шаг 5. Измерение на проточном цитофлуориметре Step 5. Flow cytometry				

(150 мМ хлорида натрия, 2,7 мМ хлорида калия, 1 мМ хлорида магния, 0,4 мМ дигидрофосфата натрия, 20 мМ HEPES (4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота), 5 мМ глюкозы, и 0,5% бычьего сывороточного альбумина; pH 7,4) в 1000 раз. После этого разбавленную кровь инкубировали с маркерами фосфатидилсерина в течение 15 мин в присутствии 2 мМ хлорида кальция. В качестве маркеров использовали рекомбинантный аннексин V собственного производства, конъюгированный с AF647 (Lumiprobe, США), а также рекомбинантный C2-фрагмент лактадхерина с флуоресцентной меткой mNeonGreen собственного производства [13]. Финальные концентрации маркеров фосфатидилсерина были 100 нМ. Для наиболее точного детектирования эритроцитов образцы дополнительно окрашивали антителами к гликофорину A (Elabscience, Китай), время окраски – 5 мин (добавляли через 10 мин от начала инкубации с маркерами фосфатидилсерина), финальное разведение 1:50. Для определения возможного влияния антител на процессы эриптоза также использовали контрольную пробу без окрашивания антителами.

Для аннексина V в качестве контроля была выбрана проба с добавлением аннексина V – AF647 в присутствии ЭДТА (динатриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты, хелатор ионов кальция), которая блокирует связывание аннексина V с фосфатидилсерином. По данной пробе была проведена граница региона, обозначающего аннексин V-положительные события. Для лактадхерина в качестве контроля была выбрана проба с добавлением рекомбинантного mNeonGreen в концентрации 100 нМ. В качестве положительного контроля для связывания маркеров фосфатидилсерина использовались отмытые эритроциты, обработанные индуктором эриптоза ФМА (форбол-12-миристат-13-ацетат) [14].

Готовые образцы анализировали на проточном цитофлуориметре FACSCanto II (BD Biosciences, США) при средней скорости потока, дополнительное разведение перед измерением не проводилось. Общее число событий в пробе для анализа – не менее 150 000, число событий в регионе эритроцитов – не менее 120 000.

Обработка цитофлуориметрических данных

Обработка цитофлуориметрических данных проводилась в соответствии со схемой, представленной на *рисунке 1*. Для пробы без антител к CD235a регион эритроцитов выделялся с использованием плота FSC/SSC. Для пробы с добавлением антител регион эритроцитов выделялся по плоту FSC/CD235a, что в дальнейшем позволяет (и может быть особенно актуально для отдельных пациентов) при использовании плота FSC/SSC выделять регион эритроцитов с сохранной и измененной формой. Кроме того, представлены стратегии гейтирования для маркеров фосфатидилсерина.

Статистический анализ

Статистическая обработка результатов проточной цитофлуориметрии проводилась с использованием программного обеспечения Origin 2018b (OriginLab Corporation, США). Для сравнения долей фосфатидилсерин-положительных эритроцитов в зависимости от используемого маркера применялся дисперсионный анализ (ANOVA) с пост-хок t-критерием методом Бонферрони. Для анализа влияния антител на уровень фосфатидилсерин-положительных эритроцитов использовался U-критерий Манна–Уитни. Отличия считались статистически достоверными при значении $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

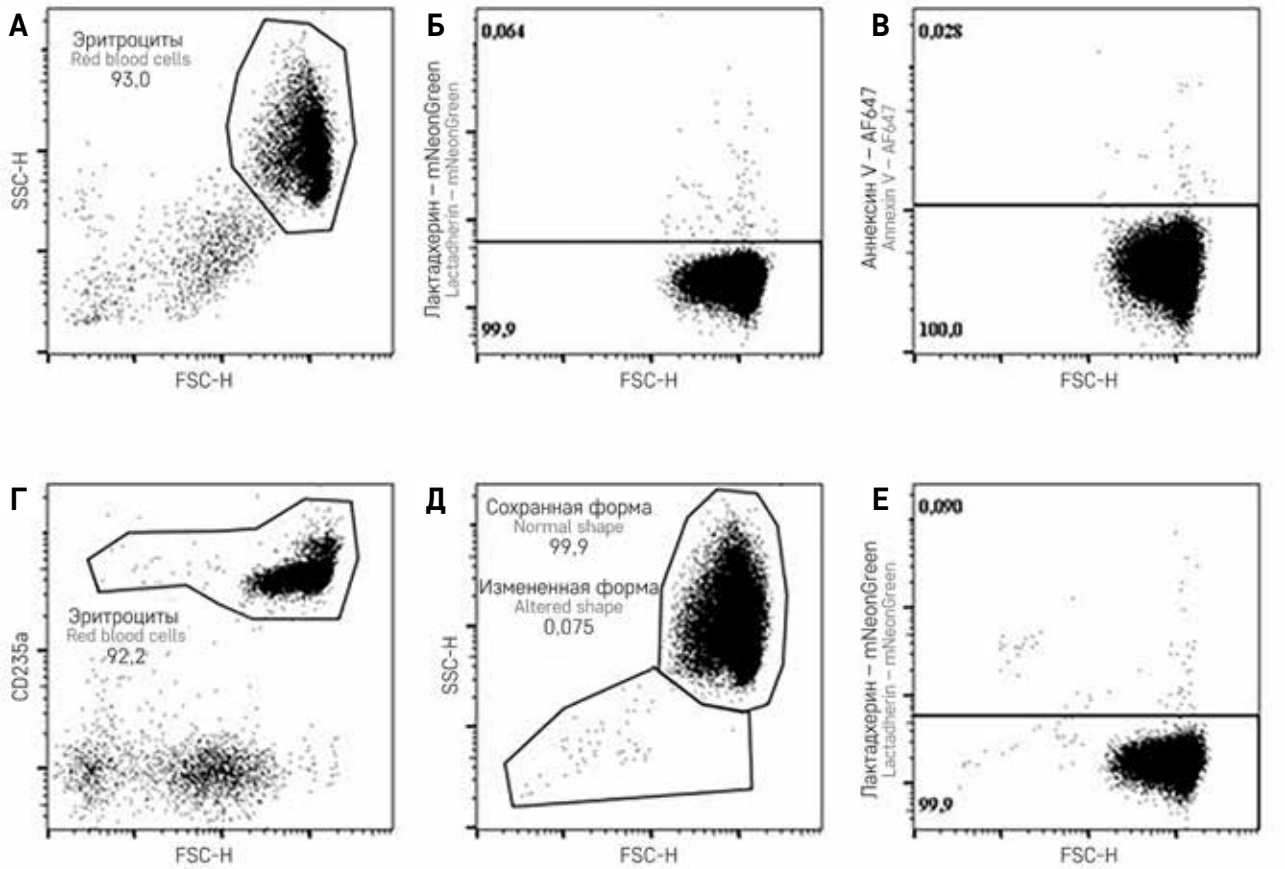
С учетом литературных данных об особенностях анализа эритроцитов в норме и в стадии эриптоза был разработан метод цитофлуориметрического исследования цельной крови с детекцией эриптотических клеток с использованием 2 разных маркеров фосфатидилсерина – лактадхерина и аннексина V. Несмотря на то, что традиционным маркером фосфатидилсерина является именно аннексин V, по литературным данным, лактадхерин – более чувствительный маркер [15], в связи с чем он был выбран в качестве возможной альтернативы. При использовании антител удалось выявить субпопуляцию с измененными параметрами FSC и SSC (*рисунок 1Д*), до половины данной субпопуляции связывает лактадхерин, что указывает на процессы клеточной смерти, которая сопровождается потерей дискоидной формы. Однако, учитывая малое число этих событий, их достоверный анализ затруднен.

Используя разработанную методику, мы проанализировали циркулирующие эритроциты крови здоровых доноров, выявили кратное увеличение доли фосфатидилсерин-положительных эритроцитов при использовании в качестве маркера фосфатидилсерина лактадхерин (*рисунок 2*). Данные группы при дисперсионном анализе достоверно отличались друг от друга. Что интересно, при анализе пост-хок выявилось лишь достоверное отличие ($p < 0,05$) группы лактадхерина от остальных, в то время как остальные группы не отличались друг от друга ($p > 0,05$).

При сравнительном анализе влияния антител на процент эриптотических эритроцитов была продемонстрирована зависимость изменения процента клеток, экспрессирующих фосфатидилсерин, от используемого маркера. Так, отличие, видимое при исполь-

Рисунок 1
Стратегия гейтирования эритроцитов и выделения регионов фосфатидилсерин-экспрессирующих субпопуляций
В качестве образца для анализа использовалась цельная кровь, разведенная в 1000 раз буфером Тироде. Сверху приведены гейты для региона эритроцитов по плоту FSC/SSC (А), для клеток внутри выделенного региона в целях определения доли фосфатидилсерин-экспрессирующих субпопуляций для лактадхерина (Б) и аннексина V (В). Снизу представлены гейты для региона эритроцитов по плоту FSC/CD235a (проба, окрашенная антителами к гликофорину А) (Г), для событий внутри этого региона в целях выделения клеток сохранной и измененной формы по данным плота FSC/SSC (Д), а также выделение фосфатидилсерин-экспрессирующей субпопуляции с использованием лактадхерина (Е)

Figure 1
A strategy for red blood cell gating and identification of regions of phosphatidylserine-expressing subpopulations
A sample of whole blood diluted a 1000 times in Tyrode's buffer was utilized. The upper row of images shows gates for a region of RBCs in the FSC/SSC plot (A), for cells within the selected region for determination of the proportion of phosphatidylserine-expressing subpopulations when using lactadherin (Б) or annexin V (B). The lower row of images shows gates for a region of RBCs in the FSC/CD235a plot (a sample stained with antibodies to glycophorin A) (Г), for events within this region for identification of cells of normal and altered shape as per the FSC/SSC plot data (Д) as well as for identification of a phosphatidylserine-expressing subpopulation using lactadherin (E)



зовании лактадхерина, оказалось статистически незначимым (p = 0,063) (*рисунок 3А*), в то время как при использовании в качестве маркера аннексина V выявлено достоверное увеличение процента в пробе с добавлением антител (p = 0,015) (*рисунок 3Б*). В качестве положительного контроля использовались эритроциты, обработанные ФМА. Как представлено на *рисунке 4*, оба маркера позволяют выявлять фосфатидилсерин-экспрессирующую субпопуляцию в условиях стимуляции эриптоза.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Применение методов проточной цитофлуориметрии для выявления эритроцитов в стадии эриптоза в цельной крови сопряжено с рядом трудностей. Описанные в литературе методы используют для детекции продолжительное (зачастую более суток) время предварительной инкубации *ex vivo*, относительно жесткие режимы центрифугирования, что усложняет интерпретацию данных [16].

Приведенный в данной работе протокол позволяет обойти вероятную проблему в детекции эриптоза – низкие количества экспрессируемого фосфатидилсерина на ранних стадиях за счет использования более чувствительного маркера [15]. Что еще более интересно, приведенные результаты показывают, что, по крайней мере, на малой выборке не продемонстрировано статистически значимого различия между процентом аннексин V-связывающих клеток в пробе и контроле. В то же время лактадхерин показывал достоверное отличие процента фосфа-

Рисунок 2
Процент эриптотических клеток в зависимости от используемого маркера фосфатидилсерина
Представлены диаграммы размаха с исходными данными результатов проточной цитофлуориметрии разведенной цельной крови с определением доли фосфатидилсерин-экспрессирующих клеток в регионе эритроцитов по данным плота FSC/SSC. Приведены результаты для лактадхерина, аннексина V и их парных контролей – mNeonGreen и аннексина V в присутствии ЭДТА (этилендиаминтетраацетат). Зафиксировано отличие в дисперсионном анализе, по результатам пост-хок теста Бонферрони доля клеток, окрашенных лактадхерином, достоверно отличалась от остальных методов окраски ($p < 0,05$). Результаты остальных методов достоверно не отличались друг от друга. Представлены данные для 6 здоровых доноров

Figure 1
The percentage of eryptotic cells according to the utilized phosphatidylserine marker
Box plots based on the initial results of flow cytometry of diluted whole blood with determination of the proportion of phosphatidylserine-expressing cells in the region of RBCs as per the FSC/SSC plot data. The graph demonstrates results for lactadherin, annexin V and their matched controls - mNeonGreen and annexin V with EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid). There were differences in the analysis of variance, and according to the results of a post-hoc Bonferroni test, the proportion of lactadherin-stained cells differed significantly from other staining methods ($p < 0.05$). The results of testing using other methods were not significantly different. The graph shows data for 6 healthy donors

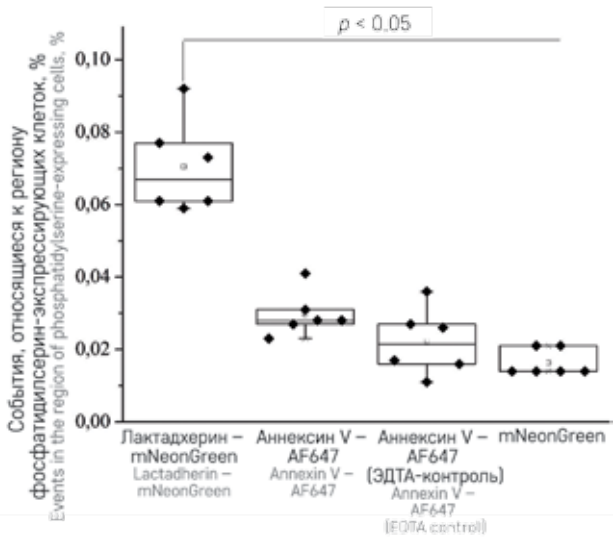
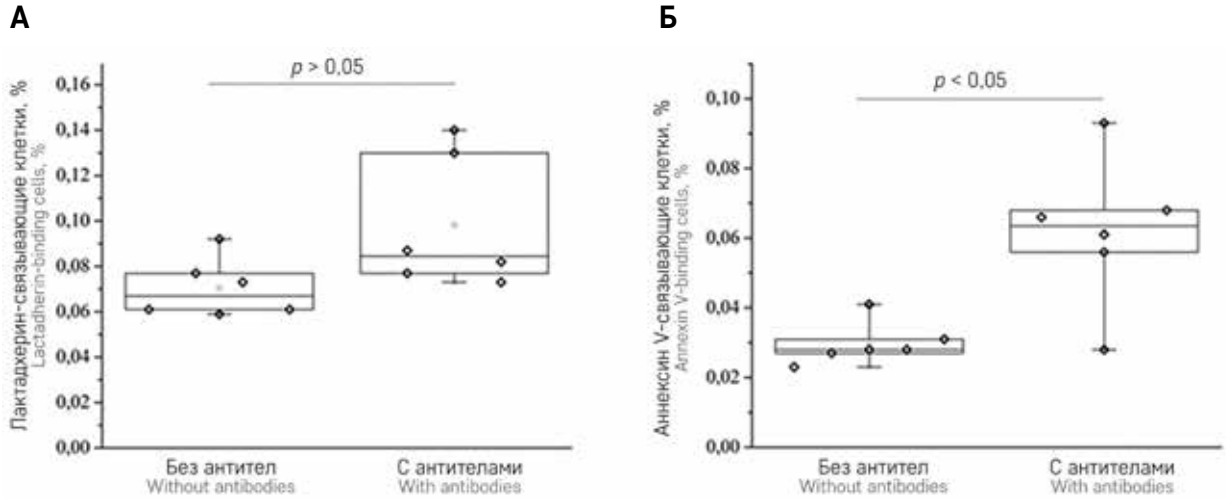


Рисунок 3
Изменение количества эриптотических клеток в зависимости от наличия антиэритроцитарных антител
А – представлены диаграммы размаха с исходными данными для доли лактадхерин-связывающих клеток в регионе эритроцитов для пробы с добавлением антител и без них. Статистически значимого различия при использовании критерия Манна–Уитни не выявлено ($p = 0,063$); Б – приведены аналогичные диаграммы размаха для аннексина V в качестве маркера фосфатидилсерина. Отмечен статистически достоверный прирост числа аннексин V-положительных событий при использовании антител ($p = 0,015$). Результаты приведены для 6 здоровых доноров

Figure 3
The number of eryptotic cells based on the presence/absence of anti-RBC antibodies
A – box plots with the initial data on the proportion of lactadherin-binding cells in the region of RBCs in a sample with/without antibodies. The Mann-Whitney U test did not reveal any significant differences ($p = 0.063$); Б – similar box plots for annexin V used as a phosphatidylserine marker. A significant rise in the number of annexin V-positive events was registered when using antibodies ($p = 0.015$). The graph shows data for 6 healthy donors

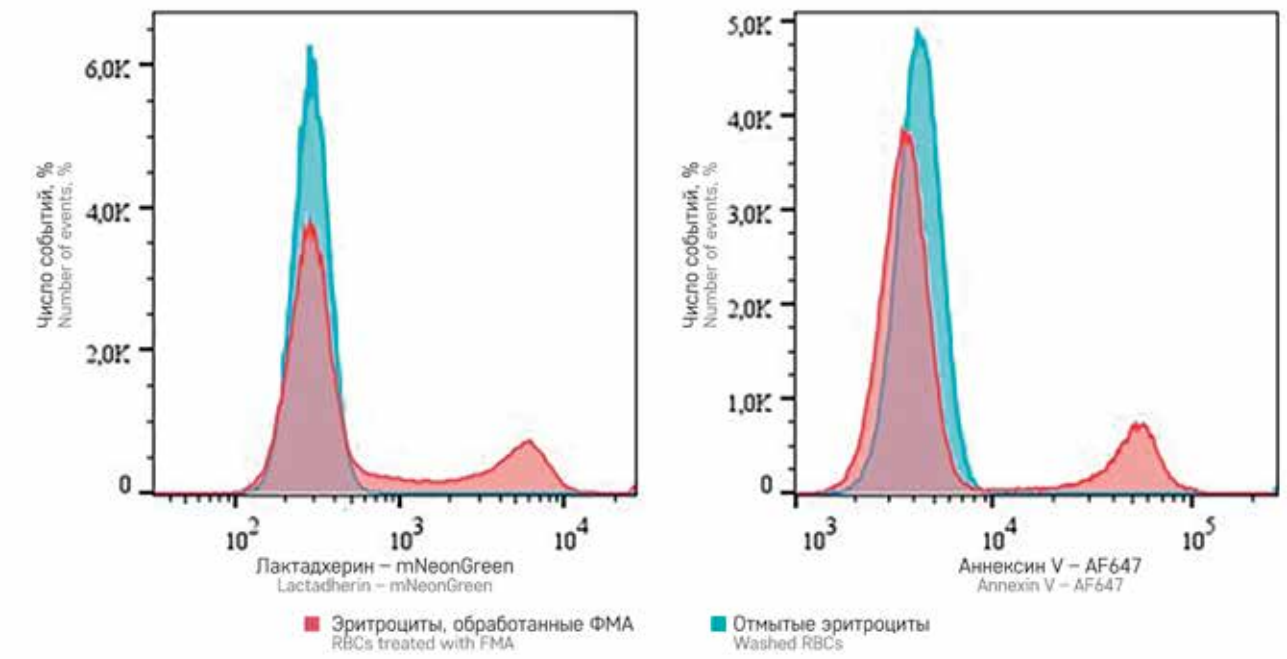


тидилсерин-положительных клеток в сравнении и с контролем, и с пробой с аннексином V.

Другим важным аспектом цитофлуориметрического анализа является использование антител. Однако антитела к эритроцитам известны своей способностью вызывать их агглютинацию и, возможно, повреждение, что также было подтверждено в данном исследовании для антител к гликофорину А (CD235a) [17]. Данное влияние было более заметно при использовании традиционного, менее чувствительного маркера фосфатидилсерина – аннексина V (*рисунок 3*). Таким образом, логичным выводом может стать мысль об ускорении процессов смерти эритроцитов в присутствии антител в первую

Рисунок 4
Связывание маркеров фосфатидилсерина интактными эритроцитами и эритроцитами, стимулированными ФМА
На гистограммах представлены результаты окраски маркерами фосфатидилсерина отмытых эритроцитов (голубой цвет) и эритроцитов, обработанных индуктором эриптоза ФМА (розовый цвет). На панели А представлены результаты окрашивания лактадхерином, на панели Б – аннексином V. Оба маркера позволяют выявлять субпопуляцию фосфатидилсерин-экспрессирующих событий

Figure 4
The binding of phosphatidylserine markers by intact and PMA-stimulated RBCs
The histograms show the results of staining with phosphatidylserine markers performed on washed red blood cells (blue) and red blood cells treated with an eryptosis inductor (PMA) (pink). Panel A demonstrates the results of staining with lactadherin, panel B - the results of staining with annexin V. Both markers can be used to detect a subpopulation of phosphatidylserine-expressing events



очередь для тех клеток, которые уже находятся «на грани». Это утверждение является гипотезой и требует дальнейших исследований.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе был разработан и апробирован новый протокол детекции эриптотических эритроцитов с использованием метода проточной цитофлуориметрии, который позволяет обнаруживать такие клетки в цельной крови здоровых доноров. Проведен сравнительный анализ 2 известных маркеров фосфатидилсерина – аннексина V и лактадхерина, в ходе которого продемонстрирована способность последнего к более точной детекции таких клеток. Важным методическим результатом данной работы является идея использования одновременно 2 маркеров фосфатидилсерина и необходимость наличия проб как с использованием антиэритроцитарных антител, так и без них, с учетом их влияния на эритроциты.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ
Работа поддержана грантом Российского научного фонда №23-75-10120.

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

ORCID
Chabin I.A. ORCID: https://orcid.org/0000-0003-0625-1743
Podoplelova N.A. ORCID: https://orcid.org/0000-0001-8013-1112
Koltsova E.M. ORCID: https://orcid.org/0000-0003-0167-6726
Butov K.R. ORCID: https://orcid.org/0000-0002-4664-6953
Obydennyi S.I. ORCID: https://orcid.org/0000-0002-2930-8768
Smetanina N.S. ORCID: https://orcid.org/0000-0003-2756-7325
Panteleev M.A. ORCID: https://orcid.org/0000-0002-8128-7757

Литература / References

1. Атауллаханов Ф.И., Борсакова Д.В., Протасов Е.С., Синауридзе Е.И., Зейналов А.М. Эритроцит: мешок с гемоглобином или живая, активная клетка? Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2018; 17 (1): 108–16. DOI: 10.24287/1726-1708-2018-17-1-108-116 [Ataullakhanov F.I., Borsakova D.V., Protasov E.S., Sinauridze E.I., Zeynalov A.M. Erythrocyte: a bag with hemoglobin, or a living active cell? Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology 2018; 17 (1): 108–16. (In Russ.)].
2. Piety N.Z., Reinhart W.H., Pourreau P.H., Abidi R., Shevkoplyas S.S. Shape matters: the effect of red blood cell shape on perfusion of an artificial microvascular network. Transfusion 2016; 56 (4): 844–51.
3. Franco R.S., Estela Puchulu-Campanella M., Barber L.A., Palascak M.B., Joiner C.H., Low P.S., Cohen R.M. Changes in the properties of normal human red blood cells during *in vivo* aging. Am J Hematol 2013; 88 (1): 44–51.
4. Fens M.H.A.M., Mastrobattista E., de Graaff A.M., Flesch F.M., Ultee A., Rasmussen J.T., et al. Angiogenic endothelium shows lactadherin-dependent phagocytosis of aged erythrocytes and apoptotic cells. Blood 2008; 111 (9): 4542–50.
5. Lee S.J., Park S.-Y., Jung M.-Y., Mun Bae S., Kim I.-S. Mechanism for phosphatidylserine-dependent erythrophagocytosis in mouse liver. Blood 2011; 117 (19): 5215–23.
6. Zahedpanah M., Azarkeivan A., Aghaieepour M., Nikogoftar M., Ahmadinegad M., Hajibeigi B., et al. Erythrocytic phosphatidylserine exposure and hemostatic alterations in β-thalassemia intermediate patients. Hematology 2014; 19 (8): 472–6.
7. Alamin A.A. The Role of Red Blood Cells in Hemostasis. Semin Thromb Hemost 2021; 47 (1): 26–31.
8. Weisel J.W., Litvinov R.I. Red blood cells: the forgotten player in hemostasis and thrombosis. J Thromb Haemost 2019; 17 (2): 271–82.
9. Byrnes J.R., Wolberg A.S. Red blood cells in thrombosis. Blood 2017; 130 (16): 1795–9.
10. Lang K.S., Lang P.A., Bauer C., Duranton C., Wieder T., Huber S.M., Lang F. Mechanisms of suicidal erythrocyte death. Cell Physiol Biochem 2005; 15 (5): 195–202.
11. Leal J.K.F., Adjobo-Hermans M.J.W., Bosman G.J.C.G.M. Red blood cell homeostasis: Mechanisms and effects of microvesicle generation in health and disease. Front Physiol 2018; 9: 703.
12. Morel O., Jesel L., Freyssinet J.-M., Toti F. Cellular mechanisms underlying the formation of circulating microparticles. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2011; 31 (1): 15–26.
13. Koltsova E., Avilova A., Nikolaeva E., Kolchin N., Butov K. Engineered fluorescent variants of lactadherin C2 Domain for phosphatidylserine detection in flow cytometry. Biomolecules 2025; 15: 673.
14. Nguyen D.B., Wagner-Britz L., Maia S., Steffen P., Wagner C., Kaestner L., Bernhardt I. Regulation of phosphatidylserine exposure in red blood cells. Cell Physiol Biochem 2011; 28 (5): 847–56.
15. Shi J., Shi Y., Waehrens L.N., Rasmussen J.T., Heegaard C.W., Gilbert G.E. Lactadherin detects early phosphatidylserine exposure on immortalized leukemia cells undergoing programmed cell death. Cytometry A 2006; 69 (12): 1193–201.
16. Jemaà M., Fezai M., Bissinger R., Lang F. Methods employed in cytofluorometric assessment of eryptosis, the suicidal erythrocyte death. Cell Physiol Biochem 2017; 43 (2): 431–44.
17. Sutherland D.R., Keeney M., Illingworth A. Practical guidelines for the high-sensitivity detection and monitoring of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clones by flow cytometry. Cytometry B Clin Cytom 2012; 82B (4): 195–208.

DOI: 10.24287/1726-1708-2025-24-2-111-115

Тяжелая гиперхолестеринемия на фоне холестатической формы острой реакции «трансплантат против хозяина» с поражением печени у ребенка после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток

© 2025 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России

Поступила 24.04.2025
Принята к печати 21.05.2025

EDN: RKQVDW

А.Д. Шутова, С.К. Аракелян, Э.И. Людовских, Е.И. Гутовская, А.П. Васильева, С.Н. Козловская, И.П. Шипицына, Ю.В. Скворцова, Д.Н. Балашов

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

Гиперхолестеринемия является одним из осложнений аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток. В ее этиологии могут играть роль различные факторы, в том числе реакция «трансплантат против хозяина» (РТПХ) с поражением печени. В статье представлен клинический случай тяжелой гиперхолестеринемии на фоне острой РТПХ с поражением печени у пациента с синдромом Ниймеген. Родители пациента дали согласие на использование информации, в том числе фотографий ребенка, в научных исследованиях и публикациях. При исследовании соотношения липидных фракций с помощью электрофореза периферической крови с их последующим типированием был верифицирован высокий уровень липопротеина X. Данный лабораторный феномен является характерным проявлением при нарушении липидного обмена, ассоциированного с холестазом, сопровождающим печеночную форму РТПХ. Клиническое улучшение и снижение уровня холестерина достигнуто после интенсификации иммуносупрессивной терапии. Представленный клинический случай актуализирует необходимость своевременного выявления и дифференцированной оценки тяжелой гиперхолестеринемии у пациентов после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток.

Ключевые слова: *гиперхолестеринемия, трансплантация гемопоэтических стволовых клеток, реакция «трансплантат против хозяина», гепатит, холестаз, липопротеин X, дислипидемия*

Шутова А.Д. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2025; 24 (2): 111–5.
DOI: 10.24287/1726-1708-2025-24-2-111-115

Контактная информация:
Шутова Александра Дмитриевна, врач-гематолог отделения трансплантации гемопоэтических стволовых клеток №2 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России
Адрес: 117997, Москва, ул. Саморы Машела, 1
E-mail: alexandra.shutova@dgoi.ru

Severe hypercholesterolemia due to the cholestatic form of acute graft-versus-host disease with liver damage in a child following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation

© 2025 by «D. Rogachev NMRCPHOI»

Received 24.04.2025
Accepted 21.05.2025

A.D. Shutova, S.K. Arakelyan, E.I. Lyudovskikh, E.I. Gutovskaya, A.P. Vasilieva, S.N. Kozlovskaya, I.P. Shipitsyna, 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

Hypercholesterolemia is one of the complications of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Various factors may contribute to its etiology, including graft-versus-host disease (GVHD) of the liver. This publication presents a clinical case of severe hypercholesterolemia associated with acute GVHD with the liver involvement in a patient with Nijmegen syndrome. The patient's parents gave their consent to the use of their child's data, including photographs, for research purposes and in publications. A high level of lipoprotein X was detected by peripheral blood electrophoresis and subsequent typing. This laboratory phenomenon is a characteristic manifestation of dyslipidaemia associated with cholestasis accompanying the hepatic form of GVHD. Clinical improvement and a reduction of cholesterol levels were achieved after intensification of immunosuppressive therapy. This clinical case highlights the necessity for early recognition and differential assessment of severe hypercholesterolemia in patients following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation.

Key words: *hypercholesterolemia, hematopoietic stem cell transplantation, graft-versus-host disease, hepatitis, cholestasis, lipoprotein X, dyslipidemia*

Shutova A.D., et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology 2025; 24 (2): 111–5.
DOI: 10.24287/1726-1708-2025-24-2-111-115

Correspondence:
Alexandra D. Shutova, a hematologist at the Department of Hematopoietic Stem Cell Transplantation No.2 at 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: alexandra.shutova@dgoi.ru

Дислипидемия – одно из осложнений аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК). К хорошо известным факторам, способствующим такого рода нарушениям, относятся иммуносупрессивная терапия, эндокринные нарушения, а также поражение печени различной этиологии. На настоящий момент имеется ограниченное количество опубликованных данных о развитии дислипидемии на ранних сроках после аллогенной ТГСК и подходах к терапии данного

осложнения. По результатам ретроспективного анализа, куда был включен 761 взрослый пациент, перенесший аллогенную ТГСК в Институте онкологии Дана-Фарбер с 1998 по 2008 г., частота гиперхолестеринемии и гипертриглицеридемии в первые два года после трансплантации составила 73,4% и 72,5% соответственно, из них 32,0% имели гиперхолестеринемию до трансплантации [1]. Такое широкое распространение гиперхолестеринемии у взрослых, вероятнее всего, связано с алиментарными факторами.

В настоящее время имеется ограниченное количество публикаций, посвященных нарушениям липидного обмена у детей, в особенности после аллогенной ТГСК. Значительное повышение уровня общего холестерола (выше 25 ммоль/л) в этой группе встречается редко и требует исключения наследственных нарушений обмена липидов, заболеваний печени, сопровождающихся выраженным холестазом, что часто ассоциировано с образованием аномальных фракций липопротеинов [2].

К причинам развития гиперхолестеринемии после аллогенной ТГСК относят нарушение диеты с преобладанием жиров в рационе, токсические эффекты иммуносупрессивной терапии, в частности рапамицина [3], циклоспорина [4], такролимуса [5], глюкокортикостероидов [6], а также поражение печени на фоне течения реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ) [7, 8] и тяжелого вторичного гипотиреоза [9]. Ряд исследований демонстрируют данные о значительном нарастании уровня холестерина при холестатической форме РТПХ с поражением печени, возникающим вследствие снижения выведения холестерола и желчных кислот, что, в свою очередь, приводит к образованию липопротеина X (Лп-X) [10–13]. Данная фракция представляет собой аномальный подкласс липопротеинов низкой плотности (ЛПНП), для которого характерны высокое содержание неэтерифицированного холестерина и фосфолипидов и низкое содержание белка, триглицеридов, эфиров холестерина. Большую часть белковой фракции Лп-X составляет альбумин, также особенностью, отличающей Лп-X от других фракций ЛПНП, является отсутствие аполипопротеина B (апо-B), что обеспечивает длительную циркуляцию в кровотоке. В основе патогенеза образования Лп-X лежат нарушение оттока желчи при холестазе, обратное всасывание липидных фракций из желчи в плазму, где они связываются с альбумином, образуя аномальный Лп-X. Дальнейший метаболизм Лп-X осуществляется через ретикулоэндотелиальную систему и почечный клиренс [14].

Накопление Лп-X приводит к тяжелой гиперхолестеринемии, но это не сопровождается увеличением риска развития сердечно-сосудистых событий и атеросклероза [15, 16]. Одним из потенциальных механизмов снижения атерогенности ЛПНП при ЛпX-гиперхолестеринемии являются предотвращение их окисления и защита клеток эндотелия от повреждения [17]. Основными осложнениями при этом остаются развитие ксантом, а также нарушение реологических свойств крови, что может приводить к тромботическим осложнениям [14].

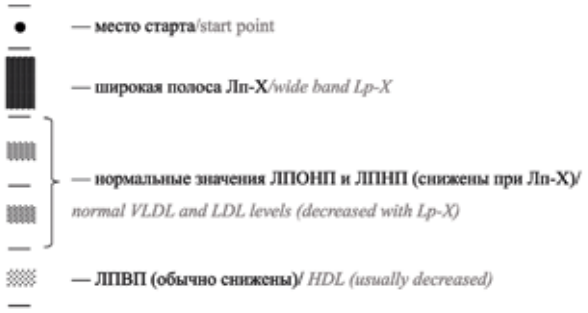
Для диагностики наличия Лп-X используется электрофорез липидных фракций в агарозном геле, при котором фракция Лп-X отличается от всех других фракций липопротеинов за счет отсутствия мицеллярной структуры и апо-B в своем составе (*рисунок*) [14, 18].

Также следует отметить, что лабораторно может отмечаться псевдогипонатриемия, ассоциированная с гиперхолестеринемией [10, 12].

Основными подходами в лечении гиперхолестеринемии, ассоциированной с холестазом, является терапия, направленная на его разрешение, а также соблюдение диеты с низким содержанием жиров. При развитии жизнеугрожающих состояний, таких как синдром гипервязкости и тромбоэмболия легочной артерии, проводятся эфферентные методы лечения, например экстракорпоральный аферез липидов [2, 9, 19]. В качестве дополнительных опций может быть рассмотрено применение урсодезоксихолиевой кислоты и фенофибрата [20] и полиненасыщенных жирных кислот [21]. Терапия, традиционно применяющаяся при гиперхолестеринемии, такая как назначение ингибиторов гидроксиметилглутарил-кофермента А-редуктазы (статинов), в данном случае является неэффективной в связи с тем, что Лп-X не подвергается печеночному клиренсу, опосредованному рецепторами ЛПНП, в связи с отсутствием апо-B в своей структуре [22]. Важно отметить, что в описанных ранее клинических случаях терапия

Рисунок
Электрофорез липидных фракций при гиперхолестеринемии, ассоциированной с образованием Лп-X (принципиальная схема)
ЛПОНП – липопротеины очень низкой плотности; ЛПВП – липопротеины высокой плотности

Figure
Electrophoresis of lipid fractions in hypercholesterolemia associated with the formation of lipoprotein X (Lp-X) (schematic diagram)
VLDLs – very-low-density lipoproteins; LDLs – low-density lipoproteins; HDLs – high-density lipoproteins



статинами была неэффективна при применении препаратов у данной когорты пациентов, что ставит под сомнение целесообразность такого лечения. Применение эзетимиба также было неэффективно, поскольку его действие основано на снижении всасывания холестерина в кишечнике, что вносит минимальный вклад в патогенез развития гиперхолестеринемии [22].

Таким образом, тяжелая гиперхолестеринемия на фоне холестатической формы острой РТПХ с поражением печени является достаточно редким посттрансплантационным осложнением, особенно в детской популяции. До настоящего момента было опубликовано всего 2 случая гиперхолестеринемии, ассоциированной с поражением печени при РТПХ у детей [12, 23].

Клинический случай

Мальчик Ш., 9 лет, в возрасте 2,5 лет установлен диагноз: Т-лимфобластная лимфома с поражением лимфатических узлов шеи, средостения, подмышечной области, правой почки, костного мозга, IV стадия. Родители пациента дали согласие на использование информации, в том числе фотографий ребенка, в научных исследованиях и публикациях.

Проводилась специфическая терапия по протоколу BFM-90, на фоне чего достигнута полная ремиссия.

Учитывая фенотипические изменения, характерные для синдромов нарушения репарации ДНК («птичьи» черты лица, микроцефалия, гипоплазия нижней челюсти, гипостатурное телосложение), в возрасте 7 лет ребенку было выполнено генетическое исследование. В результате выявлена мутация в гене *NBN* c.657_661delACAAA, p.Lys219AsnfsTer16 в гомозиготном состоянии, на основании чего был установлен диагноз: первичный иммунодефицит – синдром Ниймеген, который стал основанием для проведения ТГСК в возрасте 9 лет от неродственного полностью совместимого донора (HLA 10/10).

Перед аллогенной ТГСК проведено стандартное кондиционирование согласно используемому в клинике протоколу: флударабин 150 мг/м^2, треосульфан 21 г/м^2, тимоглобулин 5 мг/кг, ритуксимаб 375 мг/м^2. В качестве профилактики РТПХ были использованы циклофосфамид 25 мг/кг/сут на +3-й, +4-й дни, руксолитиниб 8 мг/м2 с +5-го дня.

Приживление мегакариоцитарного ростка зафиксировано на +12-й день, лейкоцитарного ростка – на +17-й день.

С +21-го дня зафиксировано нарастание уровня аланинаминотрансферазы до 1454 Ед/л, аспартаминотрансферазы до 1051 Ед/л, гамма-глутамилтрансферазы до 355 Ед/л, лактатдегидрогеназы до 532 Ед/л, затем отмечался энтероколит (стул объемом 4 л/сут). Данные проявления расценены как течение острой РТПХ III стадии с поражением печени и интестинального тракта. Несмотря на терапию метилпреднизолоном в дозе 2 мг/кг, отмечалась разнонаправленная динамика: снижение уровня печеночных трансаминаз и прирост уровня билирубина преимущественно за счет прямой фракции (общий билирубин 143 мкмоль/л, прямой – 104 мкмоль/л), течение энтероколита сохранялось в прежнем объеме.

Проводилась иммуносупрессивная терапия в следующем объеме: метилпреднизолон, этанерцепт, циклоспорин (позднее заменен на рапамицин), ведолизумаб, будесонид, экстракорпоральный фотоферез.

Несмотря на положительную динамику в течении энтероколита, не отмечалось выраженного ответа со стороны маркеров поражения печени.

При контрольном обследовании на +60-е сутки выявлена гиперхолестеринемия до 30,5 ммоль/л с последующим нарастанием до 41 ммоль/л, при этом ЛПНП 11,66 ммоль/л, ЛПВП 0,23 ммоль/л, а уровень триглицеридов не превышал референсные значения. Кроме того, отмечалось снижение уровня натрия в сыворотке крови до 127 ммоль/л, требующее коррекции.

При проведении дифференциально-диагностических мероприятий было подтверждено, что ранее уровень холестерина у пациента всегда соответствовал возрастным нормам, также не было получено данных о наследственной и вторичной (повышенный катаболизм на фоне анорексии, глубокий вторичный гипотиреоз) гиперхолестеринемии. В связи с невозможностью исключения токсических эффектов фармакотерапии произведена отмена всех потенциально гепатотоксичных препаратов, включая руксолитиниб и рапамицин, однако положительной динамики не получено.

В качестве следующего этапа лабораторной диагностики проведен электрофорез липидов с их последующим типированием. В результате получены данные о наличии у пациента Лп-Х, что в сочетании с холестатическими маркерами, и учитывая опубликованные данные, коррелирует с проявлениями и тяжестью РТПХ с поражением печени после аллогенной ТГСК. На основании полученных результатов и сделанных выводов было принято решение об эскалации иммуносупрессивной терапии за счет назначения руксолитиниба (13 мг/м^2 перорально ежедневно) и циклофосфамида (200 мг/м^2 внутривенно 1 раз/нед, №3). В результате проводимой терапии зарегистрирована положительная динамика – снижение общего билирубина до 26 мкмоль/л (прямая фракция 13 мкмоль/л) и холестерина до

11,3 ммоль/л, а также нормализация уровня натрия в крови.

В настоящее время на сроке 5 мес после ТГСК пациент разрешил острую РТПХ, остается на базисной терапии руксолитинибом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Гиперхолестеринемия в раннем посттрансплантационном периоде у детей остается малоизученным и недооцененным осложнением, особенно в контексте острой РТПХ с поражением печени. Представленный случай демонстрирует крайне редкий пример гиперхолестеринемии, ассоциированной с образованием Лп-Х, у ребенка после аллогенной ТГСК. В литературе описано ограниченное количество подобных наблюдений в педиатрической популяции, что делает данный случай ценным с точки зрения полученного опыта, отработки алгоритма диагностики и подходов к терапии.

Важно отличать Лп-Х-гиперхолестеринемию от иных гиперхолестеринемий, связанных с метаболическим синдромом или наследственными дислипидемиями, так как терапевтическая тактика в этих ситуациях принципиально различается. Еще раз следует подчеркнуть, что развитие холестатической формы РТПХ может приводить к обратному транспорту липидов и формированию Лп-Х, обладающего уникальными метаболическими свойствами, включая устойчивость к печеночному клиренсу и относительную неатерогенность [14, 15].

Подтверждение наличия Лп-Х, а также отсутствие ответа на отмену потенциально гепатотоксичной терапии и сохранение гиперхолестеринемии на фоне активной острой РТПХ с поражением печени стало важным дополнительным аргументом для трактовки причин дислипидемии в данном случае.

Кроме того, выявленная у пациента гипонатриемия, вероятно, имела псевдогипонатриемический генез, что также описано в литературе как лабораторный феномен при Лп-Х-гиперхолестеринемии [10, 12]. В данном случае гипонатриемия успешно разрешилась параллельно с нормализацией липидного профиля после купирования холестаза. Это дополнительно подчеркивает необходимость комплексного анализа клинико-лабораторных данных у пациентов с подобными нарушениями.

Важно отметить, что стандартная гиполипидемическая терапия (статины, эзетимиб) в таких ситуациях неэффективна, что определяет необходимость дифференцированного подхода к лечению, которое в первую очередь должно быть направлено на устранение причин дислипидемии, т. е. холестаза и аллоиммунного поражения печени, что и было реализовано в описанном случае путем эскалации иммуносупрессивной терапии. Отсутствие атерогенного эффекта при образовании Лп-Х также не является поводом для применения радикальных методов терапии, в частности плазмафереза или сорбции липидов.

Таким образом, данное наблюдение расширяет представления о спектре осложнений после ТГСК и подчеркивает необходимость включения Лп-Х в дифференциальную диагностику тяжелой гиперхолестеринемии, особенно при сопутствующем холестазе. В условиях педиатрической трансплантационной практики это приобретает особую актуальность ввиду ограниченности данных и потенциально тяжелых последствий.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ
Не указан.

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

ORCID
Shutova A.D. https://orcid.org/0000-0003-1814-6772
Arakelyan S.K. ORCID: https://orcid.org/0009-0005-7866-7256
Lyudovskikh E.I. ORCID: https://orcid.org/0000-0003-0717-2019
Gutovskaya E.I. ORCID: https://orcid.org/0000-0002-3800-8927
Vasilieva A.P. ORCID: https://orcid.org/0000-0003-3949-248X
Kozlovskaya S.N. ORCID: https://orcid.org/0000-0002-1754-1220
Shipitsyna I.P. ORCID: https://orcid.org/0000-0001-8687-5497
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. Blaser B.W., Kim H.T., Alyea E.P., Ho V.T., Cutler C., Armand P., et al. Hyperlipidemia and statin use after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Biol Blood Marrow Transplant 2012; 18 (4): 575–83.
2. Fellin R., Manzato E. Lipoprotein-X fifty years after its original discovery. Nutr Metab Cardiovasc Dis 2019; 29 (1): 4–8.
3. Couriel D.R., Saliba R., Escalón M.P., Hsu Y., Ghosh S., Ippoliti C., et al. Sirolimus in combination with tacrolimus and corticosteroids for the treatment of resistant chronic graft-versus-host disease. Br J Haematol 2005; 130 (3): 409–17.
4. Ballantyne C.M., Podet E.J., Patsch W.P., Harati Y., Appel V., Gotto A.M., et al. Effects of cyclosporine therapy on plasma lipoprotein levels. JAMA 1989; 262 (1): 53–6.
5. Hiraoka A., Ohashi Y., Okamoto S., Moriyama Y., Nagao T., Kodera Y., et al. Phase III study comparing tacroli-

mus (FK506) with cyclosporine for graft-versus-host disease prophylaxis after allogeneic bone marrow transplantation. Bone Marrow Transplant 2001; 28 (2): 181–5.
6. Macfarlane D.P., Forbes S., Walker B.R. Glucocorticoids and fatty acid metabolism in humans: fuelling fat redistribution in the metabolic syndrome. J Endocrinol 2008; 197 (2): 189–204.
7. Lu Y., Yuan D., Pan J., Fang X., Ding M., Lu K., et al. Dyslipidemia in the first 100 days and the association with acute graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation: a single-center retrospective study in China. Transpl Immunol 2023; 78: 101829.
8. Griffith M.L., Savani B.N., Boord J.B. Dyslipidemia after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: evaluation and management. Blood 2010; 116 (8): 1197–204.
9. Pearce E.N. Hypothyroidism and dyslipidemia: Modern concepts and approaches. Curr Cardiol Rep 2004; 6 (6): 451–6.
10. Turchin A., Wiebe D.A., Seely E.W., Graham T., Longo W., Soiffer R. Severe hypercholesterolemia mediated by lipoprotein X in patients with chronic graft-versus-host disease of the liver. Bone Marrow Transplant 2005; 35 (1): 85–9.
11. Inamoto Y., Teramoto T., Shirai K., Tsukamoto H., Sanda T., Miyamura K., et al. Severe hypercholesterolemia associated with decreased hepatic triglyceride lipase activity and pseudohyponatremia in patients after allogeneic stem cell transplantation. Int J Hematol 2005; 82 (4): 362–6.
12. Coakley J.C., Vervaart P.P., McKay M.R.G. Factitious hyponatremia in a patient with cholestatic jaundice following bone marrow transplantation. Pathology 1986; 18 (1): 158–9.
13. Joukhadar R., Chiu K. Severe hypercholesterolemia in patients with graft-vs-host disease affecting the liver after stem cell transplantation. Endocr Pract 2012; 18 (1): 90–7.
14. Kattah L., Gómez A., Gutiérrez S., Puerto K., Moreno-Pallares E.D., Jaramillo A., et al. Hypercholesterolemia due to lipoprotein X: Case report and thematic review. Clin Med Insights Endocrinol Diabetes 2019; 12: 1179551419878687.
15. Loaeza-del Castillo A.M., Gaytán-Santillán A., López-Tello A., Merit M.V.A., Milke-García M del P., Flores-Rodríguez J., et al. Patterns of serum lipids derangements and cardiovascular risk assessment in patients with primary biliary cholangitis. Ann Hepatol 2019; 18 (6): 879–82.
16. Solaymani-Dodaran M., Aithal G.P., Card T., West J. Risk of cardiovascular and cerebrovascular events in primary biliary cirrhosis: a population-based cohort study. Am J Gastroenterol 2008; 103 (11): 2784–8.
17. Chang P.Y., Lu S.C., Su T.C., Chou S.F., Huang W.H., Morrisett J.D., et al. Lipoprotein-X reduces LDL atherogenicity in primary biliary cirrhosis by preventing LDL oxidation. J Lipid Res 2004; 45 (11): 2116–22.
18. Ćwiklińska A., Mickiewicz A., Kowalski R., Kortas-Stempak B., Kuchta A., Mucha K., et al. Detection of Lipoprotein X (LpX): A challenge in patients with severe hypercholesterolaemia. J Med Biochem 2020; 39 (3): 283–9.
19. Wong M.L., Raghavan R.P., Hedger N.A., Ellis R.D., Meeking D.R., Albon L. The use of plasmapheresis in managing primary biliary cirrhosis presenting with profound hypercholesterolaemia. Br J Diabetes Vasc Dis 2012; 12 (3): 156–8.
20. Liberopoulos E.N., Florentin M., Elisaf M.S., Mikhailidis D.P., Tsianos E. Fenofibrate in primary biliary cirrhosis: a pilot study. Open Cardiovasc Med J 2010; 4 (1): 120–6.
21. Calder P.C. n–3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. Am J Clin Nutr 2006; 83 (6): 1505S–19S.
22. Nemes K., Åberg F., Gylling H., Isoniemi H. Cholesterol metabolism in cholestatic liver disease and liver transplantation: From molecular mechanisms to clinical implications. World J Hepatol 2016; 8 (22): 924.
23. Zidan H., Lo S., Wiebe D., Talano J., Alemzadeh R. Severe hypercholesterolemia mediated by lipoprotein X in a pediatric patient with chronic graft-versus-host disease of the liver. Pediatr Blood Cancer 2008; 50 (6): 1280–1.

DOI: 10.24287/1726-1708-2025-24-2-116-122

© 2025 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России

Поступила 20.05.2025
Принята к печати 20.06.2025

EDN: RXCTIK

Диссеминированная саркома Капоши у ребенка после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток

М.А. Лемешев, А.П. Васильева, С.А. Радыгина, Д.С. Абрамов, Л.А. Хачатрян, З.А. Абашидзе, С.Н. Козловская, Ю.В. Скворцова, Д.Н. Балашов, А.А. Масчан

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

Контактная информация:
Лемешев Михаил Алексеевич,
врач-детский онколог стационара кратковременного лечения
ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России
Адрес: 117997, Москва, ул. Саморы Машела, 1
E-mail: mikhail.lemeshev@dgoi.ru

Саркома Капоши (СК) – редкое осложнение после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК). В работе описан случай диссеминированной СК у ребенка после гаплоидентичной ТГСК, развившейся на фоне вторичной иммуносупрессии. Лечение липосомальным доксорубицином привело к полному метаболическому ответу. Этот случай подчеркивает важность ранней диагностики и включения СК в дифференциальный ряд кожных и системных проявлений у пациентов после ТГСК. Родители пациента дали согласие на использование информации, в том числе фотографий ребенка, в научных исследованиях и публикациях.

Ключевые слова: *саркома Капоши, HHV-8, трансплантация гемопоэтических стволовых клеток, липосомальный доксорубицин, иммуносупрессия, педиатрия*

Лемешев М.А. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2025; 24 (2): 116–22. DOI: 10.24287/1726-1708-2025-24-2-116-122

© 2025 by «D. Rogachev NMRCPHOI»

Received 20.05.2025
Accepted 20.06.2025

Disseminated Kaposi's sarcoma in a child treated with allogeneic hematopoietic stem cell transplantation

M.A. Lemeshev, A.P. Vasilieva, S.A. Radygina, D.S. Abramov, L.A. Khachatryan, Z.A. Abashidze, S.N. Kozlovskaya, Yu.V. Skvortsova, D.N. Balashov, A.A. Maschan

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

Correspondence:
Mikhail A. Lemeshev,
an oncologist at the Short-Term Treatment Facility 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: mikhail.lemeshev@dgoi.ru

Kaposi's sarcoma (KS) is a rare complication of hematopoietic stem cell transplantation (HSCT). Here, we report a case of disseminated KS in a pediatric patient after haploidentical HSCT that developed during secondary immunosuppression. Treatment with liposomal doxorubicin resulted in a complete metabolic response. This case highlights the importance of early diagnosis and stresses the need to consider KS in the differential diagnosis of cutaneous and systemic manifestations in patients following HSCT. The patient's parents gave consent to the use of their child's data, including photographs, for research purposes and in publications.

Key words: *Kaposi's sarcoma, HHV-8, hematopoietic stem cell transplantation, liposomal doxorubicin, immunosuppression, pediatrics*

Lemeshev M.A., et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology 2025; 24 (2): 116–22. DOI: 10.24287/1726-1708-2025-24-2-116-122

Саркома Капоши (СК) – редкая злокачественная низкодифференцированная опухоль, впервые была описана в 1871 г., однако особое внимание она привлекла в начале 1980-х годов как одно из первых проявлений синдрома приобретенного иммунодефицита (СПИД). В 1994 г. в клетках СК был выявлен онкогенный ДНК-содержащий вирус – вирус герпеса человека 8-го типа (HHV-8, KSHV) [1, 2]. Согласно актуальной классификации опухолей Всемирной организации здравоохранения СК относится к опухолям сосудистого генеза [3].

Помимо классической (спорадической) и эндемической (африканской) СК также выделяют 2 формы заболевания, связанные с иммунодефицитом: эпидемическая СК, или связанная со СПИД, а также ятрогенная СК, развивающаяся после трансплантации солидных органов или гемопоэтических стволовых клеток на фоне проводимой иммуносупрессивной терапии (ИСТ) [1]. СК после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) встречается реже, чем после трансплантации солидного органа, возможно, за счет проводимых интенсивных режимов кондиционирования, приводящих к деплеции инфицированных HHV-8 лимфоидных клеток реципиента, снижая риск реактивации и последующей диссеминации [4].

В литературе имеется ограниченное количество публикаций на тему СК после ТГСК, при этом большинство из них – отдельные клинические наблюдения. В данной работе мы описываем развитие диссеминированной формы СК у ребенка после аллогенной ТГСК с ответом на проводимую терапию липосомальным доксорубицином. Родители пациента дали согласие на использование информации, в том числе фотографий ребенка, в научных исследованиях и публикациях.

КЛИНИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ

Пациенту мужского пола в возрасте 8 лет был установлен диагноз «острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ), иммуновариант B-II, статус центральной нервной системы (ЦНС) I». Ребенок получал терапию по протоколу ALL-MB 2015 для группы А [5]. Через полтора года после окончания поддерживающей терапии диагностирован первый поздний изолированный костномозговой рецидив заболевания, по поводу которого проводилась терапия согласно протоколу ALL-REZ-MB 2016 [6], и достигнута клинико-гематологическая MRD (minimal residual disease, минимальная остаточная болезнь)-позитивная ремиссия, MRD-негативная ремиссия зафиксирована после курса блинатумомаба.

Следующим этапом пациенту проведена аллогенная ТГСК от гаплоидентичного донора (отца). Режим кондиционирования состоял из тотального облучения тела (ТОТ) в суммарной дозе 12 Гр, циклофосфамида 50 мг/кг/сут, флударабина 150 мг/м^2. В качестве источника гемопоэтических стволовых клеток использовался костный мозг. Клеточность трансплантата: NC – 6,390 × 10^8/кг, CD34$^+$ – 6,070 × 10^6/кг, CD3$^+$ – 46,440 × 10^6/кг.

Режим профилактики реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ) включал циклофосфамид 50 мг/кг/сут на +3-и и +4-е сутки, циклоспорин 1 мг/кг/сут, ведолизумаб 10 мг/кг/сут №2, абатацепт 10 мг/кг №2. Приживление нейтрофильного ростка трансплантата зарегистрировано на +26-й день, тромбоцитарного – на +20-й день.

В рамках контрольного обследования на +30-е и +100-е сутки подтверждена MRD-негативная ремиссия ОЛЛ. Функция трансплантата оставалась удовлетворительной. В дальнейшем пациент в стабильном соматическом статусе продолжал проводимую сопроводительную терапию по месту жительства.

Через 6 мес после ТГСК пациент был госпитализирован в НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева в связи с длительным фебрилитетом и быстрым прогрессированием выявленных по месту жительства симптомов: подкожных гранулем с геморрагическим пропитыванием, гингивита с гиперплазией десен, стоматита (*рисунок 1*). По данным исследования клеточных и гуморальных факторов иммунитета сохранялся вторичный иммунодефицит с начальными признаками иммунореконституции (CD3$^+$ – 0,865 × 10^9/л, CD4$^+$ – 0,088 × 10^9/л и CD8$^+$ – 0,753 × 10^9/л).

Пациенту выполнена биопсия патологических элементов на теле. При гистологическом исследовании морфологическая картина соответствовала СК (*рисунок 2*). При иммуногистохимическом исследовании выявлены ядерная гранулярная экспрессия HHV-8, экспрессия ERG, Fli1, фактора VIII, подопланина, CD34, негативная реакция с PanCK, CD31. По данным вирусологического исследования биоптата кожи, жидкости бронхоальвеолярного лаважа и крови методом полимеразной цепной реакции обнаружена ДНК HHV-8. На компьютерной томографии (КТ) органов грудной клетки, брюшной полости отмечается патологическая специфическая инфильтрация обоих легких (*рисунок 3*).

Таким образом, был установлен диагноз «СК, диссеминированная форма (поражение слизистых ротовой полости, миндалин, желудочно-кишечного тракта, кожи, легких), агрессивное течение».

В связи с нарастанием дыхательной недостаточности пациент был переведен в отделение реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ) для проведения респираторной поддержки. Учитывая агрессивное течение заболевания, помимо отмены ИСТ (глюкокортикостероиды, циклоспорин) было принято решение о проведении комбинированной противоопухолевой терапии липосомальным доксорубицином 20 мг/м^2 1 раз/3 нед, и винбластином 0,1 мг/кг 1 раз/нед. Через 2 нед от начала химиотерапии отмечена выраженная положительная динамика в виде стабилизации функционального статуса, купирования дыхательной недостаточности и уменьшения выраженности гиперпластического гингивита. Пациент переведен из ОРИТ в профильное отделение, где

Рисунок 1
Быстропрогрессирующие начальные проявления заболевания, динамика за 7 дней до начала специфической терапии: А, Б – гингивит и гиперплазия десен; В, Г – гранулемы с экхимозами на коже

Figure 1
Rapidly progressing initial disease manifestations observed over 7 days prior to the initiation of specific therapy: А, Б – gingivitis and gingival hyperplasia; В, Г – granulomas with ecchymotic skin lesions

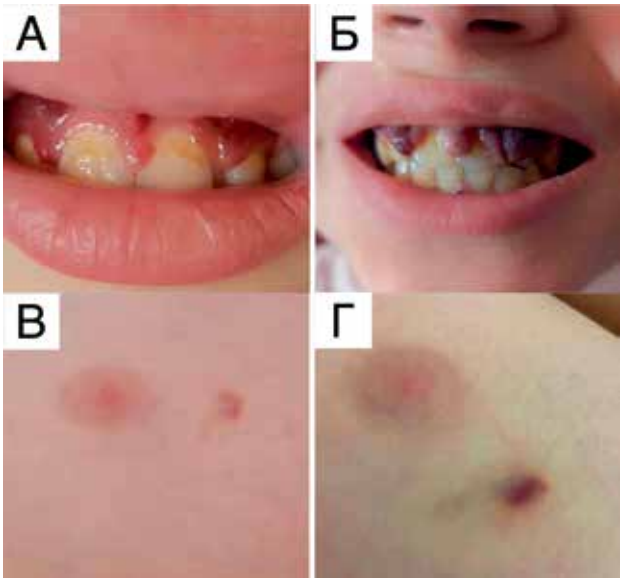


Рисунок 2
Гистологическая картина: опухолевая ткань располагается в виде пучков и узлов среди волокон коллагена. Клетки овоидной и веретеновидной формы с обильной эозинофильной цитоплазмой и крупными овоидными ядрами с гранулярным хроматином. Отмечается формирование клетками мелких вакуолей, которые заполнены эритроцитами. Видны множественные депозиты гемосидерина

Figure 2
Histological findings: the tumor tissue is arranged in bundles and nodules among collagen fibers. The cells are ovoid and spindle-shaped with abundant eosinophilic cytoplasm and large ovoid nuclei containing granular chromatin. The tumor cells are seen to form small vacuoles filled with erythrocytes. There are numerous hemosiderin deposits

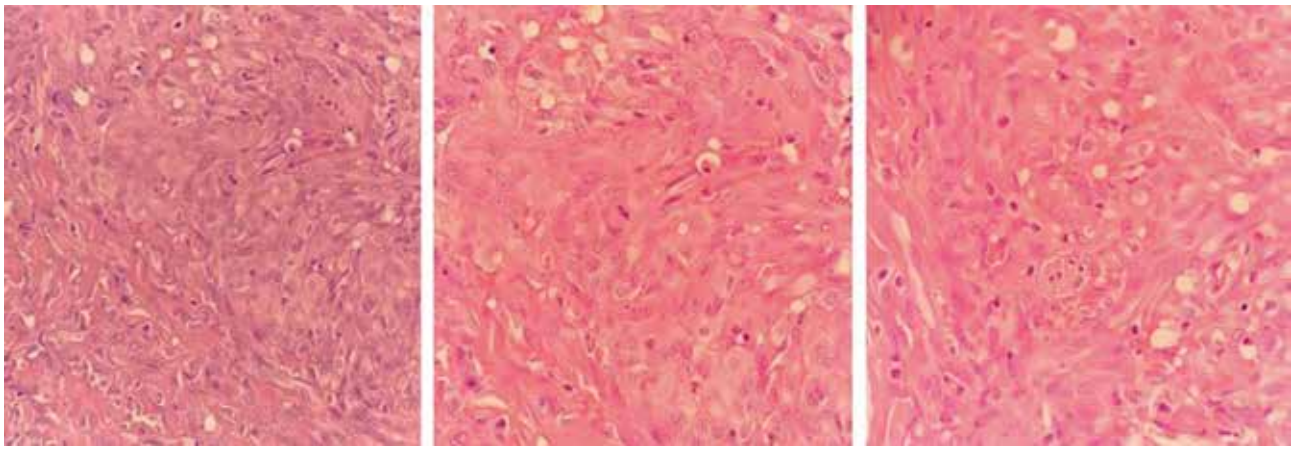
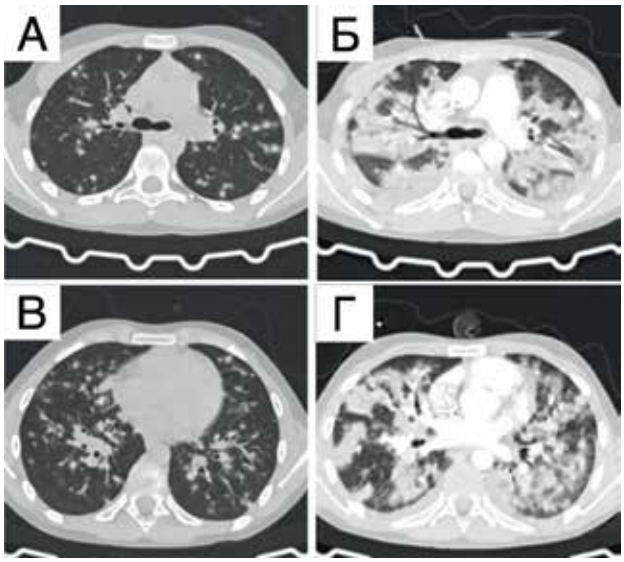


Рисунок 3
КТ органов грудной клетки с контрастным усилением до начала специфической терапии (аксиальная проекция): А, В – появление многочисленных очагов в обоих легких; Б, Г – отрицательная динамика за 7 дней от предыдущего исследования в виде увеличения очагов с формированием массивных инфильтраций

Figure 3
Contrast-enhanced chest CT scans done before the start of specific therapy (axial view): A, B – multiple lesions in both lungs; Б, Г – progression over 7 days following the previous CT exam: enlarged lesions and extensive infiltrates



монотерапия липосомальным доксорубицином была продолжена.

По данным контрольного обследования в объеме КТ органов грудной клетки и органов брюшной полости с контрастным усилением после 4-го и 8-го курсов терапии отмечается выраженная положительная динамика в виде уменьшения патологической специфической инфильтрации обоих легких с уменьшением площади поражения (*рисунок 4*).

На данный момент пациент получил 17 введений пегилированного липосомального доксорубицина. По результатам контрольного обследования в объеме позитронно-эмиссионной томографии-КТ с 18-фтордезоксиглюкозой данных за наличие активной опухолевой ткани с гиперметаболизмом радиофармпрепарата не получено. Таким образом, зафиксирован полный ответ на терапию. Пациент находится под динамическим наблюдением без признаков прогрессирования в течение 5 мес.

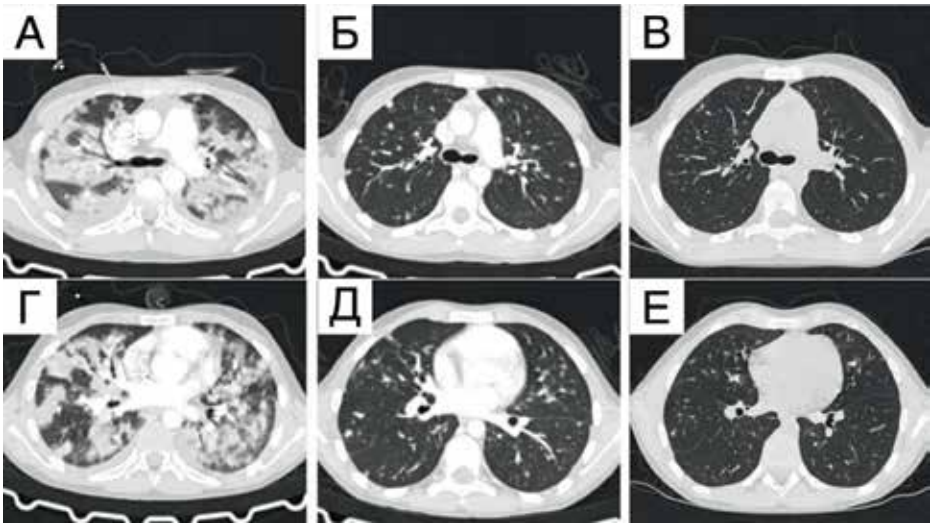
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ И ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

СК – ангиопролиферативное заболевание, ассоциированное с HHV-8 (KSHV) – представителем гаммагерпесвирусов. HHV-8 способен вызывать трансформацию эндотелиальных клеток и стимулировать пролиферацию опухолевых клеток за счет продукции вирусных белков, включая гомологи IL-6, что запускает каскад воспалительных и ангиогенных реакций [7]. У описанного нами пациента была выявлена диссеминированная форма СК с гистологическим подтверждением и обнаружением ДНК HHV-8 методом полимеразной цепной реакции в образцах кожи, крови и бронхоальвеолярного лаважа.

Вторичный иммунодефицит после аллогенной ТГСК является одним из важных провокационных факторов развития заболевания, так как снижение цитотоксических $CD8^+$-лимфоцитов нарушает возможность контроля репликации HHV-8. Их дефицит способствует реактивации вируса и инфи-

Рисунок 4
КТ органов грудной клетки с контрастным усилением (аксиальная проекция) в динамике на фоне проводимой специфической терапии: А, Г – инициальное поражение; Б, Д – после 4 курсов терапии; В, Е – после 8 курсов терапии

Figure 4
Axial contrast-enhanced chest CT scans showing changes during specific therapy: А, Г – the initial lesions; Б, Д – after 4 cycles of treatment; В, Е – after 8 cycles of treatment



цированию эндотелиальных клеток, что необходимо для поддержания опухолевого роста [8, 9]. У нашего пациента на момент дебюта СК отмечалось снижение уровней лимфоцитов $CD3^+$ (0,865 × 10^9/л), $CD4^+$ (0,088 × 10^9/л) и $CD8^+$ (0,753 × 10^9/л), а также экспрессия латентного ядерного антигена HHV-8 (LANA) в опухолевых клетках при иммуногистохимическом исследовании.

Хотя *in vivo* пролиферация инфицированных HHV-8 эндотелиальных клеток не слишком высока, в ряде исследований выявлена экспрессия маркеров Ki-67, TP53 и PCNA [10, 11]. Активация PI3K/Akt/mTOR-пути вирусными белками дополнительно усиливает рост опухоли. Имеются сообщения об успешном регрессе СК на фоне модификации иммуносупрессивной терапии, например конвертации ингибиторов кальциневрина на mTOR-ингибитор рапамицин [12, 13]. Наш пациент получал циклоспорин в качестве профилактики РТПХ, который помимо иммуносупрессивного эффекта стимулирует ангиогенез за счет индукции VEGF, что способствует опухолевой трансформации [13, 14]. Имеющиеся в литературе данные свидетельствуют, что в ряде случаев лишь редукция или полная отмена ИСТ может приводить к регрессии опухолевых очагов. В нашем наблюдении, учитывая диссеминированную форму заболевания, отмена ИСТ рассматривалась как этап комплексного подхода наряду с началом системной химиотерапии.

Следует отметить, что HHV-8 изменяет дифференцировку инфицированных эндотелиальных клеток в лимфатические эндотелиальные клетки и индуцирует аберрантную экспрессию мезенхимальных маркеров. Таким образом, веретенообразные клетки опухоли могут демонстрировать маркеры как эндотелиальной, так и мезенхимальной дифференцировки. Данный феномен определяется как эндотелиально-мезенхимальный переход (endothelial-to-mesenchymal transition) [15, 16]. Активация путей STAT3 и Akt, индуцируемая вирусным IL-6, усиливает лимфатическую трансформацию эндотелия [17]. Это сопровождается повышенной инвазивностью, миграцией, продукцией ангиогенных цитокинов (VEGF, Ang2, IL-6, IL-8) и типичными гистологическими признаками (аномальные сосуды, экстравазация эритроцитов, воспалительный инфильтрат) [18–20]. Описанные выше гистологические особенности наблюдались и у нашего пациента.

Роль воспаления и цитокиновых каскадов также неоспорима. Доказана ассоциация СК с хроническим воспалением, особенно в местах повреждения кожи (феномен Кебнера) [21]. Гистологически опухоли характеризуются инфильтрацией моноцитами, эозинофилами, плазматическими клетками [22]. Вирус индуцирует экспрессию провоспалительных и хемотаксических цитокинов, усиливающих лейкоцитарную инфильтрацию и ангиогенез [9, 23]. У пациентов с вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ) СК может развиваться в течение нескольких месяцев после начала комбинированной антиретровирусной терапии на фоне иммунореконституции как проявление IRIS (immune reconstitution inflammatory syndrome, синдром восстановления иммунитета) [24].

Основной стратегией лечения СК после ТГСК остается редукция или отмена иммуносупрессии. При невозможности ее прекращения целесообразна замена ингибиторов кальциневрина на рапамицин [13, 14]. При небольших, ограниченных или поверхностных поражениях возможно полное хирургическое удаление [25]. В случаях диссеминированного поражения или отсутствия ответа на отмену ИСТ показана химиотерапия. Согласно рекомендациям NCCN (National Comprehensive Cancer Network) и EDF/EADO/EORTC (European Dermatology Forum/European Association of Dermato-Oncology/European Organization for Research and Treatment of Cancer) препаратами выбора в первой линии терапии являются пегилированный липосомальный доксорубицин и паклитаксел. При развитии рецидива заболевания после долгого безрецидивного периода возможно повторное проведение терапии липосомальным доксорубицином. Альтернативные препараты включают помалидомид, бортезомиб, винорелбин, этопозид, гемцитабин. Перспективной является иммунотерапия анти-PD1 и CTLA4-ингибиторами [26, 27].

При использовании антрациклинов, в том числе доксорубицина, важнейшим ограничением является кумулятивная дозозависимая кардиотоксичность (максимальная кумулятивная доза 450–550 мг/м^2) [28]. Липосомальные формы доксорубицина позволяют достигать более высоких кумулятивных доз без выраженной кардиотоксичности. Так, имеется описание случая лечения пациента с ВИЧ-ассоциированной СК, который получил кумулятивную дозу 940 мг/м^2 липосомального доксорубицина в течение 10 лет без значительных побочных эффектов [29]. Несмотря на это, установленного максимального кумулятивного предела для липосомального доксорубицина не существует. При переходе на липосомальные формы также следует обязательно учитывать предыдущие курсы терапии антрациклинами при предшествующем лечении. В представленном случае комбинированная терапия липосомальным доксорубицином и винбластином привела к быстрому клиническому улучшению, а дальнейшее лечение доксорубицином в монорежиме позволило достичь полного метаболического ответа по данным ПЭТ-КТ. Лечение завершено в связи с достижением максимальной кумулятивной дозы.

По данным реестра EBMT, 62% пациентов с СК после ТГСК живы на момент наблюдения (медиана 48 мес), основными причинами смерти были инфекции и прогрессирование основного заболевания. Обобщенный анализ 19 клинических случаев показал выживаемость 63% (12/19 пациентов) на 2021 г. Таким образом, при ранней диагностике и комплексном лечении, включая модификацию ИСТ и химиотерапию, возможно достижение стойкой ремиссии даже при агрессивных формах СК после ТГСК [25].

Несмотря на установленную роль HHV-8 в патогенезе СК, вопрос рутинного скрининга доноров и реципиентов на HHV-8 перед трансплантацией остается дискутабельным. Частота клинически значимых HHV-8-ассоциированных осложнений после ТГСК крайне низка, особенно в регионах с невысокой серопревалентностью вируса. СК развивается преимущественно у пациентов, получающих интенсивную и длительную иммуносупрессивную терапию, а утвержденные профилактические или противовирусные стратегии при латентной инфекции отсутствуют. Наиболее эффективной мерой профилактики СК после трансплантации остаются рациональная минимизация иммуносупрессии и раннее выявление клинических проявлений заболевания [4, 25].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

СК после аллогенной ТГСК – крайне редкое, но потенциально тяжелое осложнение, развивающееся на фоне иммунодефицита, реактивации HHV-8, активации ангиогенных и провоспалительных сигнальных путей, а также трансформации инфицированных эндотелиальных клеток. Данный клинический случай подчеркивает важность настороженности и раннего включения СК в дифференциальный диагноз при кожных и системных проявлениях у пациентов после ТГСК, находящихся на иммуносупрессивной терапии. Своевременная диагностика с морфологической и вирусологической верификацией, модификация ИСТ и начало химиотерапии позволили достичь полного метаболического ответа даже при диссеминированной форме заболевания. Успешный исход в представленном случае демонстрирует эффективность комплексного подхода, однако подчеркивает необходимость дальнейших клинических наблюдений, разработки оптимальных стратегий профилактики, диагностики и лечения СК у пациентов после ТГСК.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ
Не указан.

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

ORCID
Lemeshev M.A. ORCID: https://orcid.org/0009-0004-4814-297X
Vasilieva A.P. ORCID: https://orcid.org/0000-0003-3949-248X
Radygina S.A. ORCID: https://orcid.org/0000-0002-7696-1153
Abramov D.M. ORCID: https://orcid.org/0000-0003-3664-2876
Khachatryan L.A. ORCID: https://orcid.org/0000-0001-7265-0414
Abashidze Z.A. ORCID: https://orcid.org/0000-0002-6314-2132
Kozlovskaya S.N. ORCID: https://orcid.org/0000-0002-1754-1220
Skvortsova Yu.V. ORCID: https://orcid.org/0000-0002-0566-053X
Balashov D.N. ORCID: https://orcid.org/0000-0003-2689-0569
Maschan A.A. ORCID: https://orcid.org/0000-0002-0016-6698

Литература / References

1. Mesri E.A., Cesarman E., Boshoff C. Kaposi's sarcoma and its associated herpesvirus. Nat Rev Cancer 2010; 10 (10): 707–19. DOI: 10.1038/nrc2888
2. Chang Y., Cesarman E., Pessin M.S., Lee F., Culpepper J., Knowles D.M., Moore P.S. Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. Science 1994; 266 (5192): 1865–9. DOI: 10.1126/science.7997879
3. WHO Classification of Tumours of Soft Tissue and Bone, Vol. 3. 5th ed. IARC; 2020.
4. Mikulska M., Balletto E., Mularoni A. Human herpesvirus 8 and Kaposi sarcoma: how should we screen and manage the transplant recipient? Curr Opin Infect Dis 2021; 34 (6): 646–53. DOI: 10.1097/QCO.0000000000000792
5. Острый лимфобластный лейкоз. Клинические рекомендации Минздрава России. 2023 [Электронный ресурс] URL: https://cr.minzdrav.gov.ru/view-cr/529_2, свободный (дата обращения 08.05.2025). [Acute lymphoblastic leukemia. Clinical recommendations of the Ministry of Healthcare of Russia. 2023 [Electronic resource] URL: https://cr.minzdrav.gov.ru/view-cr/529_2 (accessed 08.05.2025) (In Russ.)].
6. Вавилова Л.А., Дьяконова Ю.Ю., Быданов О.И., Мякова Н.В., Абугова Ю.Г., Андержанова Л.Х. и др. Роль блинатумомаба в лечении В-клеточных рецидивов острого лимфобластного лейкоза у детей: собственный опыт применения. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2023; 22 (1): 62–72. DOI: 10.24287/1726-1708-2023-22-1-62-72 [Vavilova L.A., Dyakonova Yu.Yu., Bydanov O.I., Myakova N.V., Abugova Yu.G., Anderzhanova L.Kh., et al. The role of blinatumomab in the treatment of B-cell relapses of acute lymphoblastic leukemia in children: own experience Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology. 2023; 22 (1): 62–72. (In Russ.)].
7. Polizzotto M.N., Uldrick T.S., Wyvill K.M., Aleman K., Marshall V., Wang V., et al. Clinical features and outcomes of patients with symptomatic kaposi sarcoma herpesvirus (KSHV)-associated Inflammation: prospective characterization of KSHV inflammatory cytokine syndrome (KICS). Clin Infect Dis 2016; 62 (6): 730–8. DOI: 10.1093/cid/civ996. Erratum in: Clin Infect Dis 2018; 66 (6): 985. DOI: 10.1093/cid/cix831
8. Parravicini C., Chandran B., Corbellino M., Berti E., Paulli M., Moore P.S., Chang Y. Differential viral protein expression in Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-infected diseases: Kaposi's sarcoma, primary effusion lymphoma, and multicentric Castleman's disease. Am J Pathol 2000; 156 (3): 743–9. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)64940-1
9. Mariggiò G., Koch S., Schulz T.F. Kaposi sarcoma herpesvirus pathogenesis. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 2017; 372 (1732): 20160275. DOI: 10.1098/rstb.2016.0275
10. Kaaya E.E., Parravicini C., Sundelin B., Mgaya E., Kitinya J., Lema L., et al. Spindle cell ploidy and proliferation in endemic and epidemic African Kaposi's sarcoma. Eur J Cancer 1992; 28A (11): 1890–4. DOI: 10.1016/0959-8049(92)90030-6
11. Hodak E., Hammel I., Feinmesser M., Zelinger A., Maron L., Sulkes J., David M. Differential expression of p53 and Ki-67 proteins in classic and iatrogenic Kaposi's sarcoma. Am J Dermatopathol 1999; 21 (2): 138–45. DOI: 10.1097/00000372-199904000-00005
12. Stallone G., Schena A., Infante B., Di Paolo S., Loverre A., Maggio G., et al. Sirolimus for Kaposi's sarcoma in renal-transplant recipients. N Engl J Med 2005; 352 (13): 1317–23. DOI: 10.1056/NEJMoa042831
13. Roy D., Sin S.H., Lucas A., Venkataramanan R., Wang L., Eason A., et al. mTOR inhibitors block Kaposi sarcoma growth by inhibiting essential autocrine growth factors and tumor angiogenesis. Cancer Res 2013; 73 (7): 2235–46. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-12-1851
14. Deauna-Limayo D., Rajabi B., Qiu W., Htut M., Sweetenham J. Kaposi sarcoma after non-myeloablative hematopoietic stem cell transplant: response to withdrawal of immunosuppressant therapy correlated with whole blood human herpesvirus-8 reverse transcriptase-polymerase chain reaction levels. Leuk Lymphoma 2013; 54 (10): 2299–302. DOI: 10.3109/10428194.2013.769221
15. Cheng F., Pekkonen P., Laurinavicius S., Sugiyama N., Henderson S., Günther T., et al. KSHV-initiated notch activation leads to membrane-type-1 matrix metalloproteinase-dependent lymphatic endothelial-to-mesenchymal transition. Cell Host Microbe 2011; 10 (6): 577–90. DOI: 10.1016/j.chom.2011.10.011
16. Gasperini P., Espigol-Frigole G., McCormick P.J., Salvucci O., Maric D., Uldrick T.S., et al. Kaposi sarcoma herpesvirus promotes endothelial-to-mesenchymal transition through Notch-dependent signaling. Cancer Res 2012; 72 (5): 1157–69. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-11-3067
17. Morris V.A., Punjabi A.S., Wells R.C., Wittkopp C.J., Vart R., Lagunoff M. The KSHV viral IL-6 homolog is sufficient to induce blood to lymphatic endothelial cell differentiation. Virology 2012; 428 (2): 112–20. DOI: 10.1016/j.virol.2012.03.013
18. Bala K., Bosco R., Gramolelli S., Haas D.A., Kati S., Pietrek M., et al. Kaposi's sarcoma herpesvirus K15 protein contributes to virus-induced angiogenesis by recruiting PLCγ1

and activating NFAT1-dependent RCAN1 expression. PLoS Pathog 2012;8 (9): e1002927. DOI: 10.1371/journal.ppat.1002927
19. Gramolelli S., Weidner-Glunde M., Abere B., Viejo-Borbolla A., Bala K., Rückert J., et al. Inhibiting the recruitment of PLCγ1 to Kaposi's sarcoma herpesvirus K15 protein reduces the invasiveness and angiogenesis of infected endothelial cells. PLoS Pathog 2015; 11 (8): e1005105. DOI: 10.1371/journal.ppat.1005105
20. He M., Zhang W., Bakken T., Schutten M., Toth Z., Jung J.U., et al. Cancer angiogenesis induced by Kaposi sarcoma-associated herpesvirus is mediated by EZH2. Cancer Res 2012; 72 (14): 3582–92. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-11-2876. Erratum in: Cancer Res 2013; 73 (17): 5603–5.
21. Brambilla L., Aromolo I.F., Buffon S., Benaglia C., Tourlaki A. Koebner phenomenon in Kaposi's sarcoma: a large single-center case series and review of current knowledge. J Cutan Med Surg 2023; 27 (2): 102–7. DOI: 10.1177/12034754221149658
22. Grayson W., Pantanowitz L. Histological variants of cutaneous Kaposi sarcoma. Diagn Pathol 2008; 3: 31. DOI: 10.1186/1746-1596-3-31
23. Haas D.A., Bala K., Büsche G., Weidner-Glunde M., Santag S., Kati S., et al. The inflammatory kinase MAP4K4 promotes reactivation of Kaposi's sarcoma herpesvirus and enhances the invasiveness of infected endothelial cells. PLoS Pathog 2013; 9 (11): e1003737. DOI: 10.1371/journal.ppat.1003737
24. Leidner R.S., Aboulafia D.M. Recrudescent Kaposi's sarcoma after initiation of HAART: a manifestation of immune reconstitution syndrome. AIDS Patient Care STDS 2005; 19 (10): 635–44. DOI: 10.1089/apc.2005.19.635
25. Cesaro S., Tridello G., van der Werf S., Bader P., Sociè G., Ljungman P., et al. Incidence and outcome of Kaposi sarcoma after hematopoietic stem cell transplantation: a retrospective analysis and a review of the literature, on behalf of infectious diseases working party of EBMT. Bone Marrow Transplant 2020; 55 (1): 110–6. DOI: 10.1038/s41409-019-0644-8
26. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. Kaposi sarcoma Version 1.2024, November, 2023.
27. Lebbe C., Garbe C., Stratigos A.J., Harwood C., Peris K., Marmol V.D., et al.; European Dermatology Forum (EDF), the European Association of Dermato-Oncology (EADO) and the European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC). Diagnosis and treatment of Kaposi's sarcoma: European consensus-based interdisciplinary guideline (EDF/EADO/EORTC). Eur J Cancer 2019; 114: 117–27. DOI: 10.1016/j.ejca.2018.12.036
28. Swain S.M., Whaley F.S., Ewer M.S. Congestive heart failure in patients treated with doxorubicin: a retrospective analysis of three trials. Cancer 2003; 97 (11): 2869–79. DOI: 10.1002/cncr.11407
29. Yokota K., Yotsumoto M., Muramatsu T., Saito M., Kamikubo Y., Ichiki A., et al. Long-term administration of pegylated liposomal doxorubicin at almost twice the recommended lifetime dose in 10 years, without cardiotoxicity in a Japanese patient with HIV-associated Kaposi sarcoma. J Infect Chemother 2020; 26 (2): 289–91. DOI: 10.1016/j.jiac.2019.08.016

Кожная манифестация инфекции *Stenotrophomonas maltophilia* у пациента после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток

Э.И. Людовских, С.Н. Козловская, Н.В. Суворова, О.Н. Пинегина, Ю.В. Скворцова, Г.Г. Солопова, Д.Н. Балашов

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

EDN: SRIVGG

A cutaneous manifestation of *Stenotrophomonas maltophilia* infection in a patient previously treated with allogeneic haematopoietic stem cell transplantation

E.I. Lyudovskikh, S.N. Kozlovskaya, N.V. Suvorova, O.N. Pinegina, Yu.V. Skvortsova, G.G. Solopova, 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

Stenotrophomonas maltophilia (*St. maltophilia*) – аэробная грамотрицательная бактерия с низкой вирулентностью, являющаяся условно-патогенным микроорганизмом, устойчивым к широкому спектру антибиотиков [1].

Мы представляем случай метастатического поражения кожи *St. maltophilia* у ребенка (7 лет) с диагнозом «первичный иммунодефицит: дефицит белка Cernunnos (мутации в гене *NHEJ1* c.532 C>T p.Arg 179Ter, c.530-2A>T в компаунд-гетерозиготном состоянии)» на фоне агранулоцитоза без ответа на ростовые факторы, ассоциированного с отторжением аллогенного трансплантата гемопоэтических стволовых клеток. Родители пациента дали согласие на использование информации, в том числе фотографий ребенка, в научных исследованиях и публикациях.

Первичный очаг выявлен в области верхней трети левого плеча в месте подкожной инъекции этанерцепта, что изначально было расценено как локальная побочная реакция на препарат (*рисунок 1*). С учетом появления фебрильной лихорадки, увеличения региональных лимфатических узлов шеи слева, инфильтративного изменения мягких тканей плеча, появления новых элементов на различных участках тела (*рисунок 2А, Б*) и увеличения в размерах первичного очага (*рисунок 2В*) выполнена биопсия кожи 2 пораженных участков. При микробиологическом исследовании биоптатов детектирована *St. maltophilia* (*рисунок 3*).

Учитывая тяжесть течения инфекции, *St. maltophilia* должна быть включена в список дифференциальных диагнозов при метастатических поражениях кожи у пациентов с нейтропенией, в том числе при вторичной нейтропении после химиотерапии и трансплантации гемопоэтических стволовых клеток.

Рисунок 1
Первичный очаг верхней трети левого плеча после подкожной инъекции

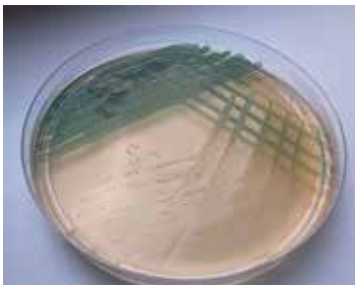
Figure 1
The primary lesion located in the upper third of the left upper arm following a subcutaneous injection

Рисунок 2
Распространение патологических изменений на коже: А, Б – новые элементы на ногах; В – увеличение в размерах первичного очага

Figure 2
The spread of skin lesions: A, Б – new lesions on the legs; B – an enlargement of the primary lesion

Рисунок 3
Рост колоний *St. maltophilia* на хромогенном агаре через 24 ч инкубации при 35°C

Figure 3
St. maltophilia colonies on chromogenic agar observed after 24 hours of incubation at 35°C



ORCID
Lyudovskikh E.I. ORCID: https://orcid.org/0000-0003-0717-2019
Solopova G.G. ORCID: https://orcid.org/0000-0002-1680-7269
Pinegina O.N. ORCID: https://orcid.org/0000-0003-1455-4728
Skvortsova Yu.V. ORCID: https://orcid.org/0000-0002-0566-053X
Kozlovskaya S.N. ORCID: https://orcid.org/0000-0002-1754-1220
Suvorova N.V. ORCID: https://orcid.org/0009-0009-6291-8849
Balashov D.N. ORCID: https://orcid.org/0000-0003-2689-0569

Литература / References

1. Brooke J.S. Stenotrophomonas maltophilia: an emerging global opportunistic pathogen. Clin. Microbiol. Rev. 2012;25(1):2–41. DOI: https://doi.org/10.1128/CMR.00019-11

DOI: 10.24287/1726-1708-2025-24-2-124-129

© 2025 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России

Поступила 11.05.2025
Принята к печати 02.06.2025

EDN: YGGLOB

Пролонгированная гипогаммаглобулинемия после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток у детей

С.К. Аракелян, Ю.В. Скворцова

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

Контактная информация:
Аракелян Сусанна Кареновна, врач-педиатр отделения трансплантации гемопоэтических стволовых клеток №2 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России
Адрес: 117997, Москва, ул. Саморы Машела, 1
E-mail: susanna2197@gmail.com

Аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) – это ключевой метод лечения жизнеугрожающих гематологических и иммунологических заболеваний. Иммунная реконституция после аллогенной ТГСК представляет собой сложный и многоэтапный процесс, который критически важен для восстановления иммунной функции пациента и снижения риска инфекционных осложнений. Исследования показывают, что у большинства пациентов наблюдается значительное улучшение иммунной функции через 6–12 мес после трансплантации, однако полное восстановление может занять 2 года или более. Одним из ключевых осложнений аллогенной ТГСК является пролонгированная гипогаммаглобулинемия – низкие уровни сывороточного иммуноглобулина G на сроках более 2 лет после аллогенной ТГСК. В отсутствие четкого порога, определяющего гипогаммаглобулинемию, общепринятым является уровень иммуноглобулина G в сыворотке крови ниже 5 г/л. Нарушение антителообразования и возникновение пролонгированной гипогаммаглобулинемии у детей после аллогенной ТГСК представляют собой сложные проблемы, требующие внимательного мониторинга и адекватного лечения. Своевременное восстановление как количества, так и функциональности В-клеток является критически важным для снижения риска инфекционных осложнений и улучшения качества жизни пациентов.

Ключевые слова: *гипогаммаглобулинемия, иммуноглобулин G, аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток, В-лимфоциты*

Аракелян С.К. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2025; 24 (2): 124–9. DOI: 10.24287/1726-1708-2025-24-2-124-129

© 2025 by «D. Rogachev NMRCPHOI»

Received 11.05.2025
Accepted 02.06.2025

Prolonged hypogammaglobulinemia in children after allogeneic hemopoietic stem cell transplantation

S.K. Arakelyan, Yu.V. Skvortsova

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

Correspondence:
Susanna K. Arakelyan, a pediatrician of the Department of Hematopoietic Stem Cell Transplantation No.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., 117997, Moscow, Russia
E-mail: susanna2197@gmail.com

Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) is a key treatment strategy for life-threatening hematologic and immunologic diseases. Immune reconstitution after allogeneic HSCT is a complex and multistage process, which is critical to the recovery of the patient's immune function and to the reduction of the risk of infectious complications. Studies show that most patients experience a significant improvement in immune function 6–12 months after transplantation; however, a full recovery may take up to 2 years or more. One of the major complications of allogeneic HSCT is prolonged hypogammaglobulinemia – low serum immunoglobulin G levels for more than 2 years after allogeneic HSCT. In the absence of a clearly defined threshold for hypogammaglobulinemia, the generally accepted definition is a serum immunoglobulin G level below 5 g/L. Impaired antibody formation and the occurrence of prolonged hypogammaglobulinemia in children after allogeneic HSCT are complex problems that require careful monitoring and appropriate management. Timely restoration of B cell number and function is critical to reduce the risk of infectious complications and improve the quality of patients' life.

Key words: *hypogammaglobulinemia, immunoglobulin G, allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, B lymphocytes*

Arakelyan S.K., et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology 2025; 24 (2): 124–9. DOI: 10.24287/1726-1708-2025-24-2-124-129

Пролонгированная гипогаммаглобулинемия у детей, перенесших аллогенную трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК), представляет собой значимую клиническую проблему. Длительное снижение уровней иммуноглобулинов (Ig) обусловливает повышенную восприимчивость к инфекционным осложнениям, что требует проведения регулярной заместительной терапии Ig и способствует увеличению частоты госпитализаций. Кроме того, дефицит гуморального иммунитета оказывает существенное влияние на социальную адаптацию пациентов, обусловливая необходимость ограничения контактов и длительного медицинского наблюдения. Таким образом, пролонгированная гипогаммаглобулинемия существенно снижает качество жизни и влияет на прогноз у детей после аллогенной ТГСК.

Восстановление гуморального иммунитета

Восстановление популяции В-клеток после аллогенной ТГСК происходит медленно и не всегда полно-

ценно (*рисунки 1, 2*). Первые транзиторные В-клетки ($CD24^{high}CD38^{high}$) появляются приблизительно через 1,5–2 мес [1, 2]. Также на ранних сроках после ТГСК происходит экспансия $CD5^+$ В-клеток, способных вырабатывать интерлейкин-10, который, в свою очередь, увеличивает выживаемость В-клеток, их пролиферацию и продукцию антител [3, 4]. Экспансия $CD5^+$ В-клеток указывает на роль регуляторных В-лимфоцитов в контроле иммунных и аутоиммунных реакций [5]. Через несколько месяцев после ТГСК количество переходных В-лимфоцитов уменьшается и постепенно появляются наивные В-клетки ($CD24^{int}CD38^{int}$), которые становятся преобладающей популяцией (в течение 1 года составляют 80% популяции В-лимфоцитов периферической крови). Переходные В-клетки с функциональным В-клеточным рецептором (BCR) изотипа IgM, связанным с их клеточной мембраной, выходят из костного мозга и созревают в наивные В-клетки. Эти наивные В-клетки циркулируют в крови и проходят через фолликулы в лимфатических узлах, пока их уникальный рецептор не распознает специфический антиген, растворимый или связанный с фолликулярными дендритными клетками или макрофагами. После связывания антигена с IgM и при дополнительной помощи фолликулярных Т-клеток $CD4^+$ В-клетки либо дифференцируются в короткоживущие экстрафолликулярные плазматические клетки или В-клетки памяти (в основном IgM-позитивные), либо инициируют ответ герминального центра внутри фолликула, который необходим для долгоживущих высокоаффинных IgA^+ и IgG^+ В-клеток памяти и долгоживущих плазматических клеток, производящих высокоаффинные IgA и IgG. В герминальных центрах В-клетки подвергаются клональной экспансии, когда цитадин-активированная деаминаза (AID) экспрессируется для инициации соматического гипермутирования вариабельных цепей генов *Ig*. При положительной селекции В-клеток с высокой аффинностью связывания антигена рекомбинация классов Ig (V(D)J-рекомбинация) инициируется путем AID-контролируемых двухнитевых разрывов ДНК и последующей их репарации в консервативных мотивах в регионах переключения, расположенных перед сегментами генов, которые кодируют отдельные константные области тяжелых цепей антител. Это приводит к переключению с класса IgM на класс IgA и/или IgG [6].

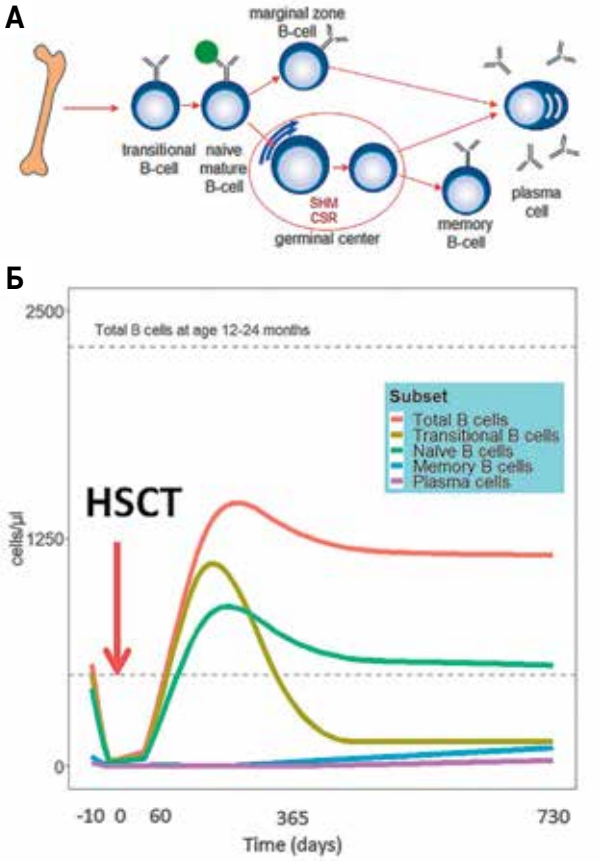
IgG (*рисунок 3*) играет центральную роль в противоинфекционном иммунитете благодаря таким факторам, как Fc-опосредованная антителозависимая клеточная цитотоксичность и комплемент-зависимая цитотоксичность.

Рисунок 1
Динамика реконституции В-клеточного звена у пациентов после ТГСК

Figure 1
The changes in the B cell reconstitution in patients after hematopoietic stem cell transplantation

Рисунок 2
Схема периферического развития В-клеток (А) и гипотетическая схема восстановления различных популяций В-клеток (Б): переходные В-клетки → наивные зрелые В-клетки → В-клетки памяти и плазмоциты [7]

Figure 2
Schematic representation of peripheral B-cell development (A) and hypothetical scheme of B cell subset reconstitution (Б): transitional B cells → mature naïve B cells → memory B cells and plasma cells [7]



Уровень Ig восстанавливается параллельно с восстановлением В-лимфоцитов [8]. При этом нормализация подклассов Ig обычно происходит в определенном порядке [8, 9]. Первыми восстанавливаются IgM, в среднем достигают нормального уровня в течение первых 6 мес после ТГСК. IgG достигают нормальных значений ко второй половине года, в то время как нормализация IgA может занять до 5 лет после ТГСК. Подклассы IgG в среднем достигают нормальных значений в сыворотке крови в течение 5 мес (IgG1), 9 мес (IgG3) или 2 лет (IgG2 и IgG4). Однако эти сроки очень вариабельны и могут зависеть от таких факторов, как основное заболевание, источник стволовых клеток, тип донора [8–10]. Для полного восстановления В-лимфоцитов необходимо разнообразие репертуара BCR. Дифференцировка В-лимфоцитов определяется активацией и перестройкой генов, контролирующих синтез полипептидных цепей BCR [11]. У пациентов после ТГСК чаще всего несбалансированный, неполноценный репертуар BCR, что приводит к нарушению гуморального иммунитета, повышенному риску развития инфекционных и/или аутоиммунных осложнений. BCR (*рисунок 4*) состоит из молекулы мембранного IgM или IgD и 2 молекул CD79 (Igα и Igβ), имеет трансмембранные и цитоплазматические сегменты, передающие внутриклеточные сигналы. Разнообразие BCR определяет реаранжировка генов [11].

Возможный патогенез пролонгированной гипогаммаглобулинемии

Механизмы нарушения антителообразования – переключение В-клеток на синтез Ig – остаются не до конца изученными.

К основным причинам развития пролонгированной гипогаммаглобулинемии можно отнести следующие:

1) функциональная незрелость В-клеток – наблюдается отсутствие пролиферативных и дифференцировочных ответов на антигензависимую стимуляцию, что отражает их функциональную некомпетентность [12];

2) повреждение предшественников В-клеток, возникающее в результате «цитокинового шторма» или применения иммуносупрессивных препаратов в терапии реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ) [12];

3) повреждение стромальной ниши гемопоэтических стволовых клеток также может способствовать замедлению восстановления популяции В-клеток, что ухудшает условия для их дифференцировки и созревания, приводит к развитию гипогаммаглобулинемии [12].

Факторами риска развития пролонгированной гипогаммаглобулинемии у детей после аллогенной

Рисунок 3
Строение IgG
Антитела IgG состоят из 4 полипептидных цепей: 2 одинаковых тяжелых цепей типа γ и 2 легких цепей, которые соединены между собой дисульфидными связями, формируя тетрамер с характерной Y-образной формой. На конце «вилки» содержат по одному сайту связывания с антигеном, обладающему вариабельной структурой

Figure 3
The structure of IgG
IgG antibodies consist of four polypeptide chains: two identical γ-type heavy chains and two light chains linked together by disulphide bonds forming a tetramer with a characteristic Y-shape. Each end of the 'fork' contains an antigen binding site with a variable structure

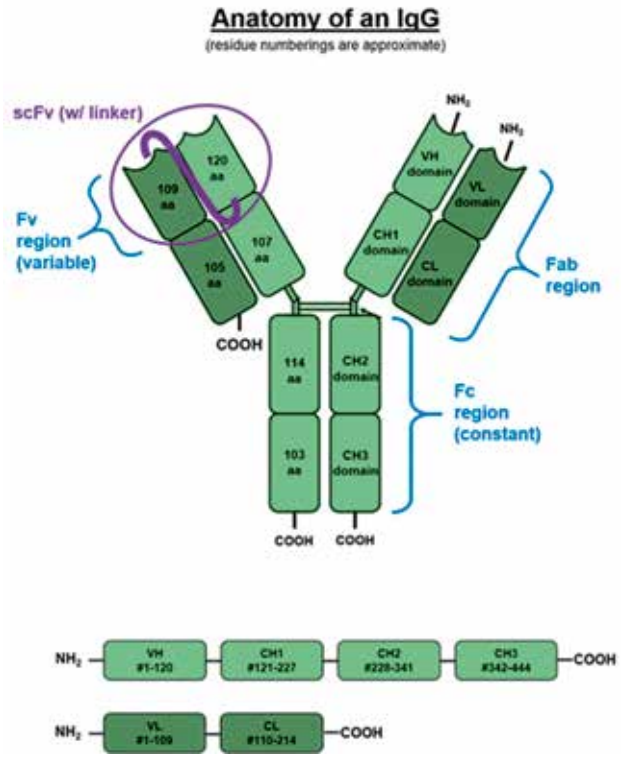
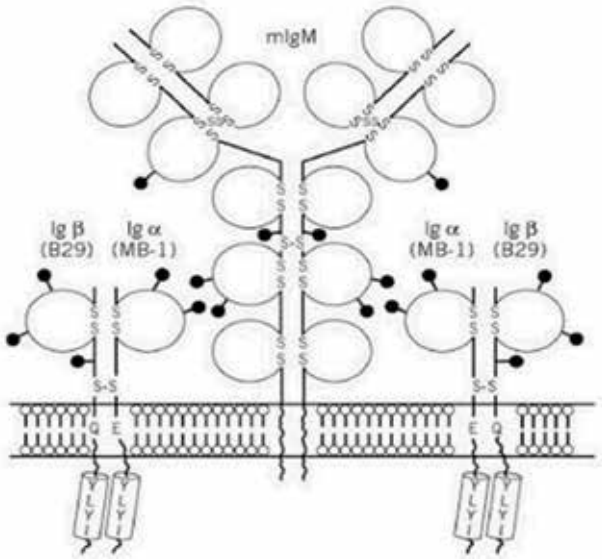


Рисунок 4
Строение BCR

Figure 4
The B cell receptor structure



ТГСК могут быть течение РТПХ, длительное применение иммуносупрессивной терапии, предшествующее введение ритуксимаба, использование тотального облучения тела в кондиционировании, CAR-T (chimeric antigen receptor)-клеточная терапия, направленная на антиген CD19 (*таблица*). Wudhikarn и соавт. проанализировали 60 пациентов с диффузной В-клеточной лимфомой, получавших анти-CD19 CAR-T-клеточную терапию, и сообщили, что у 44% наблюдалась гипогаммаглобулинемия (IgG < 4 г/л) через 1 мес после введения клеток и у 38% пациентов в более поздние сроки [13]. Из 24 пациентов с рецидивом/рефрактерным течением острого В-лимфобластного лейкоза в 83% случаев через 1 мес после CAR-T-клеточной терапии наблюдалась гипогаммаглобулинемия [13].

Качество жизни пациентов с пролонгированной гипогаммаглобулинемией

Пациенты с пролонгированной гипогаммаглобулинемией имеют высокую инфекционную заболеваемость, требуют проведения пожизненной регулярной заместительной терапии внутривенными или подкожными Ig. Данные о частоте повторных госпитализаций у детей с пролонгированной гипогаммаглобулинемией после аллогенной ТГСК варьируют в зависимости от ряда факторов, включая возраст пациента, тип заболевания и наличие сопутствующих состояний. В некоторых исследованиях отмечается, что до 30% детей могут потребовать повторной госпитализации в течение первого года после трансплантации [14]. Процент смертности у детей с гипогаммаглобулинемией может достигать 27% [15]. Norlin и соавт. провели ретроспективный анализ, по результатам которого оказалось, что у пациентов с низким уровнем IgG (< 4 г/л) общая выживаемость составляла 54%, а смертность – 27% [16]. Frangoul и соавт. проанализировали распространенность и факторы риска развития гипогаммаглобулинемии у детей и сообщили, что снижение уровня IgG < 5 г/л встречалось у 77% пациентов [17]. Факторами риска были инициально низкий уровень Ig до ТГСК, маленький возраст пациентов на момент трансплантации, основное злокачественное заболевание, развитие острой РТПХ, ТГСК от неродственного донора.

Вакцинация

Для полноценного восстановления защиты от инфекций после аллогенной ТГСК требуется обязательное проведение полного комплекса вакцинации, так как после трансплантации возникает функциональная аспления, а эффект вакцин, введенных до ТГСК, нивелирован кондиционированием.

Ответ на вакцинацию у детей после аллогенной ТГСК зависит от восстановления как Т-клеточного, так и В-клеточного звена [18]. Исключением является реакция на полисахаридные антитела, которая полностью зависит от В-клеток. Ответ на полисахаридные антитела играет роль в иммунизации против инкапсулированных бактерий (пневмококки) [19–22]. Риск пневмококкового инвазивного заболевания повышен как в ранние, так и в поздние сроки после ТГСК, что свидетельствует о длительных дефектах в восстановлении В-клеток даже после ревакцинации [23–26]. Предполагается, что плохой ответ на полисахаридные вакцины вызван дефектом В-клеток памяти, продуцирующих IgM [27].

Вакцинацию аттенуированными вакцинами следует начинать не ранее чем через 6 мес после аллогенной ТГСК, при этом должен быть доста-

Таблица
Факторы, влияющие на восстановление В-лимфоцитов [7]

Table
Factors influencing B cell reconstitution [7]

Фактор Factor	**Влияние** Influence
Источник стволовых клеток Stem cell source	Периферические стволовые клетки – количество В-клеток выше на ранних этапах, однако спустя 6 мес после ТГСК уровни В-лимфоцитов одинаковые, независимо от источника стволовых клеток (периферические стволовые клетки vs костный мозг) Peripheral blood stem cells – B cell count is higher at early stages, but 6 months after HSCT, B cell levels are similar, irrespective of the stem cell source (peripheral blood stem cells vs bone marrow)
Деплеция (TCRαβ, CD19) Depletion (TCRαβ, CD19)	Нарушение реконституции Impaired B-cell reconstitution
Серотерапия в кондиционировании Serotherapy in the conditioning regimen	Неоднозначные данные Ambiguous data
Миелоаблативное кондиционирование Myeloablative conditioning	Адекватные темпы иммунной реконституции и продукции Ig Adequate B cell reconstitution and Ig production
Кондиционирование со сниженной токсичностью Reduced-intensity conditioning	Не всегда оптимальное восстановление В-клеток, зависимость от трансфузий внутривенных Ig Not always optimal B cell reconstitution, intravenous immunoglobulins dependence
Тотальное облучение тела Total body irradiation	Задержка восстановления В-лимфоцитов Delayed B cell reconstitution
Острая РТПХ Acute graft-versus-host disease	Выраженное нарушение восстановления функции и количества В-лимфоцитов Significantly impaired B cell reconstitution, in both function and numbers
Хроническая РТПХ Chronic graft-versus-host disease	Низкое количество В-клеток, отсутствие переключенных В-лимфоцитов, снижение регуляторных В-клеток, увеличение активированных В-клеток A low B cell count, no switched B cells, regulatory B cells are found to be reduced, an increase in the number of activated B cells

точный уровень CD4 (200 кл/мкл) и CD19 (50 кл/мкл). Вакцинацию «живыми» вакцинами следует проводить спустя 2 года после ТГСК (в отсутствие активных проявлений РТПХ).

В связи с вышеизложенным полноценное восстановление В-клеточного звена иммунитета имеет важное значение в обеспечении защиты от инфекций и адекватного качества жизни.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, пролонгированная гипогаммаглобулинемия – это нередкая проблема реципиентов аллогенной ТГСК, осложняющая поздний посттрансплантационный период и приводящая к повышению частоты инфекций и госпитализаций. Звеньями патогенеза данного феномена могут быть патология цитокиновой среды, нарушение созревания В-клеток, блок переключения В-лимфоцитов на синтез специфических Ig. Необходимы более глубокие исследования для понимания комплексной эволюции клеточного и репертуарного восстановления В-лимфоцитов, а также влияния различных факторов, связанных с проведением ТГСК, на формирование иммунного репертуара и функцию гуморального и клеточного иммунитета после трансплантации.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ
Не указан.

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

ORCID
Arakelyan S.K. ORCID: https://orcid.org/0009-0005-7866-7256
Skvortsova Yu.V. ORCID: https://orcid.org/0000-0002-0566-053X

Литература / References

1. Попова Н.Н., Савченко В.Г. Реконституция Т-клеточного звена иммунной системы у больных после трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток. Гематология и трансфузиология 2020; 65 (1): 24–38. DOI: 10.35754/0234-5730-2020-65-1-24-38 [Popova N.N., Savchenko V.G. Reconstitution of T-cell-mediated immunity in patients after allogeneic stem cell transplantation. Russian Journal of Hematology and Transfusiology 2020; 65 (1): 24–38. (In Russ.)].
2. Marie-Cardine A., Divay F., Dutot I., Green A., Perdrix A., Boyer O., et al. Transitional B cells in humans: characterization and insight from B lymphocyte reconstitution after hematopoietic stem cell transplantation. Clin Immunol 2008; 127 (1): 14–25.
3. Antin J.H., Ault K.A., Rappeport J.M., Smith B.R. B lymphocyte reconstitution after human bone marrow transplantation. Leu-1 antigen defines a distinct population of B lymphocytes. J Clin Invest 1987; 80 (2): 325–32.
4. Antin J.H. Emerson S.G., Martin P., Gadol N., Ault K.A. Leu-1$^+$(CD5$^+$) B cells. A major lymphoid subpopulation in human fetal spleen: phenotypic and functional studies. J Immunol 1986; 136 (2): 505–10.
5. Fillatreau S., Sweenie C.H., McGeachy M.J., Gray D., Anderton S.M. B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. Nat Immunol 2002; 3 (10): 944–50.
6. Alt F.W., Zhang Y., Meng F.-L., Guo C., Schwer B. Mechanisms of programmed DNA lesions and genomic instability in the immune system. Cell 2013; 152 (3): 417–29.
7. Van der Maas N. G., Berghuis D., van der Burg M., Lankester A.C. B cell reconstitution and influencing factors after hematopoietic stem cell transplantation in children. Front Immunol 2019; 10: 782.
8. Abdel-Azim H., Elshoury A., Mahadeo K.M., Parkman R., Kapoor N. Humoral immune reconstitution kinetics after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in children: a maturation block of IgM memory B cells may lead to impaired antibody immune reconstitution. Biol Blood Marrow Transplant 2017; 23 (9): 1437–46.
9. Gerritsen E.J., van Tol M.J., Lankester A.C., van der Weijden-Ragas C.P., Jol-van der Zijde C.M., Oudeman-Gruber N.J., et al. Immunoglobulin levels and monoclonal gammopathies in children after bone marrow transplantation. Blood 1993; 82 (11): 3493–502.
10. Abrahamsen I.W., Sømme S., Heldal D., Egeland T., Kvale D., Tjønnfjord G.E. Immune reconstitution after allogeneic stem cell transplantation: the impact of stem cell source and graft-versus-host disease. Haematologica 2005; 90 (1): 86–93.
11. Suzuki I., Milner E.C., Glas A.M., Hufnagle W.O., Rao S.P., Pfister L., et al. Immunoglobulin heavy chain variable region gene usage in bone marrow transplant recipients: lack of somatic mutation indicates a maturational arrest. Blood 1996; 87: 1873–80.
12. Михальцова Е.Д., Попова Н.Н., Дроков М.Ю., Капранов Н.М., Давыдова Ю.О., Васильева В.А. и др. Влияние режимов профилактики реакции «трансплантат против хозяина» на восстановление клеточного звена иммунной системы у пациентов после трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток. Медицинская иммунология 2021; 23 (5): 1125–36. [Mikhaltsova E.D., Popova N.N., Drokov M.Yu., Kapranov N.M., Davydova Yu.O., Vasilyeva V.A., et al. The impact of regimens for the prevention of graft-versus-host-disease on the recovery of the cellular component of the immune system in patients after allogeneic hematopoi-

etic stem cell transplantation. Medical Immunology 2021; 23 (5): 1125–36. (In Russ.)].
13. Wudhikarn K., Palomba M.L., Pennisi M., Garcia-Recio M., Flynn J.R., Devlin S.M., et al. Infection during the first year in patients treated with CD19 CAR T cells for diffuse large B cell lymphoma. Blood Cancer J 2020; 10 (8): 79.
14. Сидорова Н.В., Пристанскова Е.А., Киргизов К.И., Константинова В.В., Буря А.Е., Благонравова О.Л. Анализ факторов, связанных с неродственным донором гемопоэтических стволовых клеток, влияющих на результаты аллогенных трансплантаций у детей. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2018; 17 (2): 69–75. DOI: 10.24287/1726-1708-2018-17-2-69-75 [Sidorova N.V., Pristanskova E.A., Kirgizov K.I., Konstantinova V.V., Burya A.E., Blagonravova O.L., et al. Donor-related factors affecting the outcome of hematopoietic stem cell transplantations in children. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology 2018; 17 (2): 69–75. (In Russ.)].
15. Ohmoto A., Fuji S., Shultes K.C., Savani B.N., Einsele H. Controversies about immunoglobulin replacement therapy in HSCT recipients with hypogammaglobulinemia. Bone Marrow Transplant 2022; 57 (6): 874–80.
16. Norlin A.C. et al. Allogeneic stem cell transplantation: low immunoglobulin levels associated with decreased survival. Bone Marrow Transplant 2008; 41 (3): 267–73.
17. Frangoul H., Min E., Wang W., Chandrasekhar R., Calder C., Evans M., et al. Incidence and risk factors for hypogammaglobulinemia in pediatric patients following allo-SCT. Bone Marrow Transplant 2013; 48 (11): 1456–9.
18. Stein K.E. Thymus-independent and thymus-dependent responses to polysaccharide antigens. J Infect Dis 1992; 165 (Suppl_1): S49–52.
19. Parkkali T., Ruutu T., Stenvik M., Kuronen T., Käyhty H., Hovi T., et al. Loss of protective immunity to polio, diphtheria and Haemophilus influenzae type b after allogeneic bone marrow transplantation. APMIS 1996; 104 (1–6): 383–8.
20. Ljungman P., Lewensohn-Fuchs I., Hammarström V., Aschan J., Brandt L., Bolme P., et al. Long-term immunity to measles, mumps, and rubella after allogeneic bone marrow transplantation Blood 1994; 84 (2): 657–63.
21. Ljungman P., Aschan J., Barkholt L., Broliden P.-A., Gustafsson B., Lewensohn-Fuchs I., et al. Measles immunity after allogeneic stem cell transplantation; influence of donor type, graft type, intensity of conditioning, and graft-versus host disease. Bone Marrow Transplant 2004; 34 (7): 589–93.
22. Guinan E.V.A.C., Molrine D.C., Antin J.H., Lee M.C., Weinstein H.J., Sallan S.E., et al. Polysaccharide conjugate vaccine responses in bone marrow transplant patients. Transplantation 1994; 57 (5): 677–84.
23. Witherspoon R.P., Storb R., Ochs H.D., Fluornoy N., Kopecky K.J., Sullivan K.M., et al. Recovery of antibody production in human allogeneic marrow graft recipients: influence of time posttransplantation, the presence or absence of chronic graft-versus-host disease, and antithymocyte globulin treatment. Blood 1981; 58 (2): 360–8.
24. Hammarström V., Pauksen K., Svensson H., Lönnqvist B., Simonsson B., Ringdén O., Ljungman P. Serum immunoglobulin levels in relation to levels of specific antibodies in allogeneic and autologous bone marrow transplant recipients. Transplantation 2000; 69 (8): 1582–6.
25. Engelhard D., Cordonnier C., Shaw P.J., Parkalli T., Guenther C., Martino R., et al. Early and late invasive pneumococcal infection following stem cell transplantation: a European Bone Marrow Transplantation survey. Br J Haematol 2002; 117 (2): 444–50.
26. Kumar D., Humar A., Plevneshi A., Siegal D., Franke N., Green K., et al. Invasive pneumococcal disease in adult hematopoietic stem cell transplant recipients: a decade of prospective population-based surveillance. Bone Marrow Transplant 2008; 41 (8): 743–7.
27. Moens L., Wuyts M., Meyts I., De Boeck K., Bossuyt X. Human memory B lymphocyte subsets fulfill distinct roles in the anti-polysaccharide and anti-protein immune response. J Immunol 2008; 181 (8): 5306–12.

© 2025 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России

Поступила 25.12.2024
Принята к печати 18.04.2025

EDN: YVMIDT

Контактная информация:
Клюхин Владислав Валерьевич, врач-ординатор ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России
Адрес: 117997, Москва, ул. Саморы Машела, 1
E-mail: nccxbak@mail.ru

DOI: 10.24287/1726-1708-2025-24-2-130-139

Врожденные дизэритропоэтические анемии

В.В. Клюхин, Н.С. Сметанина

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

Врожденные дизэритропоэтические анемии (congenital dyserythropoietic anemia, CDA) представляют собой редкую группу наследственных анемий, характеризующихся неэффективным эритропоэзом и выраженными морфологическими аномалиями в эритроидных предшественниках в костном мозге. Существует несколько типов CDA (I–IV), каждый из которых связан со специфическими мутациями в таких генах, как *CDAN1*, *C15orf41*, *SEC23B*, *KIF23* и *KLF1*, что приводит к вариабельным фенотипическим проявлениям. CDA II типа является наиболее распространенным вариантом среди всех CDA и проявляется нормоцитарной анемией различной степени тяжести, желтухой и спленомегалией. Диагностика этих генетически детерминированных состояний основана на молекулярно-генетическом тестировании и морфологической идентификации специфических аномалий в эритроидных предшественниках, при этом каждый тип CDA демонстрирует отличительные особенности, такие как наличие межъядерных хроматиновых мостиков при I типе и эритробластов с 2 ядрами и более при II типе. Современные подходы к лечению играют в основном поддерживающую роль и включают в себя переливание компонентов крови, мониторинг и коррекцию перегрузки железом. Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток на сегодняшний день является единственной излечивающей опцией для пациентов с CDA. В целом прогноз у данной категории пациентов благоприятный, однако проблема состоит в гетерогенности клинико-лабораторных проявлений, что нередко затрудняет постановку окончательного диагноза.

Ключевые слова: *врожденные дизэритропоэтические анемии, гены, эритроидные предшественники, дизэритропоэз, гемолитическая анемия*

Клюхин В.В. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2025; 24 (2): 130–9. DOI: 10.24287/1726-1708-2025-24-2-130-139

© 2025 by «D. Rogachev NMRCPHOI»

Received 25.12.2024
Accepted 18.04.2025

Correspondence:
Vladislav V. Klyukhin, a resident at 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: nccxbak@mail.ru

Congenital dyserythropoietic anemias

V.V. Klyukhin, N.S Smetanina

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

Congenital dyserythropoietic anemias (CDAs) is a rare group of inherited anemias characterized by ineffective erythropoiesis and pronounced morphological abnormalities in erythroid precursors in the bone marrow. There are several CDA (I–IV) types, each associated with specific mutations in genes such as *CDAN1*, *C15orf41*, *SEC23B*, *KIF23*, and *KLF1*, leading to variable phenotypic manifestations. CDA type II is the most common variant among all CDAs and presents with normocytic anemia of varying severity, jaundice, and splenomegaly. The diagnosis of these genetically determined conditions is based on molecular genetic testing and morphological identification of specific abnormalities in erythroid precursors, with each type of CDA showing distinctive features, such as the presence of internuclear chromatin bridges in CDA type I and erythroblasts with two or more nuclei in CDA type II. Current treatment approaches play primarily a supportive role and include blood component transfusions, monitoring, and correction of iron overload. Hematopoietic stem cell transplantation is currently the only curative option for patients with CDA. Overall, the prognosis for this category of patients is favorable; however, the challenge lies in the heterogeneity of clinical and laboratory manifestations, which often makes it difficult to establish a definitive diagnosis.

Key words: *congenital dyserythropoietic anemias, genes, erythroid precursors, dyserythropoiesis, hemolytic anemia*

Klyukhin V.V., et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology 2025; 24 (2): 130–9. DOI: 10.24287/1726-1708-2025-24-2-130-139

Врожденные дизэритропоэтические анемии (congenital dyserythropoietic anemia, CDA) – группа редких наследственных заболеваний, характеризующихся неэффективным эритропоэзом и наличием определенных морфологических аномалий эритроидных предшественников в костном мозге (КМ) [1]. Дизэритропоэзом называют патологическое соотношение процессов пролиферации и дифференцировки эритроидных клеток, что отражается на их морфологических особенностях (*рисунок 1*). Термин «дизэритропоэз» впервые был использован исследователями J. Crookston и H. Heimpel для случаев, которые позже были определены как CDA I и II типов [2, 3]. Клиническая картина характеризуется развитием нормоцитарной, реже макроцитарной, нормо- или гипорегенераторной анемии различной степени тяжести, спленомегалией и формированием желчнокаменной болезни [1].

В основном диагноз CDA ставится по результатам молекулярно-генетических исследований и при выявлении определенных морфологических аномалий эритроидных предшественников в КМ. Морфологические изменения включают в себя гиперплазию эритроидных клеток, изменение количества ядер в эритробластах (2 ядра и более), наличие межъядерных и/или цитоплазматических мостиков.

Дизэритропоэтические анемии вызваны мутациями нескольких генов: *CDAN1*, *C15orf41*, *SEC23B*, *KIF23* и *KLF1*. Например, CDA I типа вызвана биаллельными мутациями гена *CDAN1* или *C15orf41*, CDA II типа связана с мутациями гена *SEC23B*, а CDA IV типа – с гетерозиготной мутацией в транскрипционном факторе KLF1. Эти мутации приводят к возникновению различных гетерогенных фенотипов, что затрудняет дифференциальный диагноз между другими типами наследственных анемий [4].

CDA охватывают обширную группу монолинейных цитопений, которые можно разделить на 3 основных типа (I–III), а также CDA, связанные с нарушением транскрипционных факторов (IV тип) и синдромальные формы.

CDA I типа характеризуется наличием макроцитарной, гипорегенераторной анемии средней или тяжелой степени тяжести, для этого типа характерны некоторые фенотипические особенности (скелетно-мышечные аномалии, низкий рост) [5]. При исследовании в КМ наблюдается от 2 до 10% эритробластов, которые являются двухъядерными и большинство более ранних предшественников также имеют 2 ядра и более [6]. Из типичных морфологических особенностей обращает на себя внимание наличие тонких межъядерных хроматиновых мостиков между парами ядер эритробластов, эти мостики наблюдаются у 79% пациентов с CDA I типа (*рисунок 2*) [7]. Данный тип имеет аутосомно-рецессивный механизм наследования, причем генетический дефект возникает в обоих аллелях, но в 2 разных локусах и в более чем 90% случаев приходится на мутации генов *CDAN1* и *C15orf41*. Оба белка, кодируемые данными генами, вероятно, играют роль в репарации ДНК и сборке хроматина после репликации ДНК [8, 9].

CDA II типа является наиболее распространенной формой, она проявляется нормоцитарной, нормо- или гиперрегенераторной анемией различной степени тяжести, часто сопровождается развитием желтухи и спленомегалией [4]. КМ при CDA II типа гиперклеточный, с выраженными явлениями гиперплазии эритроидных клеток. Из типичных морфологических признаков наблюдается наличие эритроидных предшественников с 2 ядрами (*рисунок 3*). Если наблюдается >10% двухъядерных эритробластов и >2% клеток с кариорексисом (т. е. фрагментацией ядра с распадом хроматина на неструктурированные гранулы), диагноз CDA II типа практически не вызывает сомнений [6]. Специфической характеристикой мембранных белков является наличие недостаточно гликозилированного белка полосы 3, которая наблюдается у 95% пациентов с CDA II типа [10]. Данный тип наследуется аутосомно-рецессивно, мутации возникают в обоих аллелях гена *SEC23B*. Ген *SEC23B* и кодируемый им белок SEC23A являются основными компонентами комплекса белков оболочки II (COPII), их функция заключается в формировании везикул для транспорта веществ из эндоплазматического ретикулума в комплекс Гольджи [1, 11].

Рисунок 1
Морфологическая картина дизэритропоэза в КМ (адаптировано из ASH Image bank, N. Wasekar и соавт.)
На снимке видны многоядерные эритробласты, признаки кариорексиса

Figure 1
The morphological pattern of dyserythropoiesis in the bone marrow (BM) (adapted from ASH Image bank N. Wasekar, et al.)
Multinucleated erythroblasts and signs of karyorrhexis can be seen in this image

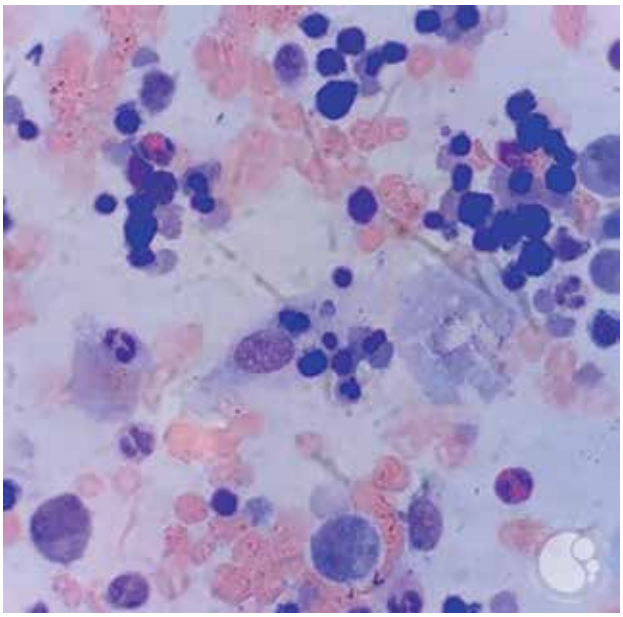


Рисунок 2
Картина КМ при CDA I типа (адаптировано из A. Iolascon [4])
Стрелкой указаны типичные межъядерные хроматиновые мостики

Figure 2
The BM pattern in CDA type I (adapted from A. Iolascon [4])
The arrow indicates typical internuclear chromatin bridges

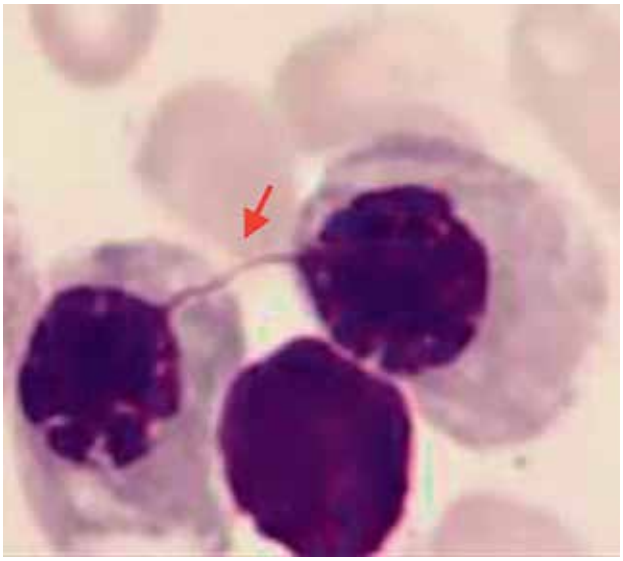
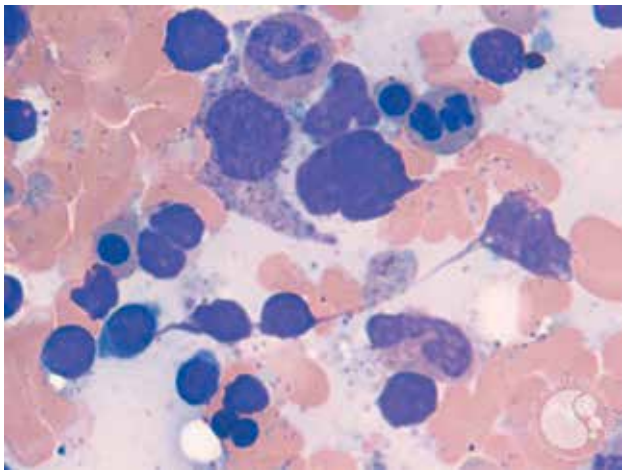


Рисунок 3
Морфологическая картина КМ при CDA II типа (адаптировано из ASH Image bank, G. Venkataraman и соавт.)
На снимке можно различить эритробласты, которые несут в себе 2 ядра и более

Figure 3
The morphological pattern of BM in CDA type II (adapted from ASH Image bank G. Venkataraman, et al.)
The image allows us to distinguish erythroblasts carrying two or more nuclei



CDA III типа – наиболее редко встречающаяся из 3 классических форм разновидность CDA. Характеризуется аутосомно-доминантным типом наследования, на сегодняшний день описано наибольшее число пациентов из Америки и Швеции [12]. По сходству клинической картины III тип напоминает I и II типы, однако у пациентов с CDA III типа спленомегалия отсутствует. У большинства описанных пациентов из Швеции присутствуют офтальмологические нарушения (снижение остроты зрения, ангиоидные полосы, макулярная дегенерация). Также вызывает интерес тот факт, что у части пациентов в крови наблюдалась моноклональная гаммапатия, которая впоследствии трансформировалась в множественную миелому. В периферической крови в небольшом количестве преобладают макроцитарные формы эритроцитов, количество ретикулоцитов может быть в норме или слегка сниженным. При световой микроскопии КМ выявляется гиперплазия эритроидных клеток с характерными гигантскими многоядерными эритробластами (*рисунок 4*) [13]. При CDA III типа идентифицирована причинная мутация гена *KIF23*, который описан в американской и шведской родословных. Белок, кодируемый этим геном, является членом семейства кинезиноподобных белков, который обеспечивает правильное разделение клеток во время телофазы. Мутация гена *KIF23* приводит к образованию крупных многоядерных эритробластов в КМ у этих пациентов [13].

На сегодняшний день известно о 8 пациентах с CDA IV типа. У них наблюдаются клинико-лабораторные признаки гемолитической анемии. Гемолитическая анемия, как правило, средней, чаще тяжелой степени тяжести по уровню ретикулоцитов, нормо-, реже гиперрегенераторная с повышенным уровнем фетального гемоглобина. В миелограмме наблюдается картина гиперклеточного КМ, верифицируются двухъядерные или многоядерные эритробласты (*рисунок 5*, *таблица*). При электронной микроскопии выявляются незрелые эритроидные предшественники с атипичными цитоплазматическими включе-

Рисунок 4
Гигантские многоядерные эритробласты при CDA III типа (адаптировано из A. Iolascon [4])

Figure 4
Giant multinucleated erythroblasts in CDA type III (adapted from A. Iolascon [4])

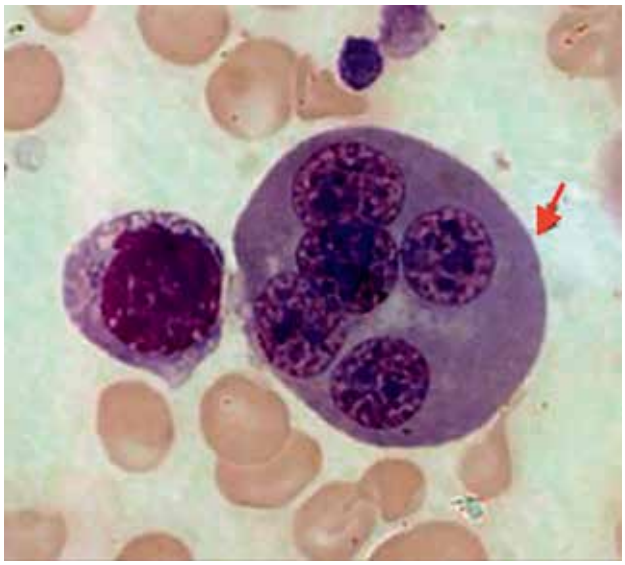
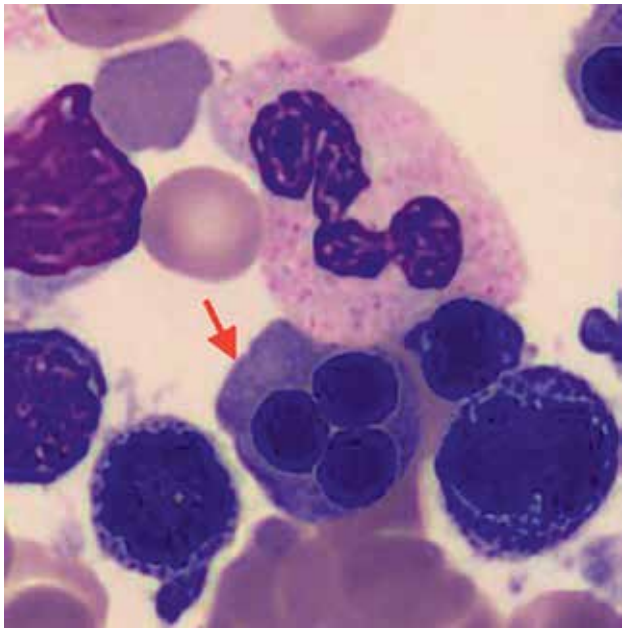


Рисунок 5
Многоядерные эритробласты при CDA IV типа (адаптировано из A. Iolascon [4])

Figure 5
Multinucleated erythroblasts in CDA type IV (adapted from A. Iolascon [4])



ниями, инвагинацией ядерной мембраны [14, 15]. CDA IV типа передается аутосомно-доминантным путем и характеризуется наличием уникальной перестройки c.973G>A (p.E325K) в гене *KLF1*. Этот ген кодирует одноименный транскрипционный фактор KLF1, который играет одну из ведущих ролей в регуляции переключения между гемоглобином A и F, вторая его функция заключается в координировании процессов дифференцировки [16].

Молекулярный механизм генетического дефекта *KLF1* p.E325K заключается в нарушении распознавания мутировавшим геном своего нормального сайта либо в неправильной сборке белкового комплекса. Это приводит к дисрегуляции экспрессии поверхностно-мембранных транспортных белков, а также протеинов, которые участвуют во внутриклеточном метаболизме железа, делении клеток и регуляции клеточного цикла (*рисунок 6*) [17].

В настоящее время основными методами лечения пациентов с CDA является симптоматическая терапия, а именно заместительные трансфузии донорских эритроцитов и хелаторная терапия. Стандартное ведение пациента с CDA заключается в периодической оценке показателей гемограммы и метаболизма железа, а также необходим инструментальный мониторинг перегрузкой железом каждые 6 мес. Зачастую у пациентов с CDA вследствие неэффективного эритропоэза наблюдается снижение продукции гепсидина, что ведет к резкому усилению всасывания железа в желудочно-кишечном тракте и системной перегрузке железом и является основным осложнением у данной категории больных [10]. Если рассматривать данный феномен на молекулярном уровне, то потеря функции, в частности *SEC23B*, нарушает гликозилирование мембранных белков, которые участвуют в активации сигнального пути BMP-SMAD, что сопровождается снижением синтеза гепсидина как у пациентов, так и в клеточных моделях CDA [18].

Из-за противоречий в результатах описания серии клинических случаев достаточно неоднозначным клиническим эффектом обладает спленэктомия. Согласно последним рекомендациям по спленэктомии, кроме наследственного сфероцитоза, для которого имеются доказательства эффективности, эффективность спленэктомии в лечении CDA еще не до конца выяснена, также вызывают опасения отсроченные негативные эффекты в виде тромботических и инфекционных осложнений [19].

У большинства пациентов с CDA наблюдается анемия легкой или средней степени тяжести, которая не требует гемотрансфузионной терапии. Среди новорожденных с CDA I и II типов около 50% и 10% соответственно нуждаются как минимум в 1 гемотрансфузии, а некоторые пациенты впоследствии остаются трансфузионно-зависимыми. Кроме того, совместное наследование других гемоглобинопатий,

Рисунок 6
Схематичное изображение патогенеза CDA на молекулярном уровне (адаптировано из A. Iolascon [4])

Figure 6
Schematic representation of CDA pathogenesis at the molecular level (adapted from A. Iolascon [4])

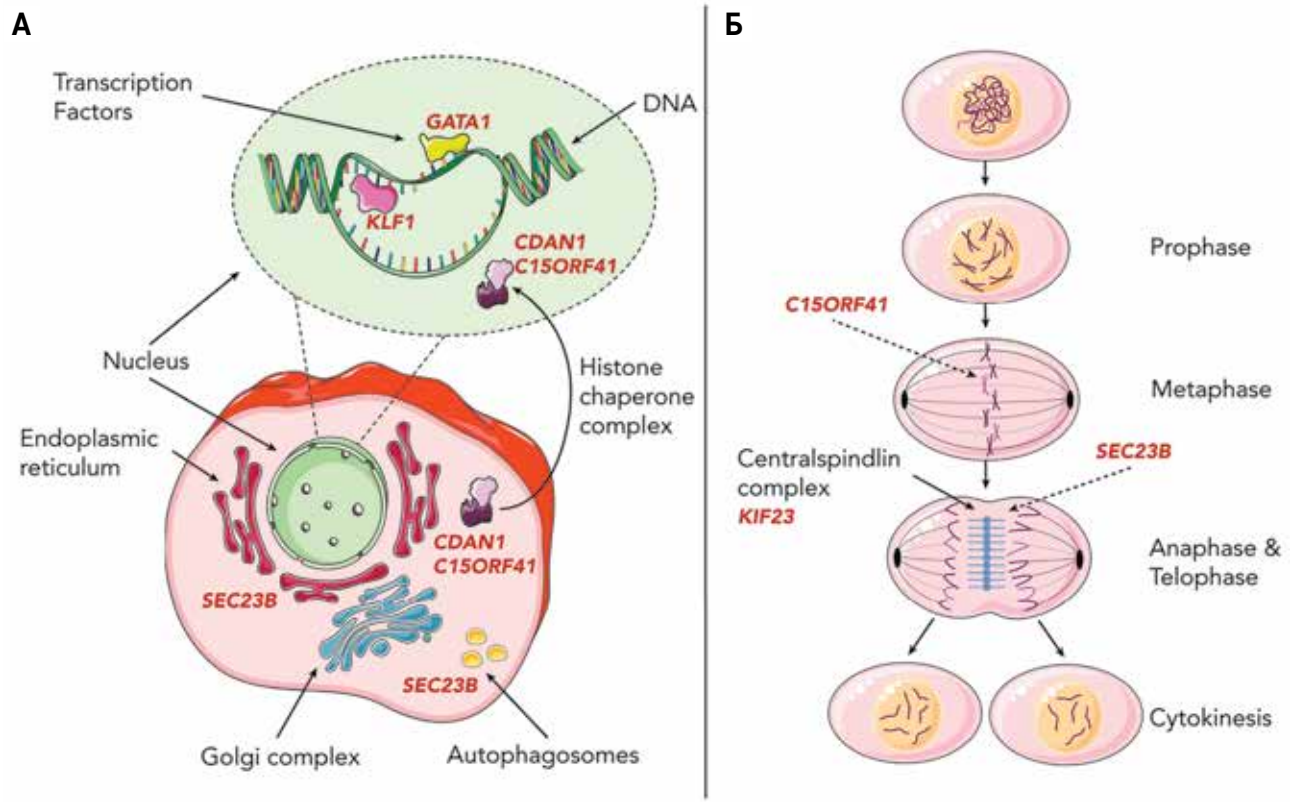


Таблица
Молекулярные и клинико-лабораторные изменения у пациентов с CDA

Table
Molecular and clinical and laboratory changes in patients with CDA

Тип CDA CDA type	Дефектный ген A defective gene	Локализация дефекта Defect localization	Тип наследования Type of inheritance	Количество описанных случаев The number of cases described	Изменения в КМ при оптической и электронной микроскопии Changes in BM under optical and electron microscopy	Показатели гемограммы Blood test results	Особенности лабораторной картины Peculiarities of the laboratory picture	Особенности клинической картины и фенотипа Peculiarities of clinical status and phenotype
Ia	*CDAN1*	15q15.2	Аутосомно-рецессивный Autosomal recessive	Менее 100 Less than 100	Эритробласты с 2 ядрами (3–7%), которые имеют тонкие хроматиновые мостики, гетерохроматин в виде «швейцарского сыра» Erythroblasts with two nuclei (3–7%) that have thin chromatin bridges, heterochromatin with a 'Swiss cheese' appearance	↑ MCV ↑ или/or N RET *Базофильная зернистость RBC *Basophilic granularity of RBC	↑↑ Лактатдегидрогеназа/ Lactate dehydrogenase ↑↑ Fe ↑↑↑ Ферритин/Ferritin ↓ Гаптоглобин/Haptoglobin	Врожденные аномалии: синдактилия кистей или стоп, отсутствие ногтей или сверхнормативные пальцы, деформация по типу голубиной груди и низкий рост Congenital anomalies: hand or foot syndactyly, missing nails or supernumerary fingers, pigeon chest deformity and short stature
Ib	*C15orf41*	15q14	Аутосомно-рецессивный Autosomal recessive	Менее 10 Less than 10				
II	*SEC23B*	20p11.23	Аутосомно-рецессивный Autosomal recessive	Более 200 More than 200	Большое количество эритробластов с 2 ядрами (10–30%), редкие многоядерные эритробласты, наличие двойной цитоплазматической мембраны A large number of erythroblasts with two nuclei (10–30%), rare multinucleated erythroblasts, the presence of a double cytoplasmic membrane	↓ N MCV ↑↑ RET	↑↑ Fe ↑↑ Ферритин/Ferritin *HEMPAS	Желтуха, спленомегалия Jaundice, splenomegaly
III	*KIF23*	15q21	Аутосомно-доминантный Autosomal dominant	Менее 20 Less than 20	Гигантские многоядерные (до 12) эритробласты, митохондрии содержат железо, множество «расщелин» в гетерохроматине Giant multinucleated erythroblasts that contain up to 12 nuclei, mitochondria contain iron, many "clefts" in heterochromatin	↑↑↑ MCV ↑↑ RET *Гигантские многоядерные RBC *Giant multinucleated RBC	N: Fe, ферритин/ferritin ↑ или/or N лактатдегидрогеназа/ lactate dehydrogenase, гаптоглобин/haptoglobin	Отсутствие гепатоспленомегалии Lack of hepatosplenomegaly
IV	*KLF1*	19p13.2	Аутосомно-доминантный Autosomal dominant	Менее 10 Less than 10	Эритробласты, содержащие 3 ядра и более, инвагинация ядерной мембраны, ядерное кровоизлияние Erythroblasts containing three or more nuclei, the invagination of the nuclear membrane, nuclear "hemorrhage"	N MCV ↑ или/or N RET *Ядросодержащие формы RBC *Nucleated forms of RBC	↑↑↑ Ферритин/Ferritin ↑↑ Fe	Низкий рост, гепатоспленомегалия, талассемические черты лица Short stature, hepatosplenomegaly, "thalassemia" facial features
XLTDA	*GATA1*	Xp11.23	Х-сцепленный рецессивный X-linked recessive	Менее 10 Less than 10	Мегалобластические черты эритропоэза, уменьшение α-гранул в тромбоцитах, диспластический фенотип тромбоцитов Megaloblastic features of erythropoiesis, reduced alpha-granules in platelets, and dysplastic platelet phenotype	↑↑ MCV, RET ↓ PLT	N: Fe, ферритин/ferritin ↑↑ Hb F	Низкий рост, гепатоспленомегалия, в редких случаях развитие желтухи Short stature, hepatosplenomegaly, in rare cases, the development of jaundice

таких как α- или β-талассемия, и мембранопатий, а также дефицит глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы отягощает клинический фенотип пациентов, приводя к наиболее выраженной трансфузионной зависимости [20, 21]. Длительные гемотрансфузии напрямую способствуют развитию вторичной перегрузки железом. Для ее лечения единственной терапевтической опцией является применение железохелатирующих средств. Рекомендации по хелаторной терапии у пациентов с CDA в целом соответствуют таковым у пациентов с талассемиями. Поэтому ранняя диагностика этих состояний имеет решающее значение для предотвращения перегрузки железом. Важно периодически оценивать параметры баланса железа в сыворотке крови, такие как ферритин, насыщение трансферрина, гепцидин, и оценивать накопление железа в печени и сердце с помощью неинвазивных методов, таких как T2-режим магнитно-резонансной томографии [22].

Другой спорной терапевтической опцией является применение интерферона (IFN)-2α, он эффективен у пациентов с мутацией гена *CDAN1*, ранее проведенные исследования продемонстрировали хороший гематологический ответ у пациентов на IFN-α. Но показывает ли он эффективность у пациентов с другими типами CDA, до конца остается неясным [9, 23]. Есть предположение, что носительство определенных полиморфизмов может увеличивать эффективность терапии IFN-2α. Исследования, проведенные на клеточных линиях, обработанных IFN-α, позволили установить, что он влияет на ряд важных сигнальных путей и транскрипционных факторов [24, 25]. Недавно проведенное исследование A. Abu-Quider и соавт. (2020) показало, что 6 из 7 пациентов, получавших пегилированный IFN-α, достигли трансфузионной независимости. Примечательно, что у пациентов, получавших пегилированный IFN-2α, снижается активность гемолиза, но сохраняется высокая концентрация ферритина. Возможно, IFN предотвращает непосредственный апоптоз эритроидных клеток, но при этом процессы дизэритропоэза не прекращаются [26]. E. Khattab и соавт. (2022) описали 2 пары сиблингов (брат и сестра) с диагнозом CDA I типа, которые получали пегилированный IFN-2α с последующим продолжительным гематологическим ответом [27].

Касательно применения витамина B_{12}, фолиевой кислоты и эритропоэтина можно однозначно сделать вывод о том, что данные препараты не имеют доказанного эффекта у пациентов с CDA.

В целом долгосрочный прогноз у пациентов с CDA благоприятный, однако трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) является единственной излечивающей опцией у них. В некоторых сообщениях описаны случаи, в которых показана эффективность ТГСК, но данные мировой литературы скудны, ограничиваются отдельными описаниями и небольшими ретроспективными исследованиями [21, 28–30]. M. Miano и соавт. (2019) провели масштабное ретроспективное исследование по оценке эффективности и безопасности ТГСК при CDA. В ретроспективный анализ были включены 39 пациентов, у всех наблюдалось приживление трансплантата. Показатели общей (ОВ) и бессобытийной (БСВ) выживаемости через 36 мес составили 71% и 45% соответственно. На исход влияли тип донора и предшествующая перегрузка железом: неродственный донор и предшествующая перегрузка железом коррелировали с худшими показателями ОВ и БСВ [31]. Другое менее масштабное ретроспективное исследование было проведено педиатрическим консорциумом по трансплантации костного мозга и клеточной терапии. В ретроспективный анализ включили 18 пациентов с CDA (13 пациентов с CDA II типа, 2 – с CDA I типа и 3 – с CDA неизвестного типа). У 4 из 18 пациентов зарегистрировано неприживление трансплантата после 2 или 3 ТГСК. При медиане наблюдения 3,2 года (диапазон от 0,6 до 14 лет) 2-летняя ОВ и БСВ составили 88% и 65% соответственно [32].

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

CDA – достаточно редкий тип наследственных анемий, в мире зарегистрировано больше 110 случаев CDA I типа, 300 случаев CDA II типа и меньше 30 случаев CDA III типа. В связи с общей клинико-лабораторной картиной с другими видами наследственных гемолитических анемий (например, дефицит пируваткиназы, наследственный стоматоцитоз) могут возникнуть трудности в постановке окончательного диагноза CDA [12, 33, 34].

На данный момент ТГСК остается единственной куративной опцией у пациентов с трансфузионнозависимыми формами CDA, которая показала многообещающие результаты в лечении данной патологии, однако к их интерпретации нужно относиться с осторожностью из-за ограниченной выборки исследований. В работе Европейского общества трансплантации крови и КМ были продемонстрированы достаточно неплохие результаты ТГСК у пациентов с CDA, что, возможно, подчеркивает потенциал трансплантации в качестве терапевтической опции. Данное исследование показало, что показатели ОВ и БСВ через 36 мес составили 71% и 45% соответственно. В текущем исследовании собрана самая крупная когорта пациентов, подвергшихся ТГСК при CDA. В ранее опубликованных статьях размеры выборки были намного меньше, они включали в общей сложности 13 пациентов с CDA I–III типов [35].

Для лечения наследственных анемий постоянно тестируются альтернативные фармакологические опции. Новые фармакологические агенты, которые воздействуют на трансформирующий фактор роста-β (TGF-β), а именно луспатерцепт и сотатерцепт, рассматриваются в качестве потенциальных средств лечения CDA II типа и дают обнадеживающие результаты.

Отдельно хотелось бы остановиться на роли сигнализации TGF-β в регуляции гемопоэза. Она играет важную роль в регуляции нишевых взаимодействий между гемопоэтическими стволовыми клетками и другими клеточными структурами. У части пациентов с наследственными анемиями и миелодиспластическим синдромом происходит функциональная активация сигнальных кофакторов или лигандов TGF-β, таких как факторы дифференцировки роста (GDF), которые в основном секретируются гемопоэтическими и мезенхимальными стволовыми клетками [36]. В норме сигнализация TGF-β проявляется миелосупрессивными свойствами и подавляет эритроидную дифференцировку путем индукции апоптоза и остановки клеточного цикла в эритробластах [37, 38]. Во время физиологической пролиферации и дифференцировки происходит подавление активности сигнализации TGF-β, это приводит к снижению экспрессии GDF [39]. В эксперименте на лабораторных животных было показано, что постоянная стимуляция GDF вызывает анемию и гиперплазию эритроидных клеток [40]. Гипотетически в гемопоэтических стволовых клетках у этих пациентов должны наблюдаться сверхэкспрессия и повышенный уровень фосфорилированного Smad2/3, который активирует транскрипцию генов-мишеней *TGF-β*.

В связи с вышеперечисленными патогенетическими изменениями были разработаны препараты-«ловушки» лигандов активиновых рецепторов (луспатерцепт, сотатерцепт), которые направлены на коррекцию неэффективного эритропоэза. Эти фармакологические агенты показали обнадеживающие результаты в фазах I и II клинических испытаний для пациентов с β-талассемией [41].

Данные препараты состоят из внеклеточного домена этого TGF-β-рецептора, соединенного с Fc-доменом человеческого иммуноглобулина G1. Изначально эти препараты были разработаны для повышения минеральной плотности костной ткани при злокачественных заболеваниях костей путем захвата активинов, однако помимо коррекции остеопороза выявлено их плейотропное действие на эритропоэз. Экспериментально было показано, что RAP-011 быстро улучшал неэффективный эритропоэз и снижал перегрузку железом в мышиных моделях, вызванную химиотерапией и β-талассемией, снижая оксидативный стресс и индуцируя апоптоз в незрелых эритробластах [38, 42]. Параллельно с этим лечение RAP-011 способствовало более быстрой пролиферации и дифференцировке в результате ингибирования GDF [43]. Таким образом, предполагается, что луспатерцепт и сотатерцепт действуют на эритропоэз в гемопоэтических стволовых клетках опосредованно, через секрецию стромальными клетками КМ модулирующих факторов, в то время как пролиферативные способности эритроидных предшественников остаются неизменными.

В связи с общими клинико-лабораторными проявлениями у пациентов с β-талассемией и CDA II типа D. Rosa и соавт. (2017) провели оценку эффективности аналога сотатерцепта, RAP-011, в клеточной модели CDA II типа. По результатам исследования препарат RAP-011 подавляет ActRIIA/B-путь и ингибирует суперсемейство TGF-β, что, в свою очередь, повышает активность транскрипционного фактора GATA1 и приводит к увеличению экспрессии таргетных генов *GATA1*, участвующих в пролиферации и дифференцировке эритроидных предшественников [44].

Аутологичная трансфузия генетически отредактированных клеток в перспективе, возможно, заменит аллогенную ТГСК и станет единственной куративной опцией для пациентов с дизэритропоэтическими анемиями. Это разрешит некоторые ограничения аллогенной ТГСК, такие как инфекционные процессы, связанные с длительной иммуносупрессией, ограниченная доступность HLA-совместимых доноров или развитие болезни «трансплантат против хозяина». Данный метод в качестве опции использовался для лечения многих генетически детерминированных заболеваний, связанных с патологией эритроцитов, таких как β-талассемия, серповидноклеточная болезнь или дефицит пируваткиназы [45, 46].

S. Pellegrin и соавт. (2018) провели работу по оценке эффективности лентивирусной трансдукции на клеточных моделях CDA II типа. Авторы впервые продемонстрировали, что лентивирусная трансдукция p60-BBF2H7 в эритроидные клетки-предшественники вызывает увеличение активности трансактиватора SEC23A и его сохранение во время процессов терминальной дифференцировки в p60-BBF2H7, она не вызывала негативного влияния на пролиферацию и последующую дифференцировку эритробластов. Генная терапия *in vitro* привела к повышению экспрессии *SEC23A* и последующей нормализации уровня SEC23 для компенсации мутированного *SEC23B* у пациентов с CDA II типа [47].

D. Rodriguez и соавт. (2021) применили эту стратегию для коррекции CDA на модели мышей с нокаутом гена *SEC23B*. По результатам исследования после трансдукции дефектных гемопоэтических клеток лентивирусными векторами наблюдалась нормализация продукции белка SEC23B, что сопровождалось частичным восстановлением эритроидных

колониеобразующих единиц и ускорению пролиферации эритроидных предшественников. Кроме того, повышался уровень гликозилирования поверхностных мембранных белков и снижался процент дефектных эритроидных клеток с измененным количеством ядер [48].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

CDA относятся к гетерогенной группе генетически детерминированных монолинейных цитопений. Молекулярно-генетические исследования дефектных генов показали, что дизэритропоэтические анемии имеют различные молекулярные механизмы, которые вызывают нарушения процессов пролиферации и дифференцировки в ходе эритропоэза. Некоторые неправильно транслированные белки участвуют в процессах сборки хроматина и модификации гистонов, например белок CDN1 при CDA I типа. Другие являются транскрипционными факторами, участвующими в синтезе многих белков, важных для дифференцировки эритроидных предшественников, например *KLF1* и *GATA1* при CDA IV типа.

Одной из сложностей в диагностике является тот факт, что CDA характеризуются общностью клинико-лабораторной картины с другими наследственными гемолитическими анемиями. Для диагностики этой группы заболеваний крайне важно проводить молекулярно-генетическую диагностику.

Несмотря на успехи в понимании молекулярных механизмов в патогенезе CDA, остается неясным, почему процессы эритропоэза чувствительны к дефектам генов *CDAN1* и *SEC23B*, ведь белки CDAN1 и SEC23B экспрессируются во многих тканях и органах. На сегодняшний день идентифицировано множество генов, ассоциированных с развитием CDA, но каким образом это приводит к развитию морфологических изменений (многоядерности) также до конца остается неясным.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ
Не указан.

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

ORCID
Klyukhin V.V. ORCID: https://orcid.org/0009-0000-6734-0331
Smetanina N.S. ORCID: https://orcid.org/0000-0003-2756-7325

Литература / References

1. Bianchi P., Fermo E., Vercellati C., Boschetti C., Barcellini W., Iurlo A., et al. Congenital dyserythropoietic anemia type II (CDAII) is caused by mutations in the *SEC23B* gene. Hum Mutat 2009; 30 (9): 1292–8. DOI: 10.1002/humu.21077
2. Crookston J.H., Crookston M.C., Burnie K.L., Francombe W.H., Dacie J.V., Davis J.A., Lewis S.M. Hereditary erythroblastic multinuclearity associated with a positive acidifiedserum test: a type of congenital dyserythropoietic anaemia. Br J Haematol 1969; 17 (1): 11–26.
3. Heimpel H., Wendt F. Congenital dyserythropoietic anemia with karyorrhexis and multinuclearity of erythroblasts. Helv Med Acta 1968; 34 (2): 103–15
4. Iolascon A., Andolfo I., Russo R. Congenital dyserythropoietic anemias. Blood 2020; 136 (11): 1274–83. DOI: 10.1182/blood.2019000948
5. Amir A.Z., Horev G., Yacobovich J., Bennett M., Tamary H. Distal limb anomalies in patients with congenital dyserythropoietic anemia. Am J Med Genet A 2017; 173 (2): 487–90. DOI: 10.1002/ajmg.a.38012
6. Heimpel H., Kellermann K., Neuschwander N., Högel J., Schwarz K. The morphological diagnosis of congenital dyserythropoietic anemia: results of a quantitative analysis of peripheral blood and bone marrow cells. Haematologica 2010; 95 (6): 1034–6. DOI: 10.3324/haematol.2009.014563
7. Resnitzky P., Shaft D., Shalev H., Kapelushnik J., Dgany O., Krasnov T., Tamary H. Morphological features of congenital dyserythropoietic anemia type I: The role of electron microscopy in diagnosis. Eur J Haematol 2017; 99 (4): 366–71. DOI: 10.1111/ejh.12931
8. Gambale A., Iolascon A., Andolfo I., Russo R. Diagnosis and management of congenital dyserythropoietic anemias. Expert Rev Hematol 2016; 9 (3): 283–96. DOI: 10.1586/17474086.2016.1131608
9. Roy N.B.A., Babbs C. The pathogenesis, diagnosis, and management of congenital dyserythropoietic anaemia type I. Br J Haematol 2019 May;185(3):436-449. doi: 10.1111/bjh.15817. Epub 2019 Mar 5. PMID: 30836435; PMCID: PMC6519365.
10. Russo R., Gambale A., Langella C., Andolfo I., Unal S., Iolascon A. Retrospective cohort study of 205 cases with congenital dyserythropoietic anemia type II: definition of clinical and molecular spectrum and identification of new diagnostic scores. Am J Hematol 2014; 89 (10): E169–75. DOI: 10.1002/ajh.23800
11. Schwarz K., Iolascon A., Verissimo F., Trede N.S., Horsley W., Chen W., et al. Mutations affecting the secretory COPII coat component SEC23B cause congenital dyserythropoietic anemia type II. Nat Genet 2009; 41 (8): 936–40. DOI: 10.1038/ng.405
12. Iolascon A., Heimpel H., Wahlin A., Tamary H. Congenital dyserythropoietic anemias: molecular insights and diagnostic approach. Blood 2013; 122 (13): 2162–6. DOI: 10.1182/blood-2013-05-468223
13. Liljeholm M., Irvine A.F., Vikberg A.L., Norberg A., Month S., Sandström H.,

et al. Congenital dyserythropoietic anemia type III (CDA III) is caused by a mutation in kinesin family member, *KIF23*. Blood 2013; 121 (23): 4791–9. DOI: 10.1182/blood-2012-10-461392
14. Arnaud L., Saison C., Helias V., Lucien N., Steschenko D., Giarratana M.C., et al. A dominant mutation in the gene encoding the erythroid transcription factor KLF1 causes a congenital dyserythropoietic anemia. Am J Hum Genet 2010; 87 (5): 721–7. DOI: 10.1016/j.ajhg.2010.10.010
15. Jaffray J.A., Mitchell W.B., Gnanapragasam M.N., Seshan S.V., Guo X., Westhoff C.M., et al. Erythroid transcription factor EKLF/KLF1 mutation causing congenital dyserythropoietic anemia type IV in a patient of Taiwanese origin: review of all reported cases and development of a clinical diagnostic paradigm. Blood Cells Mol Dis 2013; 51 (2): 71–5. DOI: 10.1016/j.bcmd.2013.02.006
16. Siatecka M., Bieker J.J. The multifunctional role of EKLF/KLF1 during erythropoiesis. Blood 2011; 118 (8): 2044–54. DOI: 10.1182/blood-2011-03-331371
17. Varricchio L., Planutis A., Manwani D., Jaffray J., Mitchell W.B., Migliaccio A.R., Bieker J.J. Genetic disarray follows mutant KLF1-E325K expression in a congenital dyserythropoietic anemia patient. Haematologica 2019; 104 (12): 2372–80. DOI: 10.3324/haematol.2018.209858
18. Rosato B.E., Marra R., D'Onofrio V., Del Giudice F., Della Monica S., Iolascon A., et al. SEC23B Loss-of-Function Suppresses Hepcidin Expression by Impairing Glycosylation Pathway in Human Hepatic Cells. Int J Mol Sci 2022; 23 (3): 1304. DOI: 10.3390/ijms23031304
19. Iolascon A., Andolfo I., Barcellini W., Corcione F., Garçon L., De Franceschi L., et al.; Working Study Group on Red Cells and Iron of the EHA. Recommendations regarding splenectomy in hereditary hemolytic anemias. Haematologica 2017; 102 (8): 1304–13. DOI: 10.3324/haematol.2016.161166
20. Shalev H., Kapelushnik J., Moser A., Dgany O., Krasnov T., Tamary H. A comprehensive study of the neonatal manifestations of congenital dyserythropoietic anemia type I. J Pediatr Hematol Oncol 2004; 26 (11): 746–8. DOI: 10.1097/00043426-200411000-00011
21. Iolascon A., Sabato V., de Mattia D., Locatelli F. Bone marrow transplantation in a case of severe, type II congenital dyserythropoietic anaemia (CDA II). Bone Marrow Transplant 2001; 27 (2): 213–5. DOI: 10.1038/sj.bmt.1702764
22. Angelucci E., Barosi G., Camaschella C., Cappellini M.D., Cazzola M., Galanello R., et al. Italian Society of Hematology practice guidelines for the management of iron overload in thalassemia major and related disorders. Haematologica 2008; 93 (5): 741–52. DOI: 10.3324/haematol.12413
23. Babbs C., Roberts N.A., Sanchez-Pulido L., McGowan S.J., Ahmed M.R., Brown J.M., et al.; WGS500 Consortium. Homozygous mutations in a predicted endonuclease are a novel cause of congenital dyserythropoietic anemia type I. Haematologica 2013; 98 (9): 1383–7. DOI: 10.3324/haematol.2013.089490
24. Persico M., Capasso M., Russo R., Persico E., Crocè L., Tiribelli C., Iolascon A. Elevated expression and polymorphisms of SOCS3 influence patient response to antiviral therapy in chronic hepatitis C. Gut 2008; 57 (4): 507–15. DOI: 10.1136/gut.2007.129478
25. Iolascon A., Volinia S., Borriello A., Giordani L., Moretti A., Servedio V., et al. Genes transcriptionally modulated by interferon alpha2a correlate with the cytokine activity. Haematologica 2004; 89 (9): 1046–53.
26. Abu-Quider A., Asleh M., Shalev H., Fruchtman Y., Ben-Harosh M., Beck G., Kapelushnik J. Treatment of transfusion-dependent congenital dyserythropoietic anemia Type I patients with pegylated interferon alpha-2a. Eur J Haematol 2020; 105 (2): 216–22.
27. Khattab E., Abu Shanap M., Rihani R., Hashem H., Sultan I. Treatment of two Jordanian siblings with congenital dyserythropoeitic anemia – type 1 busing interferon-alpha-2a. Hemasphere 2022; 6 (Suppl): 2113–4. DOI: 10.1097/01.HS9.0000851800.23872.fb
28. Ayas M., al-Jefri A., Baothman A., al-Mahr M., Mustafa M.M., Khalil S., et al. Transfusion-dependent congenital dyserythropoietic anemia type I successfully treated with allogeneic stem cell transplantation. Bone Marrow Transplant 2002; 29 (8): 681–2. DOI: 10.1038/sj.bmt.1703526
29. Braun M., Wölfl M., Wiegering V., Winkler B., Ertan K., Bald R., et al. Successful treatment of an infant with CDA type II by intrauterine transfusions and postnatal stem cell transplantation. Pediatr Blood Cancer 2014; 61 (4): 743–5. DOI: 10.1002/pbc.24786
30. Unal S., Russo R., Gumruk F., Kuskonmaz B., Cetin M., Sayli T., et al. Successful hematopoietic stem cell transplantation in a patient with congenital dyserythropoietic anemia type II. Pediatr Transplant 2014; 18 (4): E130–3. DOI: 10.1111/petr.12254
31. Miano M., Eikema D.J., Aljurf M., Van't Veer P.J., Öztürk G., Wölfl M., et al. Stem cell transplantation for congenital dyserythropoietic anemia: an analysis from the European Society for Blood and Marrow Transplantation. Haematologica 2019; 104 (8): e335–9. DOI: 10.3324/haematol.2018.206623
32. Rangarajan H.G., Stanek J.R., Abdel-Azim H., Modi A., Haight A., McKinney C.M., et al. Hematopoietic cell transplantation for congenital dyserythropoietic anemia: a report from the pediatric transplant and cellular therapy consortium. Transplant Cell Ther 2022; 28 (6): 329.e1–9. DOI: 10.1016/j.jtct.2022.03.007
33. Andolfo I., Russo R., Rosato B.E., Manna F., Gambale A., Brugnara C., Iolascon A. Genotype-phenotype correlation and risk stratification in a cohort of 123 hereditary stomatocytosis patients. Am J Hematol 2018; 93 (12): 1509–17.
34. Zaninoni A., Fermo E., Vercellati C., Consonni D., Marcello A.P., Zanella A., et al. Use of laser assisted optical rotational cell analyzer (LoRRca MaxSis) in the diagnosis of RBC membrane disorders, enzyme defects, and congenital dyserythropoietic anemias: a monocentric study on 202 patients. Front Physiol 2018; 9: 451.

35. Miano M., Eikema D.J., Aljurf M., Van't Veer P.J., Öztürk G., Wölfl M., et al. Stem cell transplantation for congenital dyserythropoietic anemia: an analysis from the European Society for Blood and Marrow Transplantation. Haematologica 2019; 104 (8): e335–9. DOI: 10.3324/haematol.2018.206623
36. Carrancio S., Markovics J., Wong P., Leisten J., Castiglioni P., Groza M.C., et al. An activin receptor IIA ligand trap promotes erythropoiesis resulting in a rapid induction of red blood cells and haemoglobin. Br J Haematol 2014; 165 (6): 870–82. DOI: 10.1111/bjh.12838
37. Del Rey M., Benito R., Fontanillo C., Campos-Laborie F.J., Janusz K., Velasco-Hernández T., et al. Deregulation of genes related to iron and mitochondrial metabolism in refractory anemia with ring sideroblasts. PLoS One 2015; 10 (5): e0126555. DOI: 10.1371/journal.pone.0126555
38. Blank U., Karlsson S. TGF-β signaling in the control of hematopoietic stem cells. Blood 2015; 125 (23): 3542–50. DOI: 10.1182/blood-2014-12-618090
39. Dussiot M., Maciel T.T., Fricot A., Chartier C., Negre O., Veiga J., et al. An activin receptor IIA ligand trap corrects ineffective erythropoiesis in β-thalassemia. Nat Med 2014; 20 (4): 398–407. DOI: 10.1038/nm.3468
40. Bhagat T.D., Zhou L., Sokol L., Kessel R., Caceres G., Gundabolu K., et al. miR-21 mediates hematopoietic suppression in MDS by activating TGF-β signaling. Blood 2013; 121 (15): 2875–81. DOI: 10.1182/blood-2011-12-397067
41. Cappellini M.D., Porter J., Origa R., Forni G.L., Voskaridou E., Galactéros F., et al. Sotatercept, a novel transforming growth factor β ligand trap, improves anemia in β-thalassemia: a phase II, open-label, dose-finding study. Haematologica 2019; 104 (3): 477–84. DOI: 10.3324/haematol.2018.198887
42. Zermati Y., Fichelson S., Valensi F., Freyssinier J.M., Rouyer-Fessard P., Cramer E., et al. Transforming growth factor inhibits erythropoiesis by blocking proliferation and accelerating differentiation of erythroid progenitors. Exp Hematol 2000; 28 (8): 885–94. DOI: 10.1016/s0301-472x(00)00488-4
43. Jabbour E., Kantarjian H.M., Koller C., Taher A. Red blood cell transfusions and iron overload in the treatment of patients with myelodysplastic syndromes. Cancer 2008; 112 (5): 1089–95. DOI: 10.1002/cncr.23280
44. De Rosa G. Unraveling the molecular pathogenesis of ineffective erythropoiesis in congenital dyserythropoietic anemia type II: *in vitro* evaluation of Rap-011 treatment. 2020.
45. Garcia-Gomez M., Calabria A., Garcia-Bravo M., Benedicenti F., Kosinski P., López-Manzaneda S., et al. Safe and efficient gene therapy for pyruvate kinase deficiency. Mol Ther 2016; 24 (7): 1187–98. DOI: 10.1038/mt.2016.87
46. Locatelli F., Thompson A.A., Kwiatkowski J.L., Porter J.B., Thrasher A.J., Hongeng S., et al. Betibeglogene autotemcel gene therapy for non-β^0/β^0 genotype β-thalassemia. N Engl J Med 2022; 386 (5): 415–27. DOI: 10.1056/NEJMoa2113206
47. Pellegrin S., Haydn-Smith K.L., Hampton-O'Neil L.A., Hawley B.R., Heesom K.J., Fermo E., et al. Transduction with BBF2H7/CREB3L2 upregulates SEC23A protein in erythroblasts and partially corrects the hypo-glycosylation phenotype associated with CDAII. Br J Haematol 2019; 184 (5): 876–81. DOI: 10.1111/bjh.15189
48. Dessy-Rodriguez M., Fañanas-Baquero S., Venturi V., Payan S., Tornador C., Hernández G., et al. Lentiviral Gene Therapy for the Correction of Congenital Dyserythropoietic Anemia Type II. Blood 2021; 138 (Suppl 1): 1994. DOI: 10.1182/blood-2021-152332

DOI: 10.24287/1726-1708-2025-24-2-140-146

© 2025 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России

Поступила 16.03.2025
Принята к печати 18.04.2025

EDN: ZAEOUC

Контактная информация:
Батаев Али Саидхасанович, врач-гематолог стационара кратковременного лечения ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России
Адрес: 117997, Москва, ул. Саморы Машела, 1
E-mail: ali.bataev@dgoi.ru

Новые терапевтические опции для лечения трансфузионно-зависимой формы анемии Даймонда–Блекфена

А.С. Батаев, В.В. Клюхин, Н.С. Сметанина

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

Анемия Даймонда–Блекфена – редкое заболевание из группы врожденных синдромов костномозговой недостаточности, характерной чертой которого является угнетение эритропоэза, обусловленное интенсивными процессами апоптоза эритроидных предшественников вследствие дефекта биосинтеза рибосом. Классические опции при терапии анемии Даймонда–Блекфена включают в себя длительное применение глюкокортикостероидов и трансфузии донорских эритроцитов, однако такие подходы в долгосрочной перспективе приводят к развитию отдаленных неблагоприятных событий, что стимулирует поиск альтернативных методов терапии. В данной работе рассмотрены современные представления об этиопатогенезе и терапии этого заболевания.
Ключевые слова: *анемия Даймонда–Блекфена, RPS19, элтромбопаг*

Батаев А.С. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2025; 24 (2): 140–6.
DOI: 10.24287/1726-1708-2025-24-2-140-146

© 2025 by «D. Rogachev NMRCPHOI»

Received 16.03.2025
Accepted 18.04.2025

Correspondence:
Ali S. Bataev, a hematologist at the Short-Term Treatment Facility at 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., 117997, Moscow, Russia
E-mail: ali.bataev@dgoi.ru

New therapeutic options for the treatment of transfusion-dependent Diamond–Blackfan anemia

A.S. Bataev, V.V. Klyukhin, N.S. Smetanina

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

Diamond–Blackfan anaemia is a rare congenital bone marrow failure syndrome characterized by suppression of erythropoiesis due to intense apoptosis of erythroid precursors resulting from defective ribosome biosynthesis. Classic options for the treatment of Diamond–Blackfan anaemia include long-term glucocorticosteroid therapy and transfusion of donor red blood cells. However, these approaches eventually lead to late adverse events, which stimulates the search for alternative therapies. In this paper, we review the current knowledge of the pathogenesis and therapy of this disease.
Key words: *Diamond–Blackfan anemia, RPS19, eltrombopag*

Bataev A.S., et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology 2025; 24 (2): 140–6.
DOI: 10.24287/1726-1708-2025-24-2-140-146

Анемия Даймонда–Блекфена (АДБ) – наследственный синдром недостаточности костного мозга, характеризующийся аплазией эритроцитарного ростка (часто в сочетании со скелетными аномалиями и низким ростом, которые классически проявляются в течение первого года жизни) в виде макроцитарно-нормохромной анемии и низким содержанием ретикулоцитов [1, 2]. По различным данным, частота встречаемости АДБ составляет 5–7 случаев на 1 млн новорожденных [2–5]. Диагноз устанавливается в среднем в возрасте 2–3 месяцев, при этом в 95% случаев АДБ диагностируется в возрасте до 2 лет, а в 99% – до 5 лет. В 13–16% случаев АДБ диагностируется при рождении [6]. Заболевание наследуется по аутосомно-доминантному типу. В основе патогенеза лежит апоптоз эритроидных предшественников в костном мозге вследствие дефекта биосинтеза рибосом. Генетические дефекты рибосомальных генов присутствуют примерно в 60–70% случаев АДБ и являются непосредственной причиной нарушения эритропоэза [2]. Наиболее часто, примерно в 25% случаев АДБ, встречаются поломки гена *RPS19*, который кодирует малую субъединицу рибосомального белка (RP) (*рисунок 1*) [7, 8].

Традиционные методы лечения АДБ включают заместительные трансфузии донорских эритроцитов или длительное применение глюкокортикостероидов [9]. Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) является единственным куративным методом лечения, но в силу различных факторов она не всегда бывает осуществима [10]. В целях достижения трансфузионной независимости у пациентов с АДБ в мировой литературе есть данные о применении трифлуоперазина, сотатерцепта, леналидомида, ритуксимаба, однако на данный момент удовлетворительных результатов получено не было [11–14]. Свою эффективность продемонстрировал L-лейцин, тем не менее у большей части пациентов данная терапия не

позволяет добиться трансфузионной независимости [15, 16]. Таким образом, существует значительная потребность в альтернативных методах терапии этого заболевания.

Патогенез

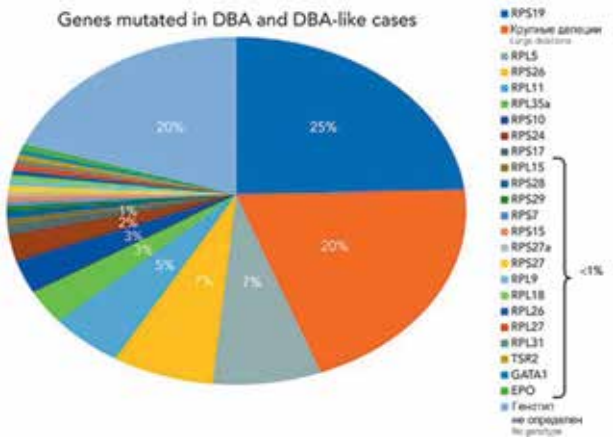
Белок RPS19 занимает особое место в созревании 18S рибосомальной РНК (рРНК) и синтезе 40S в клетках человека. Мутации, ассоциированные с RPS19, могут нарушать процессинг пре-рРНК субъединиц 18S р-РНК и пре-40S, что, в свою очередь, и вызывает снижение продукции рибосомальных субъединиц 40S [2, 8].

Снижение инициации трансляции гена *RPS19* оказывает негативное влияние на нормальную дифференцировку и продукцию первичных гемопоэтических клеток-предшественников из-за усиления апоптоза [8]. Предположительно апоптоз в клетках вызывает механизм «рибосомального стресса». Дефицит одного RP нарушает сборку ядрышковых рибосом, что приводит к накоплению других RP, которые проникают в нуклеоплазму. Свободные RP, такие как RPL5, RPL11, RPL7, RPL23, RPL27, связываются с MDM2 и препятствуют его взаимодействию с p53 (в норме взаимодействие MDM2 с p53 усиливает деградацию последнего), что стабилизирует p53 и приводит к апоптозу, остановке клеточного цикла и в итоге – к гипоплазии [8, 17, 18]. Имеются предположения, что дисбаланс между синтезом глобина и продукцией гема при АДБ также является результатом дисфункции рибосом, что косвенно приводит к усилению клеточного стресса железом и гибели эритроидных предшественников (*рисунок 1*). В исследовании S. Rio и соавт. продемонстрировано, как активация адаптивных внутриклеточных путей помогает избавиться от избытка гема в культуре клеток пациентов с АДБ с мутациями генов *RPL5* и *RPL11*, тем самым ограничивая токсичность свободного гена. Однако повышенная экспрессия гемовых экспортеров была недостаточной для предотвращения токсичности у пациентов с гаплонедостаточностью *RPL5* или *RPL11* при АДБ. Напротив, при менее тяжелом фенотипе (т. е. у пациентов с АДБ, имеющих поломки гена *RPS19*) повышенная экспрессия этих адаптивных путей, направленных на устранение избытка гема, была достаточной для снижения токсичности железа. Авторы пришли к выводу, что мутации генов, отличных от *RPS19*, приводят к значительному дисбалансу между синтезом глобина и гема, что ведет к избытку последнего и впоследствии – к аплазии эритроидного ростка [19].

В патофизиологической парадигме, предложенной Z. Yang и соавт. (2016), выдвинут механизм развития анемии при АДБ и миелодиспластическом синдроме, который обусловлен замедлением синтеза

Рисунок 1
Графическое распределение наиболее распространенных мутаций при АДБ (адаптировано из L. Da Costa и соавт. [2])

Figure 1
A graphical representation of the distribution of the most common mutations in patients with Diamond–Blackfan anemia (DBA) (adapted from L. Da Costa et al. [2])



глобинов и вторичной гемовой токсичностью. Исследования продемонстрировали молекулярные маркеры замедления трансляции глобинов в эритроидных предшественниках, это ведет к вторичному накоплению гема и увеличению содержания реактивных форм кислорода, что, в свою очередь, приводит к гибели проэритробластов [20]. Дефицит фактора транскрипции GATA1, возможно, является следствием этого процесса и способствует возникновению дисбаланса между глобином и гемом [19]. Также было показано, что возникающая гаплонедостаточность рибосом задерживает трансляцию глобиновых белков в эритроидных клетках, в то время как синтез гема, небелкового железосодержащего компонента гемоглобина, протекает нормально. Поскольку гем впервые синтезируется на стадии проэритробластов или непосредственно перед ней, в этих клетках свободный гем находится в избытке по сравнению с глобином. Высокие концентрации свободного гема вызывают гибель эритроидных клеток-предшественников (проэритробластов), что приводит к остановке дифференцировки эритроидного ряда [21]. На основе изложенных данных можно выдвинуть гипотезу о том, что у пациентов с АДБ применение фармакологических агентов, направленных на снижение или замедление синтеза гема в проэритробластах может способствовать восстановлению баланса между синтезом гема и глобина. Однако важно отметить, что апоптоз эритроидных предшественников, связанный с избытком гема, не является единственным и ключевым механизмом развития аплазии эритроидного ростка кроветворения у пациентов с АДБ. При наиболее часто встречающейся мутации гена *RPS19* избыточное накопление гема компенсировалось активацией внутриклеточных путей, ответственных

за утилизацию свободного железа [19]. Для более точного понимания молекулярных механизмов апоптоза эритроидных предшественников при различных генотипах АДБ необходимы дальнейшие исследования.

Новые опции в терапии анемии Даймонда–Блекфена

В недавних исследованиях изучалось использование элтромбопага, агониста рецептора тромбопоэтина (ТПО), в качестве потенциального метода лечения АДБ. ТПО представляет собой ключевой цитокин, который инициирует пролиферацию и дифференцировку предшественников мегакариоцитов, взаимодействуя с рецептором ТПО, кодируемым геном *c-MPL*. Это связывание активирует различные сигнальные каскады, что в конечном итоге приводит к экспрессии генов, способствующих увеличению продукции тромбоцитов. Кроме того, ТПО играет важную роль в поддержании ГСК, обеспечивая регуляцию клеточного цикла. Альтернативно он может стимулировать дифференцировку стволовых клеток и усиливать пролиферацию других клеточных линий в сочетании с воздействием других гемопоэтических цитокинов [21–23].

Элтромбопаг – это пероральный синтетический молекулярный агонист рецепторов ТПО, одобренный для лечения пациентов с апластической анемией, иммунной тромбоцитопенией, тромбоцитопенией, вызванной вирусом гепатита С [24–26].

Рецепторы ТПО экспрессируются и функционируют не только на мегакариоцитах, но и наиболее ранних гемопоэтических клетках. Гемопоэтические эффекты элтромбопага в первую очередь зависят от его взаимодействия с доменом рецептора ТПО (ТПО-R/c-mpl) и активации нижележащих сигнальных каскадов в клетках-мишенях [24]. Элтромбопаг взаимодействует с трансмембранным доменом рецептора ТПО и инициирует каскад передачи сигнала, напоминающий таковой для эндогенного ТПО, что сопровождается индукцией пролиферации и дифференцировки мегакариоцитов и клеток-предшественников в костном мозге. В лабораторных условиях было показано, что элтромбопаг эффективно снижает свободный пул железа, приводя к уменьшению продукции индуцированных железом активных форм кислорода [20].

Выполнен ряд исследований на клеточных моделях АДБ, которые продемонстрировали эффективность применения агонистов рецепторов ТПО.

Y.R. Kao и соавт. (2018) продемонстрировали, что элтромбопаг стимулирует самообновление стволовых клеток и их многостадийную дифференцировку на мышиных ГСК, а также у пациентов, проходящих лечение по поводу иммунной тромбоцитопении. Исследования также показали, что на мышиных ГСК, лишенных рецепторов ТПО, элтромбопаг может стимулировать самообновление стволовых клеток, предположительно, за счет снижения внутриклеточных пулов свободного железа [27].

H. Qanash и соавт. (2021) в условиях *in vitro* с использованием индуцированных плюрипотентных стволовых клеток показали, что добавление элтромбопага к дефектным плюрипотентным стволовым клеткам внутриклеточно связывает свободный пул железа, тем самым снижая токсические эффекты избыточного свободного гема в эритроидных предшественниках. Данный механизм был доказан на моделях плюрипотентных стволовых клеток, где элтромбопаг улучшил эритроидную дифференцировку путем хелирования внутриклеточного железа, приводя к снижению концентрации реактивных форм кислорода и повышению выживаемости и созревания проэритробластов. В дополнение к этому исследования, проведенные на экспериментальных животных, имеющих мутацию гена *RPS19*, продемонстрировали, что выраженные железохелатирующие свойства элтромбопага способны нейтрализовать токсические эффекты, связанные с избытком гема. Это, в свою очередь, способствует улучшению процесса эритропоэза как в мутантных, так и в нормальных гемопоэтических клетках. Сравнительные исследования продемонстрировали, что элтромбопаг более эффективно способствует улучшению дифференцировки предшественников по сравнению с другими хелаторами железа, такими как дефероксамин, который менее эффективно связывает свободный пул железа. В то же время деферазирокс, другой хелатор железа, также показал свою эффективность на клеточных моделях индуцированных плюрипотентных стволовых клеток [21].

В мировой литературе описаны немногочисленные клинические случаи использования элтромбопага у пациентов с АДБ. Первое сообщение о клинической эффективности элтромбопага при АДБ было сделано T. Winkler и соавт. в 2016 г. [28]. Авторы представили случай 28-летнего пациента с установленным диагнозом АДБ с мутацией гена *RPS19*. Данный пациент не ответил на терапию глюкокортикостероидами и был трансфузионно-зависимым. Он вошел в клиническое исследование, нацеленное на оценку эффективности и безопасности агониста рецепторов ТПО элтромбопага у больных апластической анемией и у пациентов с недостаточностью костного мозга, сопровождающейся однолинейной цитопенией (ClinicalTrials.gov: NCT01328587). Элтромбопаг назначался в начальной дозе 50 мг/день с последующей эскалацией на 25 мг каждые 2 нед до достижения максимальной дозы 300 мг/день. К 16-й неделе терапии отмечался полный ответ, и пациент

стал трансфузионно-независимым. Далее элтромбопаг продолжали в той же дозе в течение 3 мес, на исходе последнего месяца гемоглобин составлял 119 г/л, препарат был отменен, после чего гемоглобин пациента неуклонно снижался в течение 8 мес, в связи с чем прием препарата был возобновлен в дозировке 300 мг. Через 7 лет динамического наблюдения у пациента продолжался длительный устойчивый ответ на фоне поддерживающей дозы элтромбопага 25 мг/день. Авторы предположили, что дополнительно к хелаторным способностям элтромбопага одним из потенциальных механизмов ответа на терапию данным препаратом является стимуляция MPL-экспрессирующих ГСК [29].

B. Duncan и соавт. провели одноцентровое пилотное исследование по оценке безопасности и эффективности применения элтромбопага у пациентов с АДБ [30]. В исследовании приняли участие 15 трансфузионно-зависимых пациентов. Элтромбопаг назначался перорально в фиксированной начальной дозе 150 мг/сут для пациентов в возрасте 12 лет и старше, 75 мг/сут – в возрасте 6–11 лет и 2,5 мг/кг/сут – в возрасте 2–5 лет.

По результатам исследования ответ получен у 1 из 15 пациентов, при этом следует отметить, что в 41% случаев наблюдался тромбоцитоз, что потребовало снижения дозы или длительного прекращения приема элтромбопага. В остальных аспектах препарат проявил хорошую переносимость, что полностью согласуется с ранее накопленным опытом его применения. Исследователи предположили, что более высокая доза элтромбопага оказала бы более выраженный эффект на эритропоэз, однако тромбоцитоз, связанный с препаратом, являлся препятствием для повышения его дозы, учитывая, что даже в данном исследовании 9 из 15 пациентов потребовалось снижение дозы или полная отмена препарата из-за количества тромбоцитов за пределами нормального диапазона. Другой точкой зрения являлось то, что длительная терапия элтромбопагом в низких дозировках позволила бы добиться больше гематологических ответов, не приводя при этом к выраженной активации тромбоцитарного ростка.

В предыдущих клинических и доклинических исследованиях были получены убедительные доказательства стимуляции эритропоэза при применении элтромбопага. Каков ведущий механизм в реализации данного эффекта, пока неясно. Возможно, это связано со способностью элтромбопага к связыванию внутриклеточного железа, тем самым восстанавливая баланс между синтезом гема и глобина и предотвращая апоптоз. Однако в таком случае неясно, почему терапия классическими хелаторами (деферазирокс, дефероксамин), которую получают почти все больные АДБ, не приводит к гематологическому ответу. Связано ли это с особенностями хелатирующих свойств элтромбопага или с чем-то другим – предстоит изучить. С другой стороны, давно известно, что элтромбопаг может непосредственно стимулировать ГСК и прогениторные предшественники [24], вследствие чего, возможно, происходит заполнение эритроидного «отсека» в костном мозге. Данный механизм может реализовываться у пациентов с мутацией гена *RPS19*, при которой, как показано, наблюдается снижение пролиферации клеток-предшественников, а конечная дифференцировка эритроцитов остается ненарушенной [31] (*рисунок 2*). Либо же имеет место сочетание двух вышеупомянутых механизмов, что позволяет добиться гематологического ответа у пациентов с АДБ.

На сегодняшний день существуют другие перспективные варианты альтернативной терапии, направленные на минимизацию негативных последствий, связанных с дисбалансом между гемом и глобином, а также с другими отрицательными эффектами, такими как токсичность, вызванная избытком активных форм кислорода и нарушением регуляции *GATA1*. Одним из перспективных лекарственных агентов является битопертин. Он представляет собой селективный ингибитор основного транспортера глицина (GlyT1) в предшественниках эритроцитов, так как глицин является ранним и важнейшим субстратом в биосинтезе гема, ингибирование его транспорта путем блокирования GlyT1 снижает его доступность для последующего синтеза гема. Это послужило фундаментальной платформой для создания клинического исследования (NCT05828108) по применению битопертина у пациентов с АДБ, также он уже проходит этап клинических исследований у пациентов с эритропоэтической протопорфирией (NCT05308472) [30].

Использование генно-инженерных ГСК и человеческих клеток-предшественников является потенциальной терапевтической стратегией для лечения наследственных заболеваний крови. Использование в качестве платформы лентивирусных векторов для *ex vivo* коррекции ГСК было успешно применено для терапии первичных иммунодефицитов [32], гемоглобинопатий [33] и метаболических нарушений [34]. Весьма перспективной мишенью для генной терапии АДБ был предложен транскрипционный фактор GATA1, в настоящее время обсуждается использование вирусных векторов в целях улучшения экспрессии GATA1, что также дает преимущество для воздействия на большинство генотипов при АДБ [35]. Успешная разработка генной терапии для *RPS19*-дефицитного варианта АДБ открывает возможности для коррекции других генетических нарушений при АДБ, в частности таких как *RPL5* и *RPL11*.

Еще одной возможной терапевтической опцией при трансфузионно-зависимой форме АДБ является сиролимус. Препарат сиролимус (рапамицин) – ингибитор мишени рапамицина млекопитающих (mTOR-I), являясь пролекарством, он связывается с цитозольным белком FKBP12, образуя комплекс FKBP12/рапамицин, и ингибирует активацию mTOR [36].

Было продемонстрировано, что на животных моделях человеческих рибосомопатий сиролимус стимулирует аутофагию (защитный механизм, который поддерживает гомеостаз путем удаления лишних и дисфункциональных клеточных компонентов), тем самым снижая протеотоксический стресс, вызванный рибосомопатией, и скорость апоптоза [37]. Кроме того, показано, что сиролимус усиливает пролиферацию незрелых эритробластов на мышиных моделях при других формах неэффективного эритропоэза, действуя посредством метаболического перепрограммирования, снижения окислительного стресса и индукции аутофагии [38, 39].

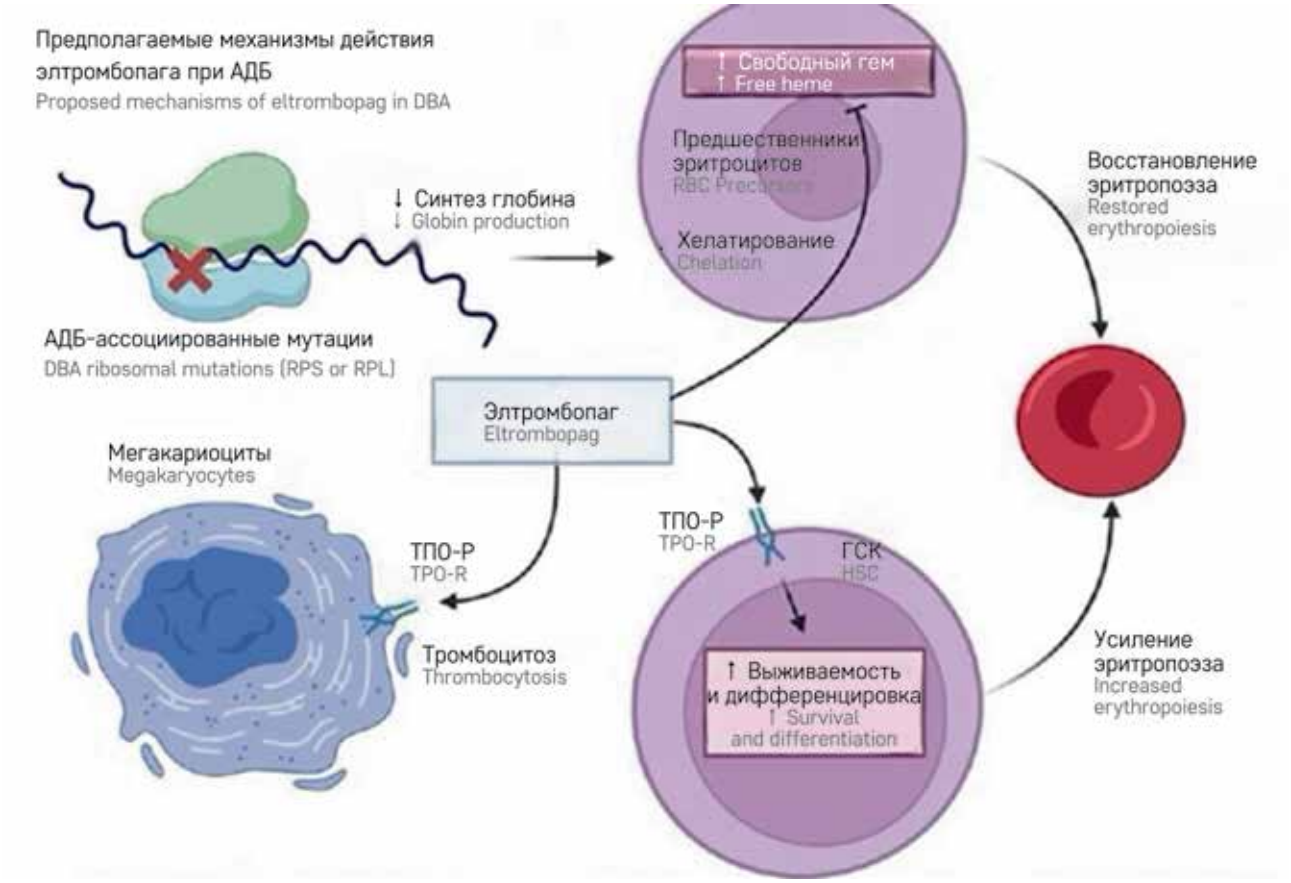
Кроме того, перспективным направлением лечения АДБ является генная терапия с использованием инструментов редактирования генома CRISPR-Cas9. Он уже показал свой терапевтический эффект при коррекции таких генетических детерминированных заболеваний крови, как серповидно-клеточная анемия и β-талассемия [40, 41]. Инструменты редактирования генома позволяют напрямую редактировать гены с помощью редакторов оснований или специфическую область энхансера *BCL11A* с помощью CRISPR-Cas9, или доставлять в полном размере терапевтический участок гена с помощью Cas9 и вирусных векторов через гомологичную рекомбинацию в ГСК [42, 43]. Вышеперечисленные стратегии также могут быть рассмотрены для разработки генной терапии АДБ в будущем. Однако обращает на себя внимание тот факт, что поскольку у пациентов с АДБ наблюдается активация p53, при использовании геномного редактирования необходимо учитывать генотоксические риски.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Традиционные методы терапии АДБ, такие как кортикостероиды, трансфузии эритроцитарной массы, хотя и остаются основой лечения, сопряжены с серьезными побочными эффектами, что обусловли-

Рисунок 2
Гипотетические механизмы воздействия агонистов рецепторов ТПО на гемопоэтические клетки-предшественники (адаптировано из B. Duncan и соавт. [31])

Figure 2
Hypothetical mechanisms underlying the effect of thrombopoietin receptor agonists on hematopoietic progenitor cells (adapted from B. Duncan et al. [31])



вает необходимость поиска альтернативных методов терапии. В перспективе интеграция новых подходов в лечении может значительно минимизировать зависимость от гемотрансфузий, что заметно улучшит качество и продолжительность жизни пациентов.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ
Не указан.

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

ORCID
Bataev A.S. ORCID: https://orcid.org/0000-0001-8166-1158
Klyukhin V.V. ORCID: https://orcid.org/0009-0000-6734-0331
Smetanina N.S. ORCID: https://orcid.org/0000-0003-2756-7325

Литература / References

1. Khincha P., Savage S. Neonatal manifestations of inherited bone marrow failure syndromes. Semin Fetal Neonatal Med 2016; 21 (1): 57–65.
2. Da Costa L., Leblanc T., Mohandas N. Diamond–Blackfan anemia. Blood 2020; 136 (11): 1262–73.
3. Willig T., Niemeyer C., Leblanc T., Tiemann C., Robert A., Budde J., et al. Identification of new prognosis factors from the clinical and epidemiologic analysis of a registry of 229 Diamond–Blackfan anemia patients. Pediatr Res 1999; 46: 553–61.
4. Ulirsch J., Verboon J., Kazerounian S., Guo M., Yuan D., Ludwig L., et al. The genetic landscape of Diamond–Blackfan anemia. Am J Hum Genet 2018; 103 (6): 930–47.
5. Чернов В.М., Овсянникова Г.С., Юдина Н.Б., Рогов А.В., Соколова Н.Е., Шамин А.В. и др. Медико-частотные характеристики анемии Даймонда–Блекфена у детей в Российской Федерации. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2019; 18 (3): 22–8. DOI: 10.24287/1726-1708-2019-18-3-22-28 [Chernov V.M., Ovsyannikova G.S., Yudina M.B., Rogov A.V., Sokolova N.E., Shamin A.V., et al. Epilemiological characteristics of Diamond–Blackfen anemia in pediatric population of the Russian Federation. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology 2019; 18 (3): 22–8. (In Russ.)].
6. Vlachos A., Ball S., Dahl N., Alter B., 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.
7. Choesmel V., Bacqueville D., Rouquette J., Noaillac-Depeyre J., Fribourg S., Crétien A., et al. Impaired ribosome biogenesis in Diamond–Blackfan anemia. Blood 2007; 109 (3): 1275–83.
8. Engidaye G., Melku M., Enawgaw B. Diamond–Blackfan anemia: genetics, pathogenesis, diagnosis and treatment. EJIFCC. 2019; 30 (1): 67–81.
9. Bartels M., Bierings M. How I manage children with Diamond–Blackfan anaemia. Br J Haematol 2018; 184: 123–33.
10. Diaz-De-Heredia C., Bresters D., Faulkner L., Yesilipek A., Strahm B., Miano M., et al. Recommendations on hematopoietic stem cell transplantation for patients with Diamond–Blackfan anemia. On behalf of the pediatric diseases and severe aplastic anemia working parties of the EBMT. Bone Marrow Transplant 2021; 56: 2956–63.
11. Vlachos A. Pilot phase I/II study of amino acid leucine in treatment of patients with transfusion-dependent Diamond–Blackfan anemia. ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01362595
12. Wiestner A. Rituximab to treat moderate aplastic anemia, pure red cell aplasia, or Diamond–Blackfan anemia. ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00229619.
13. Gotlib R. Pilot lenalidomide in adult Diamond–Blackfan anemia patients w/RBC transfusion-dependent anemia. ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01034592.
14. Vlachos A. The use of trifluoperazine in transfusion dependent DBA (DBA). ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03966053.
15. Vlachos A., Atsidaftos E., Lababidi M., Muir E., Rogers Z., Alhushki W., et al. L-leucine improves anemia and growth in patients with transfusion-dependent Diamond–Blackfan anemia: Results from a multicenter pilot phase I/II study from the Diamond–Blackfan Anemia Registry. Pediatr Blood Cancer 2020; 67 (12): e28748.
16. Ovsyannikova G., Poloznikov A., Maschan M., Smetanina N. Response to L-Leucine Therapy in patients with Daimond–Blakfan anemia and serum L-leucine concentrations. Blood 2015; 126 (23): 3619.
17. Arbiv O., Cuvelier G., Klaassen R., Fernandez C., Robitaille N., Steele M., et al. Molecular analysis and genotype-phenotype correlation of Diamond–Blackfan anemia. Clin Genet 2018; 93 (2): 320–8.
18. Bhoopalan S., Yen J., Mayuranathan T., Mayberry K., Yao Y., Lillo Osuna M., et al. An RPS19-edited model for Diamond-Blackfan anemia reveals TP53-dependent impairment of hematopoietic stem cell activity. JCI Insight 2023; 8 (1): e161810.
19. Rio S., Gastou M., Karboul N., Derman R., SuriyunT., Manceau H., et al. Regulation of globin-heme balance in Diamond–Blackfan anemia by HSP70/GATA1. Blood 2019; 133 (12): 1358–70.
20. Yang Z., Keel S., Shimamura A., Liu L., Gerds A., Li H., et al. Delayed globin synthesis leads to excess heme and the macrocytic anemia of Diamond–Blackfan anemia and del(5q) myelodysplastic syndrome. Sci Transl Med 2016; 8 (338): 338–67.
21. Qanash H., Li Y., Smith R., Linask K., Young-Baird S., Hakami W., et al. Eltrombopag improves erythroid differentiation in a human induced pluripotent stem cell model

of Diamond–Blackfan anemia. Cells 2021; 10: 734.
22. Yoshihara H., Arai F., Hosokawa K., Hagiwara T., Takubo K., Nakamura Y., et al. Thrombopoietin/MPL signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence and interaction with the osteoblastic niche. Cell Stem Cell 2007; 1 (6): 685–97.
23. Bussel J., Kulasekararaj A., Cooper N., Verma A., Steidl U., Semple J., et al. Mechanisms and therapeutic prospects of thrombopoietin receptor agonists. Semin Hematol 2019; 56 (4): 262–78.
24. Townsley D., 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: 1540–50.
25. Bussel J., Cheng G., Saleh M., Psaila B., Kovaleva L., Meddeb B., et al. Eltrombopag for the treatment of chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. N Engl J Med 2007; 357: 2237–47.
26. McHutchison J., Dusheiko G., Shiffman M., Rodriguez-Torres M., Sigal S., Bourliere M., et al. Eltrombopag for thrombocytopenia in patients with cirrhosis associated with hepatitis C. N Engl J Med 2007; 357: 2227–36.
27. Kao Y., Chen J., Narayanagari S., Todorova T., Aivalioti M., Ferreira M., et al. Thrombopoietin receptor-independent stimulation of hematopoietic stem cells by eltrombopag. Sci Transl Med 2018; 10 (458): eaas9563.
28. Winkler T., Townsley D., Desmond R., Dumitriu B., Grasmeder S., Young N.S., et al. Successful treatment of a Diamond–Blackfan anemia (DBA) patient with eltrombopag. Blood 2016; 128 (22): 2682.
29. Xing F., Desmond R., Winkler T., Young D., Dumitriu B., Townsley D., et al. Eltrombopag for patients with moderate aplastic anemia or uni-lineage cytopenias. Blood Adv 2020; 4 (8): 1700–10.
30. Winter M., Funk J., Körner A., Alberati D., Christen F., Schmitt G., et al. Effects of GlyT1 inhibition on erythropoiesis and iron homeostasis in rats. Exp Hematol 2016; 44 (10): 964–74.
31. Duncan B., Lotter J., Superata J., Barranta M., Machado T., Darden I., et al. Treatment of refractory/relapsed Diamond–Blackfan anaemia with eltrombopag. Br J Haematol 2024; 204 (5): 2077–85.
32. Hacein-Bey-Abina S., Hauer J., Lim A., Picard C., Wang G., Berry C., et al. Efficacy of gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. N Engl J Med 2010; 363: 355–64.
33. Thompson A.A., Walters M.C., Kwiatkowski J., Rasko J.E.J., Ribeil J.A., Hongeng S., et al. Gene therapy in patients with transfusion-dependent beta-thalassemia. N Engl J Med 2018; 378: 1479–93.
34. Sessa M., Lorioli L., Fumagalli F., Acquati S., Redaelli D., Baldoli C., et al. Lentiviral haemopoietic stem-cell gene therapy in early-onset metachromatic leukodystrophy: an ad-hoc analysis of a non-randomised, open-label, phase 1/2 trial. Lancet 2016; 388: 476–87.
35. Richard A., Voit X., Cohen B., Armant M., Kamal E., Mei-Mei Huang W., et al. Regulated expression of *GATA1* as a gene therapy cure for Diamond–Blackfan anemia. Blood 2022; 140: 986–7.
36. Del Borrello G., Miano M., Micalizzi C., Lupia M., Ceccherini I., Grossi A., et al. Sirolimus restores erythropoiesis and controls immune dysregulation in a child with cartilage-hair hypoplasia: A case report. Front Immunol 2022; 13: 893000.
37. Recasens-Alvarez C., Alexandre C., Kirkpatrick J., Nojima H., Huels D., Snijders A., et al. Ribosomopathy-associated mutations cause proteotoxic stress that is alleviated by TOR inhibition. Nat Cell Biol 2021; 23: 127–35.
38. Zhang X., Campreciós G., Rimmelé P., Liang R., Yalcin S., Mungamuri S., et al. FOXO3-mTOR metabolic cooperation in the regulation of erythroid cell maturation and homeostasis. Am J Hematol 2014; 89: 954–63.
39. Acar M., Jupelli M., MacBeth K., Schwickart M. Rapamycin (Sirolimus) and Rap-536 increase red blood cell parameters through distinct mechanisms in wild-type and thalassemic mice. Blood 2020; 136: 17.
40. Vale M., Prochazka J., Sedlacek R. Towards a cure for Diamond–Blackfan anemia: views on gene therapy. Cells 2024; 13 (11): 920.
41. Newby G., Yen J., Woodard K., Mayuranathan T., Lazzarotto C., Li Y., et al. Base editing of haematopoietic stem cells rescues sickle cell disease in mice. Nature 2021; 595: 295–302.
42. Frangoul H., Altshuler D., Cappellini M., Chen Y., Domm J., Eustace B., et al. *CRISPR-Cas9* gene editing for sickle cell disease and beta-thalassemia. N Engl J Med 2021; 384: 252–60.
43. Vakulskas C., Dever D., Rettig G., Turk R., Jacobi A., Collingwood M., et al. A high-fidelity Cas9 mutant delivered as a ribonucleoprotein complex enables efficient gene editing in human hematopoietic stem and progenitor cells. Nat Med 2018; 24: 1216–24.

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*