

ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«РЕСПУБЛИКАНСКИЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЦЕНТР
ДЕТСКОЙ ОНКОЛОГИИ, ГЕМАТОЛОГИИ И ИММУНОЛОГИИ»

Объект авторского права
УДК 616.155.194.7-08-036-053.2

ЕМЕЛЬЯНОВА
Ирма Владимировна

**ПРОГНОЗИРОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ
И СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ТЕРАПИИ У ДЕТЕЙ
С ТЯЖЕЛОЙ ПРИОБРЕТЕННОЙ АПЛАСТИЧЕСКОЙ АНЕМИЕЙ**

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук
по специальности 14.01.21 — гематология и переливание крови

Минск, 2024

Научная работа выполнена в учреждении здравоохранения «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии»

Научный руководитель **Углова Татьяна Алексеевна,**
кандидат медицинских наук, доцент, ведущий научный сотрудник лаборатории клинических исследований научного отдела Центра детской онкологии, гематологии и иммунологии

Официальные оппоненты **Климкович Наталья Николаевна,**
доктор медицинских наук, доцент, заведующий кафедрой детской онкологии, гематологии и иммунологии Института повышения квалификации и переподготовки кадров здравоохранения учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет»

Ходулева Светлана Александровна,
кандидат медицинских наук, доцент кафедры внутренних болезней № 1 с курсами эндокринологии и гематологии государственного учреждения «Гомельский государственный медицинский университет»

Оппонирующая организация государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека»

Защита состоится «24» апреля 2024 г. в 14:00 на заседании совета по защите диссертаций Д 03.03.01 при государственном учреждении «Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии», по адресу: 220053, г. Минск, ул. Семашко, 8, e-mail: Iskrov@m9kb.by, телефон ученого секретаря (017) 277-20-18.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке государственного учреждения «Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии»

Автореферат разослан «22» марта 2024 года.

Ученый секретарь совета
по защите диссертаций,
кандидат медицинских наук, доцент



И.А. Исков

ВВЕДЕНИЕ

Приобретенная апластическая анемия (ПАА) у детей – орфанное, потенциально жизнеугрожающее заболевание, характеризующееся панцитопенией в периферической крови (ПК) и снижением клеточности костного мозга (КМ) без признаков патологического кроветворения и фиброза [Bueno C. et al., 2014]. Частота встречаемости в Северной Америке и Европе составляет 2 на 1 млн населения, в Азии – в 2–3 раза выше [Montane E. et al., 2008]. В Республике Беларусь заболеваемость составляет $0,228 \pm 0,020$ на 100 тыс. детского населения с ежегодным приростом 1,93 % [Кугейко Т. Б. и др. 2018].

Первой линией терапии у детей с тяжелой ПАА (тПАА) является аллогенная (алло) трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) от совместимого родственного донора [Marsh J. et al., 2009; Passweg J. et al., 2010; Scheinberg P. et al., 2012]. При отсутствии совместимого родственного донора пациенты получают иммуносупрессивную терапию (ИСТ) [Sakaguchi H. et al., 2014; Rogers Z. et al., 2019]. Общая выживаемость (ОВ) при проведении ИСТ составляет 83–90 %, а бессобытийная выживаемость (БСВ) – 64–71 % [Rogers Z. et al., 2019; Führer M. et al., 2005; Yoshimi A. et al., 2014; Scheinberg P. et al., 2008; Gu C. et al., 2019; Nair V. et al., 2012; Huang J. et al., 2021]. ИСТ связана со значительным риском рецидивов и развитием клональных заболеваний. В конечном итоге почти половина (55 %) пациентов, получивших ИСТ, подвергаются в дальнейшем алло-ТГСК от неродственного донора [Dufour C. et al., 2015]. БСВ при проведении алло-ТГСК от альтернативного донора после проведения 1-ой ИСТ составляет $74,9 \% \pm 9 \%$, а при проведении в первой линии терапии – $92 \% \pm 5 \%$ при наличии полностью совместимого неродственного донора и/или гаплоидентичной (гапло) ТГСК. [Dufour C. et al., 2015; Choi Y. et al., 2017]. Оптимальный срок проведения алло-ТГСК от неродственного донора – 3–4 месяца от диагностики заболевания [Choi Y. et al., 2017]. Однако, высокая частота реакции «трансплантат – против – хозяина» (РТПХ) сдерживает применение ТГСК от неродственного донора в первой линии терапии. [Choi Y.V. et al., 2017]. При гапло-ТГСК острая РТПХ I степени развивается у 52,2 % пациентов детского возраста, II–IV степени – у 47,8 %, хроническая РТПХ – у 30,4–47,7 % [Choi Y. et al., 2017; Lu Y. et al., 2018]. Развитие РТПХ требует усиления ИСТ, что сопряжено со склонностью к тяжелым инфекциям и резким ухудшением качества жизни [Kroemeke, A. et al., 2018]. Поэтому крайне важно выявление группы пациентов, у которых существует высокая вероятность ответа на ИСТ, а также идентификация кандидатов для раннего проведения алло-ТГСК от альтернативного донора.

Выявлению предикторов эффективности ИСТ у пациентов детского возраста посвящены единичные работы. Предложенные несколько потенциальных предикторов ответа на ИСТ, отражающих, по-видимому, иммунную патофизиологию данного заболевания, не были в полной мере подтверждены другими исследователями и не получили широкого применения, возможно, потому, что число детей, включенных в исследование, было относительно небольшим, а препараты, используемые для ИСТ, не были идентичными [Gu C. et al., 2019; Yoshida N. et al., 2008; Zaimoku Y. et al., 2022]. Причиной угнетения кроветворения при ПАА является не только иммунная агрессия в отношении гемопоэтических клеток-предшественников. Нормальное кроветворение осуществляется в тесной связи со стромальным микроокружением, главной составляющей которого являются мезенхимальные стволовые клетки (МСК), способные подавлять иммунные конфликты [Le Blanc K. et al., 2006], замещать и восстанавливать функции поврежденных негемопоэтических тканей [Prockop D. et al., 1997], поддерживать кроветворение при котрансплантации с гемопоэтическими стволовыми клетками (ГСК), воздействуя на их пролиферацию [Le Blanc K. et al., 2007]. В настоящее время нет единого мнения о функционировании МСК при ПАА [Basigalupo A. et al., 2005; Шевела Е. и др., 2010; Герасимова Л. и др., 2008; Yang S. et al., 2010], и практически все исследования о роли МСК при тПАА и целесообразности их применения при проведении ИСТ проводились на взрослой популяции пациентов [Fouillard L. et al., 2003; Jaganathan B. et al., 2010; Xiao Y. et al., 2013]. Поэтому исключительно актуальным является изучение МСК у пациентов детского возраста с ПАА, позволяющее уточнить степень повреждения стромы КМ и её способность к восстановлению, а также разработка метода интеграции МСК в существующую ИСТ для интенсификации последней без усиления агрессивного воздействия в целом на детский организм.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Связь работы с крупными научными программами (проектами), темами. Научное исследование на базе Государственного учреждения «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии» в рамках задания ГНТП № 08.16 по теме НИР «Разработать и внедрить метод комплексного лечения апластической анемии у детей с применением трансплантации мезенхимальных стволовых клеток» (2016–2019 гг.).

Цель и задачи исследования

Цель исследования: улучшить результаты лечения пациентов детского возраста с тяжелой приобретенной апластической анемией путем индивидуализации терапевтической тактики на основе уточнения прогностических факторов, а также обоснования и клинического применения аллогенного биомедицинского клеточного продукта (БМКП) МСК в ходе проведения ИСТ.

Задачи исследования:

1. Определить предикторы гематологического ответа (ГО) на ИСТ у пациентов детского возраста с тПАА.
2. Оценить роль аллельных вариантов геномной ДНК, выделенной из клеток КМ, в прогнозе эффективности ИСТ у пациентов детского возраста с тПАА.
3. Изучить свойства МСК КМ пациентов детского возраста с тПАА и разработать метод применения аллогенного БМКП МСК при проведении у них ИСТ.
4. Провести анализ эффективности применения аллогенного БМКП МСК у пациентов детского возраста с тПАА.

Объектом исследования являлись пациенты в возрасте от 1 года до 18 лет с тПАА.

Предмет исследования – показатели общего анализа крови, субпопуляции лимфоцитов периферической крови, пролиферативная активность клеток костного мозга, предшественники гемопоэза и мезенхимальные стволовые клетки, выделенные из костного мозга, кумулятивная частота полного гематологического ответа, общая выживаемость, бессобытийная выживаемость.

Научная новизна

1. Впервые установлено, что у пациентов детского возраста с тПАА предикторами ГО ИСТ являются абсолютное число гранулоцитов (АЧГ) и абсолютное число ретикулоцитов (АЧР) ПК на момент постановки диагноза, а также такие лабораторные параметры, определяемые на 64 день терапии, как АЧР ПК, относительный уровень CD19+ лимфоцитов ПК, количество колониеобразующих единиц гранулоцитов и макрофагов (КОЕ-ГМ) и бурст-образующих единиц эритроцитов (БОЕ-Э) КМ как в среде без ростовых факторов (РФ), так и при культивировании клеток-предшественников в среде с РФ.

2. Впервые разработан алгоритм прогнозирования ИСТ у пациентов детского возраста с тПАА с учетом пролиферативной активности предшественников гемопоэза *in vitro*.

3. Впервые доказано, что у пациентов детского возраста с тПАА наличие аллельных вариантов с.178_179insCCGCAGCGGCCGCAGCGC в гене *MSH3*, с.С4480G в гене *POLE* и с.С327С в гене *POLD1* являлось неблагоприятным прогностическим фактором ИСТ.

4. Впервые установлено, что МСК КМ пациентов детского возраста с тПАА характеризуются сниженной пролиферативной активностью, повышенным адипогенным потенциалом, ослаблением функциональной способности поддержки гемопоэза.

5. Впервые разработан эффективный метод применения аллогенного БМКП МСК при проведении ИСТ у пациентов детского возраста с тПАА.

Положения, выносимые на защиту

1. Гематологический ответ на 180 день ИСТ у пациентов детского возраста с тПАА предопределяет ее потенциальную эффективность. Основными предикторами гематологического ответа на 180 день ИСТ являются определяемые на 64 день ИСТ количество колониеобразующих единиц гранулоцитов и макрофагов без ростовых факторов, равное 9 колониям на 10^5 клеток КМ, бурст-образующих единиц эритроцитов в среде с ростовыми факторами, равное 3 колониям на 10^5 клеток КМ, а также относительный уровень CD19+ лимфоцитов ПК, равный 5,1 %.

2. Общая выживаемость пациентов детского возраста с тПАА с выявленным гетерозиготным аллельным вариантом с.А4576G в гене *ATR* геномной ДНК, выделенной из клеток КМ, составила 100 %, а пациентов с аллельным вариантом с.178_179insCCGCAGCGGCCGCAGCGC в гене *MSH3* – 0 %.

ОВ пациентов с аллельными вариантами с.С4480G в гене *POLE*, с.С327С в гене *POLD1* и с.178_179insCCGCAGCGGCCGCAGCGC в гене *MSH3* достоверно ниже, чем в группе пациентов без данных нарушений ($p = 0,0029$).

3. МСК, полученные из КМ пациентов детского возраста с тПАА, по сравнению с аналогичными МСК условно здоровых детей характеризуются сниженной пролиферативной способностью ($p = 0,005$), повышенным адипогенным потенциалом ($p = 0,0001$) и ослаблением способности поддерживать пролиферацию CD34+ клеток.

4. Введение БМКП МСК пациентам детского возраста с тПАА при проведении ИСТ приводит к снижению CD3+CD8+ и CD3+HLA-DR лимфоцитов ПК ($p < 0,05$), увеличению числа колониеобразующих единиц

фибробластов КМ ($p < 0,05$), увеличению бессобытийной выживаемости пациентов ($p = 0,05$).

Личный вклад соискателя ученой степени

Автором проведен анализ литературных данных по теме исследования, обследование и лечение большинства анализируемых пациентов, заполнение электронной базы данных «Клинический регистр детей с ПАА» на основе детского канцер-субрегистра для эпидемиологического анализа, базы данных «Access», анализ полученных результатов (личный вклад 90 %). Совместно с ведущим программистом отдела АСУ О.И. Быдановым выполнена статистическая обработка полученных результатов исследования. Совместно со старшим научным сотрудником лаборатории генетических биотехнологий А.А. Мигасом, проведена обработка данных, полученных при экзомном секвенировании архивных образцов геномной ДНК, выделенной из клеток КМ. Совместно с заведующим лабораторией клеточных биотехнологий и цитотерапии, к.б.н., доцентом Я.И. Исайкиной разработана инструкция по применению «Метод лечения пациентов с приобретенной апластической анемией с использованием аллогенных мезенхимальных стволовых клеток», утвержденная Министерством здравоохранения Республики Беларусь (личный вклад – 75 %). Личный вклад соискателя в подготовку публикаций в соавторстве 2,95 авторских листа составляет 80 % и объемом 0,53 авторских листа – 100 %.

Апробация диссертации и информация об использовании ее результатов

Материалы и основные положения диссертации доложены на научных форумах: XV Международной конференции «Актуальные вопросы детской онкологии, гематологии и иммунологии» (31 октября – 1 ноября 2019 г., Минск, Республика Беларусь), I Объединенном конгрессе НОДГО и РОДО «Актуальные проблемы и перспективы развития детской онкологии и гематологии в Российской Федерации» (23–25 ноября 2020 г., г. Москва, Россия), Республиканской научно-практической конференции «Анемии матери и ребенка» (27 ноября 2020 г., г. Гомель, Республика Беларусь), XVI Международной видеоконференции «Актуальные вопросы детской онкологии, гематологии и иммунологии» (21–21 октября, 2021 г., г. Минск, Республика Беларусь), XVI Международном симпозиуме памяти Р. М. Горбачевой «Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток. Генная и клеточная терапия» Санкт-Петербург (15–17 сентября 2022 г., г. Санкт-Петербург, Россия), XVII Международной конференции

с международным участием «Актуальные вопросы детской онкологии, гематологии и иммунологии» (20–21 октября 2022 г., г. Минск, Республика Беларусь), IX-м Республиканском съезде трансфузиологов и гематологов с международным участием в честь 90-летия службы крови Республики Беларусь (11–12 мая 2023 г., г. Минск, Республика Беларусь), семинаре «Клеточные и генные технологии в лечении онкогематологических заболеваний» в рамках Международной специализированной выставки «Здравоохранение Беларуси–2023» (24 мая 2023, г. Минск, Республика Беларусь), всероссийском конгрессе с международным участием «Инновации в детской гематологии, онкологии и иммунологии: от науки к практике» (01–03 июня 2023 г., г. Москва, Россия).

Министерством здравоохранения Республики Беларусь 25 апреля 2019 года утверждена инструкция по применению «Метод лечения пациентов с приобретенной апластической анемией с использованием аллогенных мезенхимальных стволовых клеток» (№ 049 – 0419). Результаты исследования внедрены в практику государственного учреждения «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии». Оформлены 3 рационализаторские предложения: 1) «Применение теста на колониеобразующую способность предшественников гемопоэза для диагностики приобретенной апластической анемии у детей»; 2) «Мониторинг колониеобразующей способности клеток предшественников гемопоэза для оценки эффективности иммуносупрессивной терапии у пациентов с приобретенной апластической анемией»; 3) «Алгоритм прогнозирования гематологического ответа к 180 дню иммуносупрессивной терапии пациентов детского возраста с приобретенной апластической анемией».

Опубликованность результатов диссертации

По теме диссертации опубликовано 12 научных работ: 7 статей в рецензируемых журналах, соответствующих п. 19 Положения о присуждении ученых степеней и присвоении ученых званий в Республике Беларусь (2,95 авторских листа), 5 тезисов докладов на международных научных конференциях и съездах (0,53 авторских листа), 1 инструкция по применению, 3 рационализаторских предложения.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 109 страницах и состоит из введения, общей характеристики работы, пяти глав с изложением результатов собственных исследований, заключения, библиографического списка, списка публикаций соискателя, содержит 19 таблиц, 25 рисунков, 10 приложений.

Библиографический список включает в себя 172 литературных источника (17 на русском языке, 155 на английском языке) и 12 публикаций соискателя. Библиографический список и приложения занимают 27 страниц.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Материалы и методы исследования. В исследование включено 109 пациентов в возрасте от 1 до 18 лет (медиана возраста – 8 лет) с тПАА, которые получали в качестве терапии первой линии ИСТ в Республиканском научно-практическом центре детской онкологии, гематологии и иммунологии (РНПЦ ДОГИ) в 1997–2021 гг. Из них 92 пациента получили ИСТ в качестве первой линии терапии и 17 пациентов – ИСТ с аллогенным БМКП МСК согласно разработанному методу с цензурированием данных на 01.01.2022 года. Группу контроля составили 118 условно здоровых детей. Из них у 95 условно здоровых детей проанализирован инициальный субпопуляционный состав лимфоцитов ПК, у 23 – число стромальных колониеобразующих единиц фибробластов (КОЕ-Ф).

Инициальный субпопуляционный состав лимфоцитов ПК проанализирован у 80 пациентов детского возраста, получивших ИСТ. Инициальная колониеобразующая способность клеток-предшественников гемопоэза КМ исследована у 58 пациентов. У 49 пациентов субпопуляционный состав лимфоцитов ПК и колониеобразующая способность клеток-предшественников гемопоэза КМ, выполненных одновременно, проанализирована в динамике на 64 и 180 дни ИСТ. Пролиферативная активность МСК КМ оценивалась по содержанию КОЕ-Ф на 1×10^5 моноклеарных клеток КМ на момент постановки диагноза у 30 пациентов. Полное экзомное секвенирование образцов КМ, взятых при постановке диагноза, выполнено у 58 пациентов. В проспективное простое рандомизированное исследование эффективности введения БМКП МСК, проведенное в 2016–2019 годах, включено 20 пациентов с тПАА, из них 10 пациентов получили внутривенное введение БМКП МСК на фоне ИСТ и 10 пациентов – стандартную ИСТ. Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы «R-statistics version 4.1.1» (The R Foundation for Statistical Computing). Сравнение в группах по индивидуальным параметрам проводилось с помощью χ^2 теста, в немногочисленных группах – с использованием U теста Манна-Уитни, Уилкоксона [Delgado J. et al., 2014; Gray R. et al., 1988; Kaplan E. et al., 1958]. Показатели выживаемости рассчитывались с использованием метода Каплана-Мейера и сравнивались с использованием log-rank теста [Kaplan E. et al., 1958]. Время наблюдения при ОВ представлял собой интервал от начала ИСТ до смерти или окончания

наблюдения. Время наблюдения при БСВ определялось как время от начала ИСТ до первого события (потеря ГО, рецидив, смерть) или окончания наблюдения. Многофакторный анализ для прогнозирования ГО проведен с использованием логистической регрессии. Определение пороговых количественных показателей, предопределяющих ответ к 180 ИСТ, осуществлялось с применением ROC-анализа (Receiver Operator Characteristic) и экспертной шкалы для значений площади под кривой (AUC): 0,9–1,0 – отличное, 0,8–0,9 – очень хорошее, 0,7–0,8 – хорошее, 0,6–0,7 – среднее, 0,5–0,6 – неудовлетворительное [Григорьев С. и др., 2016; Петри А. и др., 2015; Fawcett T. et al., 2006]. Отношение шансов вычисляли с определением 95 % доверительного интервала и критерия Вальда. Для определения кумулятивной частоты ГО использовался подход на базе конкурирующих рисков (критерий Грея) [Gray R. et al., 1988; Gooley T. et al., 1999; Меньшикова В. и др., 2005].

Результаты собственных исследований

Прогностические факторы гематологического ответа на иммуносупрессивную терапию при приобретенной апластической анемии у пациентов детского возраста

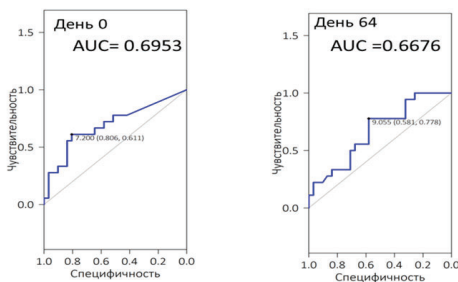
Для оценки эффективности ИСТ всем пациентам детского возраста с тПАА проводилось динамическое обследование, на 64, 112, 180 и 360 дни которое заключалось в исследовании показателей гемограммы, субпопуляционного состава лимфоцитов ПК, костномозгового пунктата и колониеобразующей способности клеток-предшественников гемопоэза КМ с регистрацией наличия/отсутствия ГО.

Кумулятивная частота (КЧ) ГО на 64 день ИСТ ($20,7\% \pm 4,2\%$) достоверно не отличалась от КЧ ГО на 112 день ($22,8\% \pm 4,5\%$). КЧ ГО на 180 день и 360 день ИСТ также были сопоставимы ($37,0\% \pm 5,0\%$ и $41,3\% \pm 5,2\%$, $p > 0,05$). ОВ пациентов детского возраста с тПАА, у которых на 180 день ИСТ зафиксирован ГО, составила $95\% \pm 5\%$, что достоверно выше, чем у пациентов, не ответивших на ИСТ к этому времени ($72\% \pm 8\%$; $p = 0,0057$), а также достоверно выше, чем в общей когорте пациентов ($n = 92$) детского возраста с тПАА ($77\% \pm 4,9\%$, $p < 0,001$). ОВ пациентов, имевших ГО на 360 день ИСТ, была сопоставима с ОВ пациентов, имеющих ГО к 180 дню, и составила $92\% \pm 6\%$ ($p = 0,0198$). Таким образом, 180 день ИСТ является ранней наиболее значимой информативной временной точкой эффективности проводимой терапии у пациентов детского возраста с тПАА. Выявление предикторов ГО на 180 день при инициальном обследовании пациентов и на 64 день терапии позволит в ранние сроки идентифицировать группу пациентов с высоким риском неэффективности ИСТ.

Анализ основных показателей общего анализа крови, субпопуляционного состава лимфоцитов ПК, пролиферативной активности КМ, выполненных одновременно на 0-й и 64-й дни терапии, проведен у 49 пациентов детского возраста с тПАА. Установлено, что АЧР на 0-й и 64-й дни ИСТ было достоверно выше в группе пациентов ($n = 18$), имевших ГО (ГО+) к 180 дню ($p < 0,05$), чем у пациентов, не достигших его (ГО-) ($n = 31$). Инициальное АЧГ у пациентов группы ГО+ на 180 день было достоверно выше по сравнению с группой ГО- ($p < 0,05$), а на 64 день ИСТ достоверных различий в уровне АЧГ не выявлено ($p > 0,05$). Нами не выявлено достоверных отличий в относительном содержании субпопуляционного состава ПК (CD3+ HLA-DR+, CD3+CD4+, CD3+CD8+, CD19+ и CD16+CD56+) как на 0-й, так и на 64-й дни ИСТ у пациентов обеих групп к 180 дню ИСТ. У всех пациентов на 64 день отмечалось снижение уровня CD19+ лимфоцитов, но у пациентов группы ГО+ к 180 дню ИСТ это снижение было более выражено. Количество КОЕ-ГМ как без РФ, так и при культивировании в среде с РФ на 64-й день ИСТ было достоверно выше у пациентов с ГО+ по сравнению с аналогичными показателями пациентов группы ГО- ($p = 0,0068$ и $p = 0,0309$ соответственно). Аналогично количество БОЕ-Э на 64-й день в среде без РФ и в среде с РФ было достоверно ниже у пациентов группы ГО- ($p = 0,0201$ и $p = 0,0015$ соответственно).

Построение прогностических моделей на основе ROC-анализа для каждого из идентифицированных потенциальных предикторов позволило выявить их пороговые прогностические значения. Установлено, что предикторами эффективности ИСТ при тПАА у пациентов детского возраста являются:

1) инициальное АЧР $\geq 7,2 \times 10^9/\text{л}$ (диагностическая эффективность теста 70,8 %, специфичность 80,6 % и чувствительность 61,1 %) и АЧР на 64 день $\geq 9,05 \times 10^9/\text{л}$ (диагностическая эффективность теста 68 %, специфичность 58,1 %, чувствительность 77,8 %) (рисунок 1);



AUC – площадь под кривой

Рисунок 1 – Прогностическая значимость АЧР ПК на 0 и 64 дни у пациентов детского возраста при проведении ИСТ для достижения ГО на 180 день

2) инициальное АЧГ $\geq 0,125 \times 10^9/\text{л}$ (диагностическая эффективность теста 68 %, специфичность 58,1 % и чувствительность 77,8 %);

3) уровень CD19+ лимфоцитов в ПК на 64 день ИСТ $< 5,1$ % (диагностическая эффективность теста 65 %, специфичность 63,3 % и чувствительность 66,7 %);

4) количество КОЕ-ГМ без РФ на 64 день терапии ≥ 9 колоний на 10^5 клеток КМ (диагностическая эффективность теста 76,2 %, специфичность 75,9 % и чувствительность 76,5 %) и КОЕ-ГМ в среде с РФ на 64 день терапии ≥ 8 колони на 10^5 клеток КМ (диагностическая эффективность теста 69,6 %, специфичность 51,7 % и чувствительность 87,5 %) (рисунок 2);

5) количество БОЕ-Э без РФ на 64 день терапии ≥ 1 колоний на 10^5 клеток КМ (диагностическая эффективность теста 69 %, специфичность 73,3 % и чувствительность 64,7 %) и БОЕ-Э КМ в среде с РФ на 64 день терапии ≥ 3 колоний на 10^5 клеток КМ (диагностическая эффективность теста 74 %, специфичность 73,3 % и чувствительность 75 %) (рисунок 2).

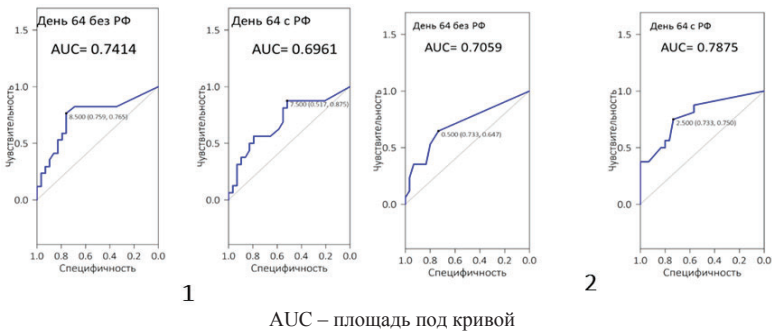


Рисунок 2 – Прогностическая значимость количества КОЕ-ГМ КМ (1) и БОЕ-Э КМ (2) на 64 день ИСТ в среде без и с РФ у пациентов с ГО на 180 день

Принимая во внимание, что общая информативность больше, чем простая аддитивная сумма информативности отдельных предикторов, мы провели многофакторный анализ гематологических и иммунологических показателей, а также показателей пролиферативной активности клеток КМ с цифровыми пороговыми значениями, полученными при проведении ROC-анализа, что позволило выявить независимые предикторы эффективности ИСТ (таблица 1).

Таблица 1 – Отношение шансов получения ГО к 180 дню ИСТ

Параметр		Коэффициент β	Отношение шансов (ОШ)	95 % доверительный интервал ОШ	p
КОЕ-ГМ 64	< 8,5		1		0,0147
	\geq 8,5	1,95	7,04	1,56 ÷ 38,51	
БОЕ-Э РФ 64	< 2,5		1		0,0143
	\geq 2,5	2,07	7,95	1,66 ÷ 50,14	
CD 19+ 64	< 5,1 %		1		0,0489
	\geq 5,1 %	-1,66	0,19	0,03 ÷ 0,89	

Диагностическая эффективность данной модели составляет 80 %.

Нами разработан алгоритм прогнозирования ГО к 180 дню ИСТ, который ориентирован на раннее выявление группы пациентов с благоприятным прогнозом ИСТ, а также групп пациентов детского возраста с тПАА с высоким риском неэффективности ИСТ, т.е. раннее выявление тех пациентов, кому показана ТГСК от альтернативного донора (таблица 2).

Таблица 2. – Алгоритм прогнозирования ГО к 180 дню ИСТ*

Прогноз ГО*	Показатели 64 дня ИСТ		
	КОЕ-ГМ, колоний на 10^5 клеток КМ	БОЕ-Э РФ, колоний на 10^5 клеток КМ	CD 19+, %
Благоприятный	< 9	\geq 3	< 5,1
	\geq 9	< 3	< 5,1
	\geq 9	\geq 3	любое
Неблагоприятный	< 9	\geq 3	\geq 5,1
	< 9	< 3	любое
	\geq 9	< 3	\geq 5,1

*наличие всех трех факторов обязательно

Клиническое значение аллельных вариантов при ПАА у детей

Полное экзомное секвенирование проведено на архивных инициальных образцах клеток КМ у 58 пациентов, получавших лечение в РНПЦ ДОГИ в 1997–2018 гг. Аннотация данных полного экзомного секвенирования выполнена на целевых регионах, включающих перечень 746 генов, возможно имеющих отношение к клиническим проявлениям у пациентов детского возраста с нарушением костномозгового кроветворения.

У 32 из 58 пациентов детского возраста с тПАА (55,2 %) выявлены аллельные варианты в 41 генах. При этом у 14 пациентов из 32 (44 %)

выявлены аллельные варианты только в одном гене, у 18 детей (56 %) – в 2-х генах и более. В когорте обследованных пациентов не были выявлены мутации в генах, ассоциированных с МДС и ОМЛ.

ОВ пациентов с наличием аллельных вариантов, т. е. с известным молекулярно-генетическим статусом (ИМГС), получивших ИСТ ($n = 24$), была несколько ниже, чем у пациентов с неподтвержденным молекулярно-генетическими изменениями (НМГС) ($75 \% \pm 9 \%$ и $81 \% \pm 8 \%$ соответственно, $p > 0,05$). ОВ пациентов обеих групп после проведения алло-ТГСК в первой линии терапии ($n = 7$) была 100 %. Факт наличия или отсутствия мутаций не оказал значимого влияния на достижение ГО на 64 и 180 дни ИСТ ($p = 0,2424$ и $p = 0,5364$ соответственно).

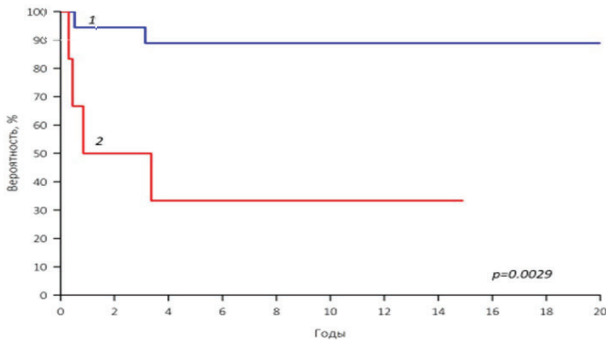
С целью определения прогностического значения различных идентифицированных генетических аллельных вариантов у детей с тПАА все пациенты группы ИМГС были разделены на 2 подгруппы. В подгруппу А ($n = 5$) объединены пациенты, имеющие аллельные варианты в генах, предполагающих иммунологическую дисрегуляцию (*IL21R*, *CASP10*, *LYST*, *FAS*, *ADA2*). Подгруппу В ($n = 18$) составили пациенты, с аллельными вариантами в генах, участвующих в репарации ДНК (*FANCB*, *SOS1*, *NBN*, *ACD*, *POLD1*, *MSH3*, *BRCA2*, *POLE*, *ATR*, *BRCA1*, *MSH2*, *RAD54L*, *MSH6*, *MLH1*, *MLH3*, *ATM*, *NABP2*, *NEIL1*). При аутосомно-рецессивном типе наследования выявленные аллельные варианты в гетерозиготе не могли отождествляться с какой-либо нозологической формой без наличия патогенного структурного варианта в другой аллели. При аутосомно-доминантном типе наследования индивидуально анализировались признаки наличия/отсутствия соответствующей нозологической формы. У 1 пациента подгруппы А выделен гетерозиготный аллельный вариант, наследуемый по аутосомно-доминантному типу (*CASP10*), но на момент постановки диагноза тПАА у него отсутствовали основные и добавочные критерии аутоиммунного лимфопролиферативного синдрома. Гетерозиготный аллельный вариант в гене *FANCB*, имеющий X-сцепленный рецессивный тип наследования, обнаружен у одной пациентки в группе В.

В подгруппе А изменения только в одном гене (моноизменения) выявлены у одного пациента, у остальных – сочетание аллельных вариантов в нескольких генах. ОВ пациентов подгруппы А была ниже ($60 \% \pm 22 \%$) по сравнению с ОВ остальных пациентов группы ИМГС ($80 \% \pm 9 \%$) и пациентов группы НМГС ($81 \% \pm 8 \%$).

Моноизменения в генах в подгруппе В выявлены у 7 пациентов. ОВ этих пациентов была ниже по сравнению с пациентами, которые имели сочетанные изменения ($56 \% \pm 17 \%$ и $86 \% \pm 12 \%$ соответственно). ОВ всех пациентов

подгруппы В составила $71\% \pm 11\%$ и достоверно не отличалась от ОВ остальных пациентов с ИМГС ($86\% \pm 13\%$) и пациентов с НМГС ($81\% \pm 8\%$) ($p > 0,05$). Нами установлено, что ОВ пациентов, имевших аллельный вариант с.А4576G в гене *ATR* ($n = 3$), составила 100% , а пациентов, имевших аллельный вариант с.178_179insCCGCAGCGGCCGCAGCGC в гене *MSH3* ($n = 2$) – 0% . ОВ пациентов с наличием аллельного варианта с.С4480G в гене *POLE* ($n = 2$) и с.С327C в гене *POLD1* ($n = 1$) составила $33\% \pm 21\%$. Пациенты с аллельными вариантами в генах *POLE* и *POLD1* были объединены в одну группу вследствие наивысшей гомологии/сходства в этих генах (23% и 37% соответственно) [Briggs S. et. al., 2013].

Принимая во внимание низкую ОВ пациентов с аллельными вариантами в генах *MSH3*, *POLE*, *POLD1*, они были объединены в группу высокого риска неблагоприятного ответа на ИСТ (HRG). ОВ пациентов этой группы была достоверно ниже, чем пациентов, не имеющих аллельные варианты в генах *MSH3*, *POLE* и *POLD1* ($20\% \pm 14\%$ и $89\% \pm 7\%$ соответственно, $p = 0,0029$) (рисунок 3).



- 1 ОВ пациентов группы HRG –: $89\% \pm 7\%$; (всего – 19, живы – 16)
- 2 ОВ группы HRG + (*MSH3*, *POLE*+*POLD1*): $20\% \pm 14\%$; (всего – 5, живы – 2)

Рисунок 3 – ОВ пациентов группы HRG по сравнению с остальными пациентами с ИМГС

При анализе инициальных клинических лабораторных данных (уровень тромбоцитов, гемоглобина, АЧГ и АЧР), КОЕ-ГМ и БОЕ-Э без и при культивировании с РФ нами не выявлено достоверных различий у пациентов с наличием или отсутствием выявленных аллельных вариантов пациентов группы HRG.

Биомедицинский клеточный продукт мезенхимальных стволовых клеток в лечении тПАА у детей

При оценке функционального состояния МСК КМ у пациентов детского возраста с тПАА выявлены значительные нарушения.

Количество МСК, способных пролиферировать в культуре (КОЕ-Ф), у детей с тПАА ($n = 30$) было достоверно ниже по сравнению с их числом у условно здоровых детей ($n = 23$) (5 колоний на 10^5 мононуклеарных клеток КМ и 10 колоний на 10^5 мононуклеарных клеток КМ соответственно, $p = 0,005$).

При 7 дневном культивировании CD34+ клеток с МСК КМ пациентов с тПАА ($n = 6$) их прирост составил $9,31 \pm 2,91$, что не отличалось от прироста клеток в культуре без МСК ($6,6 \pm 2,24$) ($p > 0,05$). В то же время прирост клеток при их культивировании с МСК условно здоровых детей ($n = 5$) достоверно был выше, чем в культуре без МСК ($17,1 \pm 1,11$ и $6,6 \pm 2,24$ соответственно, $p < 0,05$). Это свидетельствует о снижении функциональной активности МСК КМ пациентов с тПАА в поддержке гемопоэза.

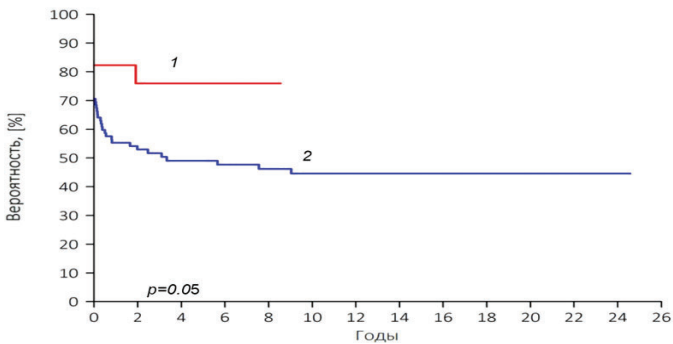
Выявлено повышение адипогенного потенциала МСК КМ пациентов детского возраста с тПАА ($n = 12$), о чем свидетельствовало достоверно большее число клеток ($53,0$ клеток из 1×10^4 МСК), которые дифференцировались у них в адипоциты на 14-й день культивирования в присутствии адипогенных стимуляторов, по сравнению с группой ($n = 13$) условно здоровых детей ($30,0$ клеток из 1×10^4 МСК) ($p = 0,0001$).

Принимая во внимание нарушение функции МСК КМ у детей с тПАА, а также их потенциальный иммуномодулирующий эффект, нами предложен метод лечения апластической анемии у детей с применением БМКП МСК, заключающийся в инфузии БМКП МСК в дозе $>1 \times 10^6/\text{кг}$ клеток на 8-й и 38 дни проводимой ИСТ. В проспективное простое рандомизированное исследование было включено 20 пациентов. 10 пациентов получали стандартную ИСТ (группа сравнения, ГС) и 10 пациентам было проведено введение аллогенных БМКП МСК на фоне проводимой ИСТ. Установлено, что у пациентов, получивших введение БМКП МСК (исследуемая группа, ИГ), на 180-й день ИСТ снижается абсолютное число CD3+CD8+ лимфоцитов ПК (c $0,5 \pm 0,36 \times 10^9/\text{л}$ до $0,36 \pm 0,02 \times 10^9/\text{л}$, $p < 0,05$) и абсолютное число CD3+HLA-DR+ лимфоцитов ПК (c $0,096 \pm 0,06 \times 10^9/\text{л}$ до $0,056 \pm 0,03 \times 10^9/\text{л}$, $p < 0,05$). У пациентов группы рандомизации, не получивших введение БМКП МСК (группа сравнения, ГС), отсутствовали изменения абсолютного числа CD3+CD8+ лимфоцитов и CD3+HLA-DR+ лимфоцитов ПК. Абсолютное содержание CD19+ лимфоцитов ПК 180 дню ИСТ характеризовалось

тенденцией к их снижению в 4 раза у пациентов в ИГ и в 2,5 раза в ГС ($p > 0,05$).

Способность ГСК к колониеобразованию (количество КОЕ-ГМ и БОЕ-Э) была достоверно выше у пациентов ИГ на 64, 112 и 180 дни ИСТ ($p < 0,05$). Установлен также достоверный рост КОЕ-Ф у пациентов ИГ с 2 (0–6) до 6 (3–9) на 10^5 мононуклеарных клеток КМ ($p < 0,05$), тогда как в ГС такие изменения отсутствовали.

Всего 17 пациентов в качестве первой линии терапии получили ИСТ с аллогенным БМКП МСК согласно разработанному методу. БСВ пациентов с тПАА, получивших введение БМКП МСК, была выше ($76,0 \% \pm 10,5 \%$) по сравнению с пациентами, которые получали стандартную ИСТ ($47,7 \% \pm 5,3 \%$) ($p = 0,05$) (рисунок 4).



- 1 – БСВ пациентов ИГ: $76,0 \% \pm 10,5 \%$ (всего 17, без событий 12).
 2 – БСВ пациентов ГС: $47,7 \% \pm 5,3 \%$ (всего 92, без событий 35).

Рисунок 4 – Бессобытийная выживаемость пациентов с тПАА, в зависимости от вида терапии у пациентов детского возраста с тПАА

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основные научные результаты диссертации

1. Установлено, что гематологический ответ на 180 день ИСТ у пациентов детского возраста с тПАА предопределяет ее эффективность. Общая выживаемость пациентов детского возраста с тПАА, у которых на 180 день ИСТ зафиксирован ГО, составила $95,5 \% \pm 5 \%$, что достоверно выше, чем у пациентов без ГО к этому дню ($p = 0,0057$), и не отличается от общей выживаемости пациентов с ГО на 360 день ИСТ ($92 \% \pm 6 \%$) [7].

2. Выявлено, что пациенты с ГО на 180 день ИСТ имели инициальные АЧР и АЧГ $\geq 7,2 \times 10^9/\text{л}$ и $\geq 0,125 \times 10^9/\text{л}$ соответственно, а также на 64 день

ИСТ АЧР $\geq 9,05 \times 10^9/\text{л}$, количество КОЕ-ГМ без стимуляции ≥ 9 колоний на 10^5 клеток КМ, количество КОЕ-ГМ со стимуляцией ≥ 8 колоний на 10^5 клеток КМ, БОЕ-Э без стимуляции ≥ 1 колоний на 10^5 клеток КМ, и количество БОЕ-Э со стимуляцией ≥ 3 колоний на 10^5 клеток КМ. Основными предикторами ГО на 180 день ИСТ являются количество КОЕ-ГМ без стимуляции ≥ 9 колоний на 10^5 клеток КМ, БОЕ-Э со стимуляцией ≥ 3 колоний на 10^5 клеток КМ и относительное содержание CD 19+ лимфоцитов ПК $< 5,1$ %, определяемые на 64 день ИСТ [2, 5, 9].

3. Общая выживаемость пациентов детского возраста с тПАА, имеющих аллельный вариант с.А4576G в гене *ATR*, составила 100 %, а с.178_179insCCGCAGCGGCCGCAGCGC в гене *MSH3* – 0 %. Пациенты, имеющие аллельные варианты с.178_179insCCGCAGCGGCCGCAGCGC в гене *MSH3*, с.С4480G в гене *POLE* и с.С327C в гене *POLD1* геномной ДНК, являются группой высокого риска неэффективности ИСТ с низкой долгосрочной выживаемостью ($20 \% \pm 14 \%$, $p = 0,0029$) [6, 11].

4. Выявлено, что у пациентов детского возраста с тПАА МСК КМ по сравнению с МСК КМ условно здоровых детей повышен потенциал к адипогенной дифференцировке (Ме 53,0 и 30,0 адипоцитов из 1×10^4 МСК соответственно), снижена способность формировать КОЕ-Ф (Ме 5 и 10 на 10^5 мононуклеаров КМ соответственно) ($p < 0,05$). Поддержка гемопоэза у МСК пациентов с тПАА снижена по сравнению с МСК условно здоровых детей. Прирост CD34+ клеток *in vitro* при добавлении МСК КМ пациентов с тПАА не отличался от спонтанного роста и был значительно ниже, чем при добавлении МСК КМ условно здоровых детей ($9,31 \pm 2,91$; $6,6 \pm 2,24$ и $17,1 \pm 1,11$ соответственно) ($p < 0,05$) [3, 4, 12].

5. Установлено, что введение БМКП МСК является эффективным способом усиления ИСТ у пациентов детского возраста с тПАА.

У пациентов, получивших БМКП МСК на 8 и 38 дни ИСТ, к 180 дню достоверно снижалось в ПК абсолютное число CD3+CD8+ лимфоцитов (с $0,5 \pm 0,36 \times 10^9/\text{л}$ до $0,36 \pm 0,02 \times 10^9/\text{л}$, $p < 0,05$) и CD3+HLA-DR+ лимфоцитов (с $0,096 \pm 0,06 \times 10^9/\text{л}$ до $0,056 \pm 0,03 \times 10^9/\text{л}$, $p < 0,05$), нормализовалась пролиферативная активность МСК, о чем свидетельствовало повышение количества КОЕ-Ф с 2 до 6 на 10^5 мононуклеаров КМ ($p < 0,05$). У пациентов, получивших стандартную ИСТ, отсутствовали изменения абсолютного числа CD3+CD8+ лимфоцитов, CD3+HLA-DR+ лимфоцитов и количества КОЕ-Ф к 180 дню ИСТ. БСВ пациентов после применения БМКП МСК составила $76,0 \% \pm 10,5 \%$, а после стандартной ИСТ – $47,7 \% \pm 5,3 \%$ ($p = 0,05$) [1, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 12].

Рекомендации по практическому использованию результатов

1. Предложен алгоритм прогнозирования ГО к 180 дню ИСТ. Данный алгоритм способствует раннему выявлению пациентов с благоприятным прогнозом ИСТ, а также выделению группы пациентов, для которых необходимо раннее принятие решения об алло-ТГСК от неродственного HLA идентичного донора или гапло-ТГСК.

2. При наличии выявленных аллельных вариантов в генах *MSH3*, *POLE* и *POLD1* пациентам детского возраста с тПАА показано раннее принятие решения о поиске неродственного донора для HLA идентичной алло-ТГСК/гапло-ТГСК.

3. Предложен метод введения БМКП МСК двукратно на 8 и 38 сутки ИСТ в дозе $>1 \times 10^6/\text{кг}$ пациентам детского возраста с тПАА, не имеющих HLA идентичного родственного донора для выполнения алло-ТГСК в первой линии терапии.

Рекомендации по использованию результатов диссертации в практическом здравоохранении подтверждены инструкцией по применению (регистрационный № 049 – 0419). Метод лечения пациентов с приобретенной апластической анемией с использованием аллогенных мезенхимальных стволовых клеток, тест на колониобразующую способность предшественников гемопоэза для диагностики приобретенной апластической анемии, мониторинг колониобразующей способности предшественников гемопоэза для оценки эффективности иммуносупрессивной терапии у пациентов с приобретенной апластической анемией, алгоритм прогнозирования гематологического ответа к 180 дню иммуносупрессивной терапии пациентов детского возраста с приобретенной апластической анемией внедрены в практику государственного учреждения «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии».

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ СОИСКАТЕЛЯ

Статьи в рецензируемых научных журналах

1. Емельянова, И. В. Мезенхимальные стволовые клетки в терапии приобретенной апластической анемии / И. В. Емельянова, Т. А. Углова, Я. И. Исайкина // Гематология. Трансфузиология. Вост. Европа. – 2017. – Т. 3, № 3. – С. 428–433.

2. Колониеобразующая способность клеток-предшественников гемопоэза при иммуносупрессивной терапии у детей с приобретенной апластической анемией / Я. И. Исайкина, М. А. Новикова, Е. Г. Лях, И. В. Емельянова, Т. Б. Кугейко // Гематология. Трансфузиология. Вост. Европа. – 2017. – Т. 3, № 3. – С. 408–416.

3. Исследование функциональных свойств мезенхимальных стволовых клеток костного мозга при апластической анемии у детей / Я. И. Исайкина, Е. Г. Лях, И. В. Емельянова, Ю. В. Савич // Гематология. Трансфузиология. Вост. Европа. – 2019. – Т. 5, № 2. – С. 141–149.

4. Аллогенные мезенхимальные стволовые клетки в лечение пациентов детского возраста с приобретенной апластической анемией [Электронный ресурс] / И. В. Емельянова, Я. И. Исайкина, Т. А. Углова, О. В. Алейникова // Достижения медицинской науки Беларуси. – Режим доступа: http://med.by/dmn/book.php?book=19-10_4. – Дата доступа: 04.12.2023.

5. Прогностические факторы гематологического ответа на иммуносупрессивную терапию при приобретенной апластической анемии у детей / И. В. Емельянова, Т. А. Углова, Я. И. Исайкина, О. И. Быданов // Гематология. Трансфузиология. Вост. Европа. – 2020. – Т. 6, № 1. – С. 66–77.

6. Клиническое значение генетических мутаций при приобретенной апластической анемии у детей / И. В. Емельянова, Т. А. Углова, А. А. Мигас, О. И. Быданов, О. В. Алейникова // Гематология. Трансфузиология. Вост. Европа. – 2021. – Т. 7, № 4. – С. 467–473.

7. Субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови у детей с приобретенной апластической анемией и его прогностическое значение / И. В. Емельянова, Т. А. Углова, О. И. Быданов, Л. В. Мовчан // Гематология. Трансфузиология. Вост. Европа. – 2022. – Т. 8, № 3. – С. 303–309.

Тезисы докладов в материалах конференций

8. Емельянова, И. В. Восстановление гранулоцитопозеза у пациентов с приобретенной апластической анемией после проведения иммуносупрессивной терапии / И. В. Емельянова, Т. А. Углова, Я. И. Исайкина // Перспективы детской гематологии-онкологии: мультидисциплинарный подход – 2018 : сб. материалов IX Межрегион. совещ.

НОДГО, Санкт-Петербург, 26–28 апр. 2018 г. – [Опубл. в журн.] Рос. журн. дет. гематологии и онкологии. – 2018. – Спец. номер. – С. 61–62.

9. Емельянова, И. В. Прогностические факторы иммуносупрессивной терапии у пациентов детского возраста с тяжелой приобретенной апластической анемией / И. В. Емельянова, Т. А. Углова, Я. И. Исайкина // Актуальные вопросы детской онкологии, гематологии и иммунологии : тез. докл. XV Междунар. конф., Минск, 31 окт. – 1 нояб. 2019 г. – [Опубл. в журн.] Гематология. Трансфузиология. Вост. Европа. – 2019. – Т. 5, № 4. – С. 507–509.

10. Предварительные результаты лечения пациентов детского возраста с приобретенной апластической анемией с использованием биомедицинского клеточного продукта мезенхимальных стволовых клеток / И. В. Емельянова, Т. А. Углова, Я. И. Исайкина, Е. Г. Лях, О. С. Дубовик, М. Г. Шитикова, Ю. В. Тимохова, О. В. Алейникова // Актуальные проблемы и перспективы развития детской гематологии и онкологии Российской Федерации : сб. материалов I объед. Конгр. НОДГО и РОДО, онлайн формат, 23–25 нояб. 2020 г. – [Опубл. в журн.] Рос. журн. дет. гематологии и онкологии. – 2020. – С. 107–108.

11. Генетические мутации при приобретенной апластической анемии у детей / И. В. Емельянова, Т. А. Углова, А. А. Мигас, О. В. Алейникова // Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток. Генная и клеточная терапия : тез. докл. XVI Симп. памяти Р. М. Горбачевой, Санкт-Петербург, 15–17 сент. 2022 г. – [Опубл. в журн.] Клеточ. терапия и трансплантация. – 2022. – Т. 11, № 3, прил. – С. 53.

12. Мезенхимальные стволовые клетки у детей с тяжелой приобретенной апластической анемией / И. В. Емельянова, Т. А. Углова, О. И. Быданов, Я. И. Исайкина, Е. Г. Лях, О. В. Алейникова // Инновации в детской гематологии, онкологии и иммунологии: от науки к практике : тез. постер. докл. участников Всерос. конгр. с междунар. участием, Москва, 1–3 июня 2023 г. – [Опубл. в журн.] Вопр. гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. – 2023. – Т. 22, № 2, прил. 1. – С. 105.

Инструкция по применению

13. Метод лечения пациентов с приобретенной апластической анемией с использованием аллогенных мезенхимальных стволовых клеток : инструкция по применению № 049-0419 : утв. М-вом здравоохранения Респ. Беларусь 25.04.2019 / Респ. науч.-практ. центр дет. онкологии, гематологии и иммунологии ; Я. И. Исайкина, И. В. Емельянова, Т. А. Углова, О. В. Алейникова. – Минск, 2019. – 5 с.

Прочее

14. Применения теста на колониобразующую способность предшественников гемопоэза для диагностики приобретенной апластической анемии у детей : рац. предложение № 108 : утв. Респ. науч.-практ. центром дет. онкологии, гематологии и иммунологии 07.12.2017 / И. В. Емельянова. – Минск, 2017.

15. Мониторинг колониобразующей способности клеток предшественников гемопоэза для оценки эффективности иммуносупрессивной терапии у пациентов с приобретенной апластической анемии : рац. предложение № 109 : утв. Респ. науч.-практ. центром дет. онкологии, гематологии и иммунологии 07.12.2017 / И. В. Емельянова. – Минск, 2017.

16. Алгоритм прогнозирования гематологического ответа к 180 дню иммуносупрессивной терапии пациентов детского возраста с приобретенной апластической анемией : рац. предложение № 137 : утв. Респ. науч.-практ. центром дет. онкологии, гематологии и иммунологии 05.12.2022 / И. В. Емельянова. – Минск, 2022.

РЭЗІЮМЭ

Емяльянава Ірма Уладзіміраўна

Прагназаванне эфектыўнасці і ўдасканаленне тэрапіі ў дзяцей з цяжкай набытай апластычнай анеміяй

Ключавыя словы: цяжкая набытая апластычная анемія (цНАА), біямедыцынскі клеткавы прадукт мезенхімальных ствалавых клетак (БМКП МСК), прэдыктар гематалагічнага адказу (ГА), выжывальнасць.

Мэта: палепшыць вынікі лячэння пацыентаў дзіцячага ўзросту з цяжкай набытай апластычнай анеміяй шляхам індывідуалізацыі тэрапеўтычнай тактыкі на аснове ўдакладнення прагнастычных фактараў, абгрунтавання і ўкаранення прымянення алагенных БМКП МСК у ходзе правядзення імунасупрэсіўнай тэрапіі (ІСТ).

Метады даследавання: клінічны, малекулярна-генетычны, статыстычны.

Атрыманя вынікі і іх навізна: ўстаноўлена, што ў пацыентаў дзіцячага ўзросту з цНАА прэдыктарамі ГА ІСТ з'яўляюцца абсалютная колькасць гранулацытаў і абсалютная колькасць рэтыкулацытаў ПК на момант пастаноўкі дыягназу, а таксама лабараторныя параметры, якія вызначаюцца на 64 дзень тэрапіі, як абсалютны лік рэтыкулацытаў перыферычнай крыві (ПК), адносны ўзровень CD19 + лімфацытаў ПК, колькасць калоніяўтваральных адзінак гранулацытаў і макрафагаў (КУА-ГМ) і бурст-утваральных адзінак эрытрацытаў (БУА-Э) КМ як у асяроддзі без роставых фактараў (РФ), так і пры культываванні клетак-папярэдкаў у асяроддзі з РФ. Упершыню распрацаваны алгарытм прагназавання ІСТ у пацыентаў дзіцячага ўзросту з цНАА з улікам праліфератыўнай актыўнасці папярэдкаў гемапаэзу *in vitro*. Упершыню даказана, што ў пацыентаў дзіцячага ўзросту з цНАА наяўнасць алельнага варыянту с.178_179insCCGCAGCGGCCGCAGCGC у гене *MSH3*, с.С4480G у гене *POLE* і с.С327C у гене *POLD1* з'яўлялася неспрыяльным прагнастычным фактарам ІСТ. Упершыню ўстаноўлена, што МСК пацыентаў дзіцячага ўзросту з цНАА характарызуюцца зніжанай праліфератыўнай актыўнасцю, павышаным адыпагенным патэнцыялам, паслабленнем функцыянальнай здольнасці падтрымліваць гемапаэз. Упершыню распрацаваны эфектыўны метады прымянення алагеннага БМКП МСК пры правядзенні ІСТ у пацыентаў дзіцячага ўзросту з цНАА.

Рэкамендацыі па выкарыстанні: алгарытм прагназавання ГА на 180 дзень ІСТ, метады увядзення БМКП МСК пацыентам дзіцячага ўзросту з цНАА сумесна з ІСТ.

Вобласць прымянення: дзіцячая гематалогія.

РЕЗЮМЕ

Емельянова Ирма Владимировна

Прогнозирование эффективности и совершенствование терапии у детей с тяжелой приобретенной апластической анемией

Ключевые слова: приобретенная апластическая анемия (ПАА), биомедицинский клеточный продукт мезенхимальных стволовых клеток (БМКП МСК), предикторы гематологического ответа (ГО), выживаемость.

Цель: улучшить результаты лечения пациентов детского возраста с тяжелой приобретенной апластической анемией путем индивидуализации терапевтической тактики на основе уточнения прогностических факторов, обоснования и внедрения применения аллогенных БМКП МСК в ходе проведения иммуносупрессивной терапии (ИСТ).

Методы исследования: клинический, молекулярно-генетический, статистический.

Полученные результаты и их новизна: установлено, что у пациентов детского возраста с тПАА предикторами ГО ИСТ являются абсолютное число гранулоцитов и абсолютное число ретикулоцитов периферической крови на момент постановки диагноза, а также лабораторные параметры, определяемые на 64 день терапии, такие как абсолютное число ретикулоцитов ПК, относительный уровень CD19⁺ лимфоцитов ПК, количество колониеобразующих единиц гранулоцитов и макрофагов (КОЕ-ГМ) и бурс-образующих единиц эритроцитов (БОЕ-Э) костного мозга (КМ) как в среде без ростовых факторов (РФ), так и при культивировании клеток-предшественников в среде с РФ. Впервые разработан алгоритм прогнозирования ИСТ у пациентов детского возраста с тПАА с учетом пролиферативной активности предшественников гемопоэза *in vitro*. Впервые доказано, что у пациентов детского возраста с тПАА наличие аллельного варианта с.178_179insCCGCAGCGGCCGCAGCGC в гене *MSH3*, с.С4480G в гене *POLE* и с.С327С в гене *POLD1* являлось неблагоприятным прогностическим фактором ИСТ. Впервые установлено, что МСК пациентов детского возраста с тПАА характеризуются сниженной пролиферативной активностью, повышенным адипогенным потенциалом, ослаблением функциональной способности поддерживать гемопоэз. Впервые разработан эффективный метод применения аллогенного БМКП МСК при проведении ИСТ у пациентов детского возраста с тПАА.

Рекомендации по использованию: алгоритм прогнозирования ГО на 180 день ИСТ, метод введения БМКП МСК пациентам детского возраста с тПАА совместно с ИСТ.

Область применения: детская гематология.

SUMMARY

Yemialyanava Irma

Predicting the effectiveness and improvement of severe acquired aplastic anemia therapy in children

Key words: severe acquired aplastic anemia (SAA), biomedical cell product of mesenchymal stem cells (BMCP MSC), predictors of hematological response (HR), survival.

Objective: to improve treatment results in pediatric patients with severe acquired aplastic anemia by individualizing therapeutic tactics based on clarifying prognostic factors, justifying and implementing the use of allogeneic BMCP MSC during immunosuppressive therapy (IST).

Methods used in the study: clinical, molecular genetic, statistical.

Results and scientific novelty: it has been determined that the predictors of HR of IST in children with SAA are the absolute number of peripheral blood (PB) granulocytes and the absolute number of PB reticulocytes at time of diagnosis, and also the laboratory parameters determined on day 64 of the therapy, such as the absolute number of PC reticulocytes, the relative level of CD19+ PB lymphocytes, the number of colony-forming units of granulocytes and macrophages (CFU-GM) and burst-forming units of erythrocytes (BFU-E) of bone marrow (BM) both in environment without growth factors (GF) and during the cultivation of progenitor cells in environment with GF. For the first time the algorithm for predicting IST in pediatric patients with SAA has been developed, considering the proliferative activity of hematopoietic precursors in vitro. The presence of such allelic variants as c.178_179insCCGCAGCGCCGCAGCGC in the *MSH3* gene, c.C4480G in the *POLE* gene or c.G327C in the *POLD1* gene are specified as an unfavorable prognostic factor of IST. MSCs of pediatric patients with SAA are characterized by reduced proliferative activity, increased adipogenic potential and weakened functional ability to maintain hematopoiesis. The author suggests the effective method for the use of allogeneic BMCP MSC during IST in pediatric patients with SAA.

Recommendations for usage: the algorithm for predicting HR on day 180 of IST, the administration of BMCP MSC to pediatric patients with SAA together with IST.

Scope of application: pediatric hematology.



Научное издание

ЕМЕЛЬЯНОВА
Ирма Владимировна

**ПРОГНОЗИРОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ
И СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ТЕРАПИИ У ДЕТЕЙ
С ТЯЖЕЛОЙ ПРИОБРЕТЕННОЙ АПЛАСТИЧЕСКОЙ АНЕМИЕЙ**

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук
по специальности 14.01.21 — гематология и переливание крови

Ответственный за выпуск И.В. Емельянова

Подписано в печать 19.03.2024. Формат 60 × 84 ¹/₁₆.

Бумага офсетная. Ризография.
Усл. печ. л. 1,56. Уч.-изд. л. 1,10. Тираж 60. Заказ 128.

Издатель и полиграфическое исполнение:
учреждения образования
«Белорусский государственный аграрный технический университет».

Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя,
распространителя печатных изданий
№ 1/359 от 09.06.2014.
№ 2/151 от 11.06.2014.

Пр-т Независимости, 99–1, 220012, Минск.