

дешевизна изготовления, биосовместимость, низкая токсичность, а также возможность защиты переносимого материала от агрессивного воздействия биологических сред организма. Целью данной работы являлось исследование эффективности использования полиэлектролитных капсул в качестве платформы для доставки генетического материала.

Материалы и методы

В работе были использованы капсулы, полученные путем нанесения разнозаряженных слоёв полимеров Polyarginine/Dextran sulfate (PARG/DEXS) по технологии Layer-by-Layer на ядра из карбоната кальция, полученные методом соосаждения водных растворов карбоната натрия и хлорида кальция. В качестве доставляемых генетических конструкций были использованы: плазмидная ДНК и матричная РНК (мРНК), кодирующие зеленый флуоресцентный белок (GFP), мРНК, кодирующая нуклеазу TALEN, осуществляющую делецию гена dTomato, а также малые интерферирующие РНК (миРНК), угнетающие синтез GFP. Для оценки эффективности доставки генетического материала посредством полиэлектролитных капсул были использованы клеточные линии HEK293T_dTomato, HeLa, Msk4, а также первичные клеточные культуры мезенхимальных стромальных клеток костного мозга и макрофагов человека.

Результаты

В ходе исследований была разработана платформа для внутриклеточной доставки генетического материала в виде полиэлектролитных капсул размером 300-500 нм. Данные носители продемонстрировали низкую цитотоксичность (жизнеспособность более 90%) при использовании капсул в соотношении с клетками 25:1. Эффективность трансфекции клеток линии HEK293T_dTomato и клеточной культуры МСК человека состави-

ла 70% для матричной РНК и 40% для плазмидной ДНК, кодирующих GFP. В эксперименте с доставкой мРНК в первичные макрофаги человека эффективность трансфекции составила 60%. При трансфекции клеток линии HEK293T_dTomato мРНК, кодирующими нуклеазу TALEN, нокаут гена dTomato наблюдался у 70% клеток. В эксперименте с миРНК подавление синтеза GFP было зарегистрировано у 98% клеток линий HEK293T HeLa и Msk4 в течение 48 часов после трансфекции.

Выводы

В ходе работы полиэлектролитные капсулы показали высокую эффективность доставки генетического материала в клетки *in vitro*, наряду с низкой токсичностью процедуры трансфекции. Следует отметить, что трансфекция посредством капсул является простой в исполнении процедурой, не требующей специального оборудования и сред. В дальнейшем планируется проведение экспериментов по доставке клинически релевантных генетических конструкций в клетки сложно поддающиеся трансфекции, а также исследования возможности использования полиэлектролитных капсул для доставки генетического материала *in vivo*.

Благодарность

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-015-00098. Александр С. Тимин также благодарит грант РФФИ № 18-015-00100. Кирилл В. Лепик также благодарит грант РФФИ № 19-29-04025.

Ключевые слова

Полимерные капсулы, невирусные системы доставки, трансфекция клеток, нуклеиновые кислоты, биологически активные вещества, инкапсуляция.

Results of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in patients with juvenile myelomonocytic leukemia

Anna A. Osipova, Tatyana A. Bykova, Varvara N. Ovechkina, Anastasia S. Borovkova, Olesya V. Paina, Polina V. Kozhokar, Anastasia S. Frolova, Kirill A. Ekushov, Alexander N. Galimov, Zhemal Z. Rahmanova, Svetlana V. Razumova, Alexander L. Alyanskiy, Elena V. Morozova, Elena V. Babenko, Tatyana L. Gindina, Elena V. Semenova, Ludmila S. Zubarovskaya, Boris V. Afanasyev

Raisa Gorbacheva Memorial Research Institute of Pediatric Oncology, Hematology and Transplantation, Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russia

Contact: Dr. Anna A. Osipova
E-mail: md.annarats@gmail.com

Introduction

Juvenile myelomonocytic leukemia (JMML) is an aggressive malignant disease bearing the features of myeloproliferative disease and myelodysplastic syndrome. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT) is the standard treatment for patients with JMML. Relapses of the disease and non-engraftment remain main causes of the treatment failure.

Our goal was to analyze the effectiveness of HSCT and identify factors affecting the outcome in children with JMML.

Patients and Methods

The study included 22 patients (pts), age 8 month to 12 years (median, 4 years) who received 30 allo-HSCT (22 cases, first transplant; 8 cases, second HSCT) from 2002 to 2019. The diagnosis was established in accordance with international criteria. Patients' gender: boys, 18; girls, 4. Cytogenetic findings: normal karyotype, in 10 pts (45%); monosomy 7, in 7 cases (31%), other cytogenetic changes, in 5 pts (23%). Molecular genetic analysis was performed for 14 pts showing: PTPN11 (n=8), NRAS (n=3), KRAS (n=1), NF1 (n=2), CBL

(n=1), SETB1 n=1), ASLX1 (n=1), RUNX1 (n=1), no detectable mutations (n=1). At the time of diagnosis, platelet (PLT) count was 11 to 419 (median $59 \times 10^9/L$); white blood cells (WBC) 2.6-175.0 (median $28.0 \times 10^9/L$). Most patients received chemotherapy before allo-HSCT. Depending on clinical manifestations at the time of diagnosis they were divided into 2 groups. First group (13 pts) received differentiation therapy: cis-retinoic acid, low dose cytarabine, hypomethylating agent, or hadn't any previous therapy. The 2nd group (9 pts) received AML-like intensive chemotherapy (FLAM/ADE/HAM). The time from diagnosis to allo-HSCT was 2 to 86 months (median, 8 month). Bone marrow (BM) was used in 20 pts (91%), peripheral blood stem cells (PBSC), in 3 cases (9%). Donors' type: matched related HSCT, in 5 pts (20%); haploidentical, in 5 cases (20%), and matched unrelated donors were used for 12 pts (60%). Myeloablative conditioning regimen (MAC) was used in 19 pts (86%); reduced-intensity conditioning (RIC), in 3 pts (15%). Median follow-up continued for 8 months (range 1 to 130).

Results

Four-year overall survival of JMML pts (OS) was 56%. Engraftment was achieved in 12 pts (59%). Full donor chimerism at day 30 was shown in 7 pts (31%). Mixed chimerism appeared with delay in 2 pts (9%), with subsequent loss and development of relapse; one patient (4.5%) had a secondary transplant rejection with further recovery of autologous

hemopoiesis. 2nd transplant was made for 8 pts (36%), with subsequent non-engraftment in 4 cases, and loss of the graft, in 4 patients. OS in the group of patients who received high-dose chemotherapy was 78%, with other therapies, 45% ($p=0.635$). There was a trend for improving OS when an unrelated donor had been used, i.e., 75% versus 0% ($p=0.281$). When assessing some factors affecting OS, the level of platelets at the time of diagnosis seems to be informative: OS at initial PLT level of $>30 \times 10^9/L$ was 65%, when compared with OS rates of 30% at initial PLT of $<30 \times 10^9/L$ ($p=0.034$). The levels of WBC, fetal hemoglobin, splenomegaly did not affect OS (probably, due to limited data). OS in pts with acute GVHD stage 1-2 was 100%; in cases of GVHD stage 3-4, it was 0%, being 33% in GVHD-free cases ($p=0.003$).

Conclusion

Allo-HSCT remains the main therapeutic option for patients with JMML. Chemotherapy is justified as a pre-transplant therapy and is considered in each case individually, depending on the degree of myeloproliferative syndrome.

Conflict of interest

No conflict of interest.

Keywords

Juvenile myelomonocytic leukemia, treatment, allo-HSCT.

Результаты аллогенной трансплантации костного мозга у детей с ювенильным миеломоноцитарным лейкозом

Анна А. Осипова, Татьяна А. Быкова, Варвара Н. Овечкина, Анастасия С. Боровкова, Олеся В. Паина, Полина В. Кожокар, Анастасия С. Фролова, Кирилл А. Екушов, Александр Н. Галимов, Жемал З. Рахманова, Светлана В. Разумова, Александр Л. Алянский, Елена В. Морозова, Елена В. Бабенко, Татьяна Л. Гиндина, Елена В. Семенова, Людмила С. Зубаровская, Борис В. Афанасьев

НИИ детской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р. М. Горбачевой, Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия

Введение

Ювенильный миелоцитарный лейкоз (ЮММЛ) – агрессивное злокачественное заболевание, несущее в себе черты миелолифоидного заболевания и миелодиспластического синдрома. Аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК) является стандартом терапии пациентов с ЮММЛ. Причинами неудач данного метода лечения остаются рецидивы заболевания и неприживление трансплантата. Цель работы состояла в оценке эффективности и выявлению факторов, влияющих на исход алло-ТГСК у детей с ЮММЛ.

Материалы и методы

В исследование включены 22 пациента в возрасте от 8 мес. до 12 лет (медиана – 4 года), которым в период с 2002 г. по 2019 г. проведено 30 алло-ТГСК (22-первичных, 8 – повторных). Диагноз был установлен в соответствии с международными критериями. В исследовании участвовали 18 мальчиков и 4 девочки. В зависимости от цитогенетических изменений, нормальный кариотип

наблюдался у 10 (45%); моносомия 7 в 7 случаях (31%), другие цитогенетические изменения у 5 (23%). Молекулярно-генетическое исследование проводилось 14 пациентам PTPN11 (8), NRAS (3), KRAS (1), NF1 (2), CBL (1), SETB1 (1), ASLX1 (1), RUNX1(1) не выявлено (1). На момент постановки диагноза уровень тромбоцитов (Тр) составлял от 11 до $419 \times 10^9/L$ (медиана $59,0 \times 10^9/L$); лейкоцитов (Лейк) от 2,6-175,0 (медиана $28,0 \times 10^9/L$). Большинство пациентов до алло-ТГСК получали химиотерапию, в зависимости от клинических проявлений на момент диагностики и были разделены на 2 группы: 1-ая группа – дифференцирующая терапия: 13-цис-ретиноевая кислота; низкие дозы цитозин-арабинозида, гипометилирующие препараты у 13 пациентов; 2-ая группа – высокодозная химиотерапия (FLAM/ADE/HAM) у 9 пациентов. Медиана временного интервала между диагнозом и алло-ТГСК составила 8 мес. (55-2586 дн.). Костный мозг в качестве источника трансплантата использован у 20 пациентов (91%), периферические стволовые клетки крови – у двух больных (9%). Источники ГСК: родственный совместимый донор – 5 (22%) пациентов, неродственный совместимый донор – 12 (55%);

гаплоидентичный донор – 5 (22%). Миелоаблативный режим кондиционирования (МАК) применяли у 19 (86%) пациентов; режим кондиционирования со сниженной интенсивностью доз (РИК) – 3 (14 %). Медиана наблюдения 8 мес. (1-130 мес.).

Результаты

Общая 4-летняя выживаемость (ОВ) по группе составила 56%. Приживление достигнуто у 12 пациентов (59%). Полный донорский химеризм достигнут к 30 дню у 7 пациентов (31%). Смешанный химеризм был отмечен у 2 пациентов (9%), в дальнейшем с утратой и развитием рецидива заболевания; у 1 пациента (4,5%) отмечено вторичное отторжение трансплантата с дальнейшим восстановлением аутогемопоэза. Повторная алло-ТГСК выполнена у 8 пациентов (36%), в связи с неприживлением – у 4, из-за вторичного отторжения – в 4 случаях. ОВ в группе пациентов, получивших высокодозную полихимиотерапию, была 78%, при лечении низкодозной химиотерапией – 45% ($p=0,635$). Имеется тенденция к улучшению ОВ при использовании нерод-

ственного донора 75%/0% ($p=0,281$). При оценке факторов, влияющих на ОВ, показана значимость уровня тромбоцитов на момент постановки диагноза: ОВ при уровне $>30 \times 10^9/\text{л}$ составила 65%; $\text{Тр} < 30 \times 10^9/\text{л}$ была 30% ($p=0,034$). Уровень лейкоцитов, уровень фетального гемоглобина, спленомегалия не показали своего влияния на ОВ (возможно ввиду небольшой выборки). ОВ при острой РТПХ 1-2 ст. – 100%; при 3-4 ст. РТПХ – 0%, при отсутствии ОРТПХ (-) – 33% ($p=0,003$).

Выводы

Алло-ТГСК остается основной терапевтической опцией для пациентов с ЮММЛ. ПХТ оправдана в качестве предтрансплантационной подготовки и рассматривается в каждом случае индивидуально в зависимости от степени миелопролиферативного синдрома.

Ключевые слова

Юношеский миеломоноцитарный лейкоз, лечение, аллогенная трансплантация гемопоэтических клеток.

Treatment of steroid-refractory acute and chronic graft-versus-host disease with ruxolitinib in children

Olesya V. Paina, Tatyana A. Bykova, Ivan S. Moiseev, Polina V. Kozhokar, Anastasia S. Frolova, Anastasiya S. Borovkova, Anna A. Osipova, Zhemal Z. Rahmanova, Kirill A. Ekushov, Liubov A. Tsvetkova, Inna V. Markova, Elena V. Semenova, Ludmila S. Zubarovskaya, Boris V. Afanasyev

Raisa Gorbacheva Memorial Research Institute of Pediatric Oncology, Hematology and Transplantation, Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russia

Contact: Dr. Olesya V. Paina, PhD
E-mail: paina@mail.ru

Introduction

Steroid-refractory graft-versus-host disease (srGVHD) is a life-threatening complication of allogeneic stem cell transplantation. Currently there is no standard of care for this complication and with existing modalities the survival remains relatively low. The study was conducted in children with steroid-refractory or steroid-dependent acute and chronic GVHD.

Patients and methods

The prospective study included 30 patients, (age 1-18 years, median – 5.5 years old). EBMT/ELN criteria were used for steroid refractory disease (T. Ruutu et al., 2014). Sixteen patients (pts) had acute srGVHD and 14 exhibited moderate or severe chronic steroid-refractory GVHD (srGVHD). Eight pts (27%) had acute myeloid leukemia; 7 pts (23%), acute lymphoblastic leukemia; 12 pts (40%) suffered with non-malignant disorders; 3 (10%), with other malignant diseases. The donor type was as follows: unrelated, in 18 cases (60%); matched related donor, in 1 case (3%); haploidentical donors were used for 11 recipients (37%). Patients with acute GVHD had a median of 2 prior lines of therapy (range 1-2), the patients with chronic GVHD had a median of 3 prior lines (range 1 to 6). 13 of 16 acute GVHD patients had grade III-IV disease, and 12 of 14 chronic GVHD patients

had severe (NIH) disease. Ruxolitinib was administered at the starting dose of 0.3 mg/kg/day. Dose modifications were performed in patients in cases with grade 4 hematologic toxicities. Ruxolitinib was continued until complete response or absence of response in 28 days for acute GVHD and six months for chronic GVHD.

Results

Median follow-up for the surviving patients was 20 months (range 6-37). Overall response for acute GVHD was 81%. Complete response (CR) was observed in 11/16 patients with median time to CR 38 days (range 7-122). Three patients were in continuous partial response (PR), and two had progression of the disease. Overall response for chronic GVHD was 100%. 4/14 patients achieved CR after a median of 10.5 months of treatment (range 5-14 months). 10 out of 14 patients achieved PR after a median of 1.3 months of treatment (range 0.2-6.5). Non-relapse mortality occurred in 6/30 patients, GVHD progression was the cause of death in 3 cases, multidrug-resistant sepsis was fatal in 3 cases, and two patients died due to progression of underlying malignancy. Overall survival for patients with aGVHD was 62.5%; for cGVHD, 86%. Dose reduction/drug interruption due to cytopenia was required in 5/16 acute GVHD and 3/14 chronic GVHD patients.