

выживаемости таких пациентов. В настоящее время публикации, посвященные анализу дозировки физической нагрузки у пациентов детского возраста после ТГСК, в рамках физической реабилитации, полны противоречивых данных и методологических вариаций, не дающих адекватного представления о физических возможностях данной категории детей. Мы предлагаем критически взглянуть на современных тренд оценки толерантности физической нагрузки у детей, получающих ТГСК и рассматриваем альтернативные подходы к этой проблеме. Цели работы: 1. Сравнительная оценка снижения мышечной силы и толерантности к физической нагрузке у пациентов в отделении ТГСК на разных этапах терапии. 2. Анализ литературных данных на тему оценки показателей мышечной силы и толерантности к физической нагрузке у пациентов детского возраста, получающих ТГСК.

Объекты и методы

Было проведено проспективное сравнительное нерандомизированное исследование. Оценивали мышечную силу и гемодинамические показатели при выполнении ортоклиностатической пробы у пациентов на разных этапах проведения терапии: до госпитализации в отделение ТГСК (-5 сутки кондиционирования), после проведения процедуры ТГСК (+5 сутки от ТГСК) и при выписке из отделения ТГСК (+ 30 сутки от ТГСК). Для исследования показателей мышечной силы и толерантности к физической нагрузке были отобраны пациенты, проходящие лечение в ФГБУ НМИЦ ДГОИ им. Д. Рогачева МЗ РФ (n=27) с медианой возраста 9 лет. Реабилитационные мероприятия до поступления в отделение ТГСК не проводились.

Результаты

Среднее время от постановки диагноза у пациентов с острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ) и острым миелобластным лейкозом (ОМЛ) до включения в исследование составляло 3 месяца, у пациентов с прочими диагнозами, включающими иммунодефициты и апластическую анемию (АА) – 5 недель. Анализ публикаций проведен по запросу «physical therapy, hematopoietic stem cell transplantation, physical rehabilitation, physical activity» за последние 10 лет из PubMed, Elsevier, ClinicalKey.

Выводы

В группе пациентов с ОЛЛ и ОМЛ еще до проведения подготовки к ТГСК было заметное снижение как гемодинамических, так и силовых показателей в сравнении с другими группами пациентов, готовящихся к проведению ТГСК. Причиной этому явился осложненный до трансплантационный период в виде длительной высокотоксичной терапии. После проведенной ТГСК пациенты обеих групп еще сильнее потеряли мышечную силу и снизили толерантность к физической нагрузке. Физическая терапия позволила улучшить контролируемые показатели мышечной силы и толерантности к физической нагрузке, но не до оптимального уровня. Наиболее перспективным, по данным актуальных публикаций, видится подход профилактического назначения физической терапии пациентам, готовящимся к процедуре ТГСК.

Ключевые слова

Физическая терапия, трансплантация гемопоэтических стволовых клеток, физическая нагрузка, дозировка.

Polymeric micro- and nano-carriers as a universal platform for delivery of biologically active substances to therapeutically cell populations

Albert R. Muslimov^{1,3,5}, Tatyana V. Mashel⁶, Oleksii O. Peltek⁶, Mikhail A. Trofimov⁵, Igor S. Sergeev⁵, Yana V. Tarakanchikova^{4,5}, Alexander A. Goncharenko⁵, Kirill V. Lepik¹, Mikhail V. Zyuzin⁶, Alexander S. Timin^{1,2,3}

¹ Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russia

² RASA Center in Tomsk, Tomsk Polytechnic University, Tomsk, Russia

³ Peter The Great Saint Petersburg Polytechnic University, St. Petersburg, Russia

⁴ Optoelectronics and Measurement Techniques Laboratory, University of Oulu, Oulu, Finland

⁵ Saint Petersburg Academic University, St. Petersburg, Russia

⁶ Department of Nanophotonics and Metamaterials, ITMO University, St. Petersburg, Russia

Contact: Dr. Albert R. Muslimov

E-mail: albert.r.muslimov@gmail.com

Introduction

Gene therapy is one of the most perspective methods of the treatment for a number of hereditary, infectious and oncological diseases. Recently this therapeutic approach has received a new development through the discovery of genome editing tools which have great potential due to their high specificity. However, the absence of safe and effective methods to delivery genetic constructs inside relevant cells is a key limitation for the wide application of this technology

in clinical practice. Viral vectors have already been applied in medical practice, but there are several limitations associated with their use, such as immunogenicity, mutagenesis, inflammatory response. The need to comply with specific technical requirements also determine the high cost of the final product. Thus, the development of new non-viral intracellular genetic materials delivery tools is an urgent task. Recently, polyelectrolyte micro- and nanocapsules have been considered as one of the promising carriers for the safe and effective delivery of biologically active compounds. The use

of biodegradable nanocapsules provides many advantages compared to other delivery systems: high loading capacity, the relatively cheap manufacturing, low toxicity, and the ability to protect the transferred material from the aggressive effects of biological environments of the body. This work aimed to study the effectiveness of the polyelectrolyte capsules as a platform for genetic material delivery.

Materials and methods

The capsules were prepared by layering of oppositely charged of Polyarginine/Dextran sulfate polymers (PARG/DEXS) using Layer-by-Layer technology on calcium carbonate core obtained by co-precipitation of sodium carbonate and calcium chloride aqueous solutions. The following genetic constructs were used: plasmid DNA and messenger RNA, encoding green fluorescent protein (GFP), messenger RNA, encoding TALEN nuclease which causes the deletion of the dTomato gene, and small interfering RNAs (siRNAs) that inhibit the synthesis of GFP. For evaluate the effectiveness of the genetic material delivery by means of polyelectrolyte capsules HEK293T dTomato, HeLa, Mk4 cell lines, and primary cell cultures of human bone marrow mesenchymal stromal cells (hBMSCs) and macrophages were used.

Results

During the research intracellular genetic material delivery platform at the form of polyelectrolyte capsules with a size 300-500 nm have been developed. Such carriers showed low cytotoxicity (viability of more than 90%) in case of using 25:1

capsule to cell ratio. The transfection efficiency of HEK293T dTomato and hBMSCs was 70% for messenger RNA and 40% for plasmid DNA encoding GFP. In the experiment with mRNA delivery to primary human macrophages, transfection efficiency was 60%. Upon transfection of HEK293T dTomato with messenger RNAs encoding TALEN nuclease, knockout of the dTomato gene was observed in 70% of cells. In an experiment with siRNA, suppression of GFP synthesis was detected in 98% of HEK293T HeLa and MK4. For macrophages, mRNA transfection efficiency was about 50%.

Conclusions

We demonstrated that polyelectrolyte capsules are a highly effective and safe platform for *in vitro* genetic material delivery to the cells. In the future, it is planned to conduct *in vivo* experiments to study the opportunity of polyelectrolyte capsules usage for the genetic material delivery.

Acknowledgments

This work was supported by the Russian Foundation for Basic (scientific project No. 19-015-00098). Alexander S. Timin also thanks for support the RFBR (grant No. 18-015-00100). Kirill V. Lepik also thanks for support the RFBR (grant No. 19-29-04025).

Keywords

Polymeric capsules, non-viral delivery systems, cells transfection, nucleic acids, bioactive substances, encapsulation.

Полимерные микро- и наноносители в качестве универсальной платформы для доставки биологически активных веществ в терапевтически релевантные популяции клеток

Альберт Р. Муслимов^{1,3,5}, Татьяна В. Машель⁶, Алексей А. Пельтек⁶, Михаил А. Трофимов⁵, Игорь С. Сергеев⁵, Яна В. Тараканчикова^{4,5}, Александр А. Гончаренко⁵, Кирилл В. Лепик¹, Михаил В. Зюзин⁶, Александр С. Тимин^{1,2,3}

¹ Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия

² RASA центр в Томске, Томский политехнический университет, Томск, Россия

³ Санкт-Петербургский Политехнический Университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия

⁴ Лаборатория оптоэлектроники и измерительной техники, Университет Оулу, Оулу, Финляндия

⁵ Санкт-Петербургский Национальный Исследовательский Академический Университет, Санкт-Петербург, Россия

⁶ Санкт-Петербургский Национальный Исследовательский Университет ИТМО, Санкт-Петербург, Россия

Введение

Генная терапия – перспективный подход в лечении ряда наследственных, инфекционных и онкологических заболеваний. В последнее время этот терапевтический подход получил новое развитие в связи с открытием инструментов редактирования генома. Благодаря высокой специфичности, системы РГ имеют колоссальный потенциал применения, однако, ключевым ограничением для широкого внедрения данной технологии в клиническую практику является проблема эффективной и безопасной доставки генетических конструкторов внутрь релевантных клеток. Вирусные методы доставки уже используются в медицинской практике, однако с их использованием связан ряд ограничений, таких как иммуногенность, мутагенез и воспалительный ответ, а также

необходимость соблюдения особых технических требований производства, обуславливающих высокую стоимость конечного продукта. Таким образом, разработка новых способов невирусной внутриклеточной доставки генетического материала является актуальной задачей.

Одним из перспективных носителей для безопасной и эффективной доставки биологически активных соединений являются полиэлектролитные микро- и нанокapsулы, полученные путем послойного нанесения биодegradируемых полимерных слоев на ядро из карбоната кальция с предварительно иммобилизованным доставляемым компонентом. В сравнении с альтернативными системами доставки, полиэлектролитные капсулы обладают рядом существенных преимуществ: высокая загружающая способность, относительная простота и

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