



ФГБУ "Главный военный клинический
госпиталь имени академика Н.Н. Бурденко"



OpenHematology.ru

НКО «Ассоциация врачей-гематологов»

VII Всероссийская конференция «АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ ГЕМАТОЛОГИИ И ОНКОЛОГИИ»

г. Москва. 13 марта 2020 г.



ПЕРСПЕКТИВЫ ВЫБОРА ТЕРАПИИ МИЕЛОИДНЫХ ЛЕЙКОЗОВ НА ОСНОВЕ ИЗУЧЕНИЯ СВОЙСТВ ИНДИВИДУАЛЬНЫХ КЛЕТОЧНЫХ МОДЕЛЕЙ

Поляков А.С.

Только для медицинских и фармацевтических работников.

Для распространения в местах проведения медицинских или фармацевтических конференций, выставок, семинаров и иных подобных мероприятий

РАСКРЫТИЕ ИНФОРМАЦИИ О ФИНАНСОВОЙ ЗАИНТЕРЕСОВАННОСТИ В ОТНОШЕНИИ ТЕМЫ ДОКЛАДА

- Консультант/лектор: *нет*
- Конфликт интересов по теме доклада: *нет*
- Грант на исследование (получаю грант от): *нет*
- Сотрудник компании (получаю зарплату): *Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург*
- Держатель акций: *нет*

Презентация содержит данные, предоставленные Поляковым Алексеем Сергеевичем (Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова МО РФ, Санкт-Петербург), как опубликованные в открытых источниках, так и полученные в результате клинической практики. Организаторы конференции не несут ответственности за достоверность данных, использованных в презентации



1

ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННЫЕ ПОДХОДЫ В ОНКОЛОГИИ/ОНКОГЕМАТОЛОГИИ



МЕДИЦИНА XXI ВЕКА - МЕДИЦИНА « 4 «П» » (P4 MEDICINE)

- **Предиктивная** (Predictive) - прогнозирование
- **Превентивная** (Preventive) - профилактика
- **Персонализированная** (Personalized) - индивидуализация
- **Партиципаторная** (Participatory) - участие пациента



Персонализированная медицина



- эффективность болезнь-специфичной терапии – 30-60% пациентов... ¹

- ...адаптация терапевтического лечения к индивидуальным особенностям каждого пациента, чтобы **выделить субпопуляции**, отличающиеся по своей предрасположенности к определенному заболеванию или **их ответу на конкретное лечение**... ²

...→∞ новые данные о генотипе, фенотипе, морфологии опухоли	...→∞	...
...→∞ новые методы диагностики	...→∞	!!!
...→∞ новые методы терапии	...→∞	???

• **Персонализированная (Personalized)** - индивидуализация

- **изучение свойств конкретной опухоли**
- **истинно персонифицированный выбор терапии** (основан на изучении восприимчивости к терапии конкретной опухоли)

1. DeGoma E.M., Rivera G., Lilly S.M., et al. Personalized vascular medicine: individualizing drug therapy. Vascular Med 2011; 16(5):391-404. doi: 10.1177/1358863X11422251

2. Дедов Н.И. и др. Персонализированная медицина: современное состояние и перспективы. ВЕСТНИК РАМН /2012/ №12.

3. Поляков А.С., Носков Я.А., Никитин Ю.В. и др. Онкогематология. 2019;14(2):59-69. <https://doi.org/10.17650/1818-8346-2019-14-2-59-69>



• **Персонализированная** (**Personalized**) - индивидуализация



1. Jeong E., Moon S.U., Song M. et al Arch Pharm Res 2017; 40 (8): 906-914. DOI: 10.1007 / s12272-017-0940-z. PMID: 28766239.
2. Muraro M.G., Muenst S., Mele V. et al. Oncoimmunology 2017; 6(7): e1331798. DOL: 10.1080 / 2162402X.2017.1331798. PMID: 28811974.
3. Meijer T.G., Naipal K.A., Jager A. et al. Future Sci OA 2017; 3(2): FSO190. DOI: 10.4155 / fsoa-2017-0003. PMID: 28670477.
4. Yadav B., Pemovska T., Szwajda A. et al. Sci Rep 2014; 4: 5193. DOI: 10.1038 / srep05193. PMID: 24898935.



2

РЕАЛИЗАЦИЯ ПРИНЦИПОВ ИНДИВИДУАЛЬНОГО ВЫБОРА ТЕРАПИИ ПРИ ОМЛ



Исторические аспекты (1/3)

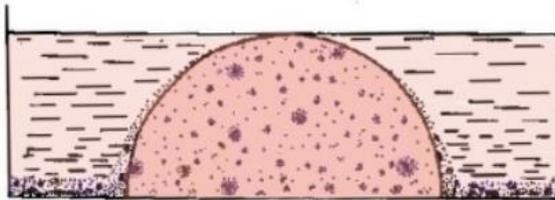
1. Классическая демонстрация принципа индивидуализации - **Антибактериальная терапия**
2. Попытки индивидуализации в «солидной» онкологии ¹
 - неоднородность опухолевой ткани
 - трудности получения материала и выделения основной клеточной популяции
 - сложность (неуниверсальность методов) культивирования
 - высокая генетическая нестабильность и морфологическая изменчивость
3. «Преимущества» опухолей крови
 - относительная простота получения материала (кровь или костный мозг)
 - однородность опухолевого субстрата

1. Имянитов В.Н. Практическая онкология. – 2013, Т.13, №4, С.187-94.

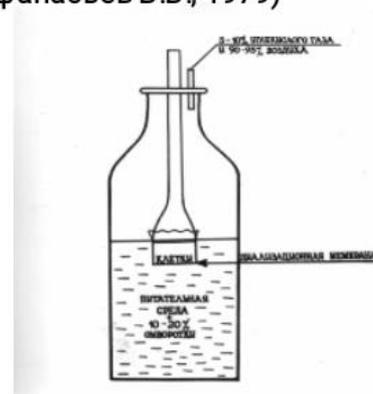
Исторические аспекты (2/3)

3. Изучение роста ГСК и бластов в жидкой среде и агаровой культуре (детский МДС) ¹

Клонирование ГСК в двух-слойной агаровой системе (Pike&Robinson) и системе "агаровая капля-жидкая среда" (модификация Афанасьев Б.В., 1976, 1982)



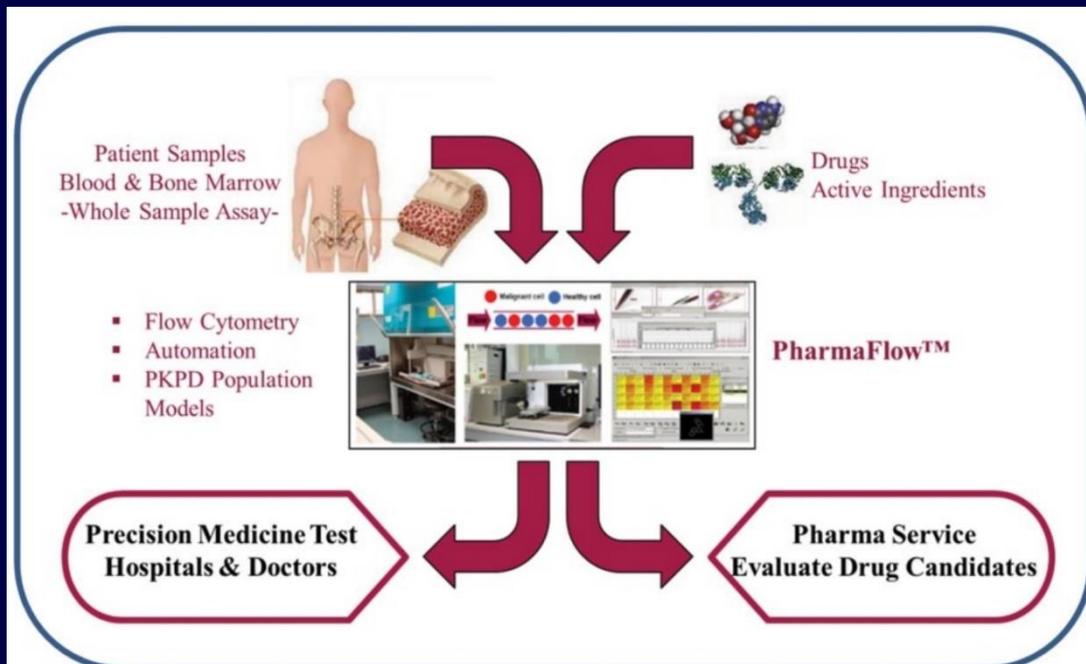
Система Marbrook культивирования в жидкой среде (Golde&Cline, 1973, модификация Афанасьев Б.В., 1979)



1. Тиранова С.А., Алексеев Н.А., Петрова Э.М., Пустовалова А.Г., Бессонова А.Г. Зубаровская Л.С., Афанасьев Б.В. К вопросу о существовании гемопозитических дисплазий (прелейкемий) у детей. Терапевт. архив, 1982, №8, 1-160.
2. Афанасьев Б.В. Гранулоцитопоз при острых лейкозах и бластном кризе. Дисс. канд. мед. Наук, 1982.

Исторические аспекты (3/3)

3. Выбор потенциально активных противоопухолевых агентов (технология PharmaFlow) ¹





3

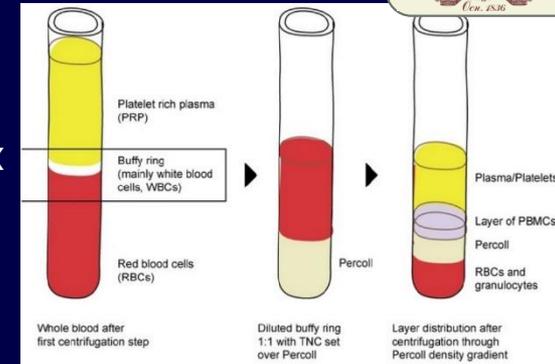
ВОЗМОЖНОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ МОДЕЛИ ОМЛ В ЖИДКОЙ КУЛЬТУРЕ

Ex vivo–модель ОМЛ, перспективы индивидуализации терапии

Материалы и методы. Формирование модели ОМЛ Ex vivo



- Суспензионные культуры бластных клеток инкубировались в термостате (37°C, 5% CO₂) в стерильных пробирках на 15 мл.
- Полная питательная среда (ППС) для культивирования во всех экспериментах содержала следующие компоненты:
 - 80% RPMI-1640
 - 10% эмбриональной телячьей сыворотки
 - 10% оригинальной сыворотки больного
 - 10 мкл ФГА
 - 100 ЕД/мл пенициллина
- Криоконсервирование – создание устойчивой клеточной линии полирезистентного ВОМЛ (Линия «К»)



Слушатель ВНОКС Жоголев Д.К.



4

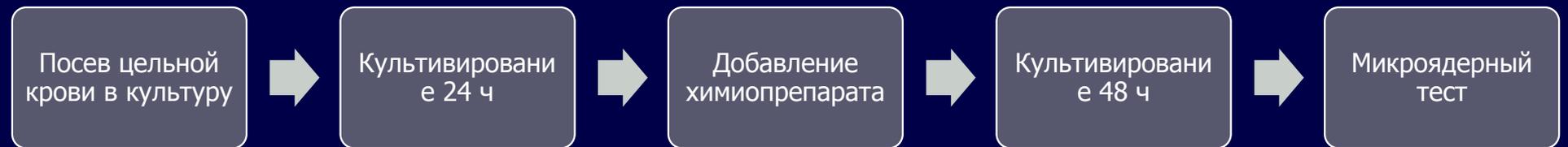
АПРОБАЦИЯ МЕТОДОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ХИМИОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ / ГЕНОТОКСИЧНОСТИ

Ex vivo–модель ОМЛ, перспективы индивидуализации терапии

Схема опыта на цитотоксичность с применением клеточного сортирования



Схема опыта на генотоксичность с применением микроядерного теста



Сортировка CD34+ клеток

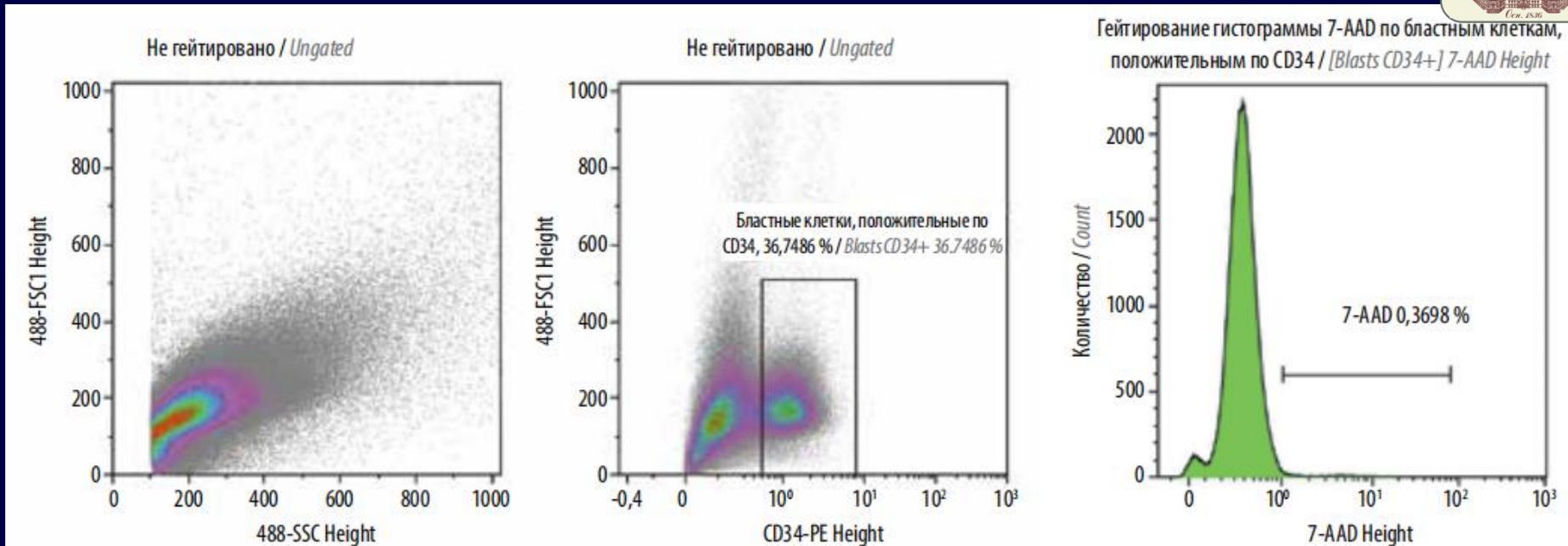


Рис. 2. Выделение клеток CD34+ при сортировке (Fluorescence activated cell sorting)

Fig. 2. Results of sorting CD34+ cells (Fluorescence activated cell sorting)

Химиочувствительность CD34+ клеток

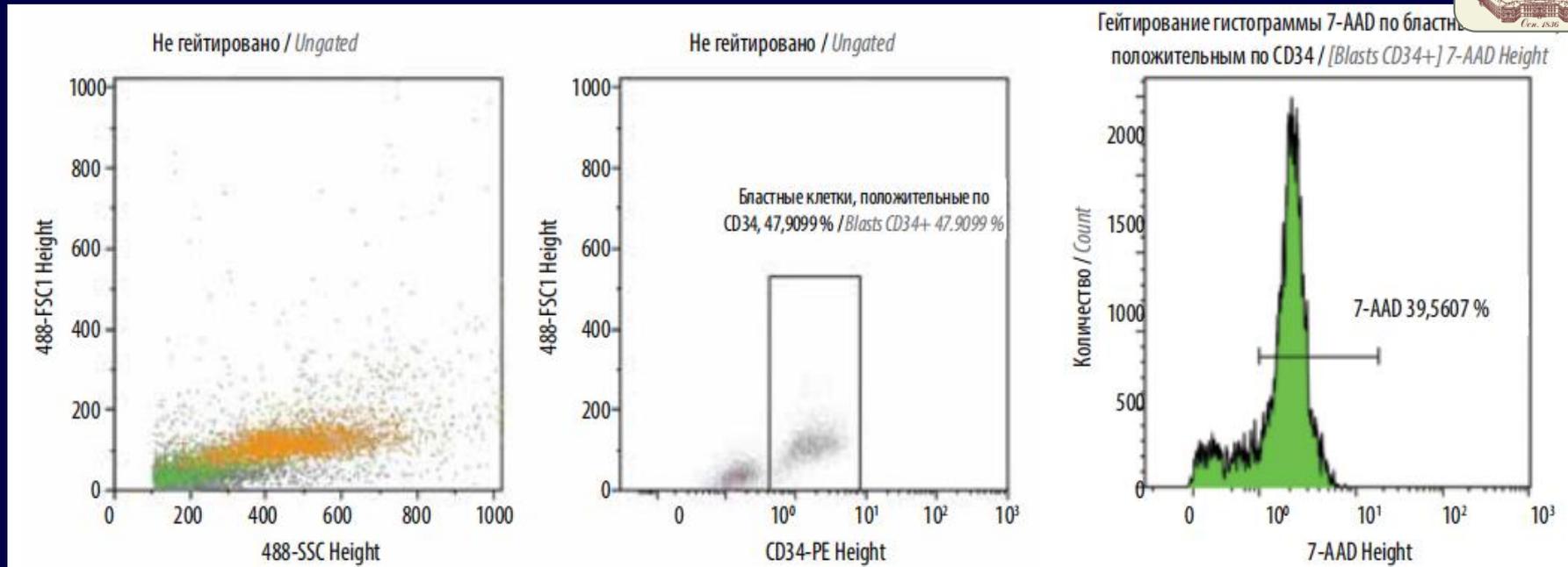


Рис. 4. Оценка жизнеспособности клеток после культивирования с химиопрепаратом

Fig. 4. Evaluation of cell viability after cultivation with chemotherapeutic agent

Ex vivo–модель ОМЛ, перспективы индивидуализации терапии

Схема опыта на цитотоксичность с применением клеточного сортирования



Схема опыта на генотоксичность с применением микроядерного теста



1. Поляков А.С., Носков Я.А., Никитин Ю.В., Тыренко В.В., Колюбаева С.Н., Богданов А.Н., Семелев В.Н., Петрова О.Р., Бондарчук С.В., Жоголев Д.К., Золотарёв А.Д., Ковалев А.В., Пучкова Ю.Е. Разработка ex vivo-модели и оценка химиочувствительности бластных клеток в индивидуализации терапии острых миелоидных лейкозов. Онкогематология. 2019;14(2):59-69. <https://doi.org/10.17650/1818-8346-2019-14-2-59-69>

Микроядерный тест с цитохалазином (генотоксичность)

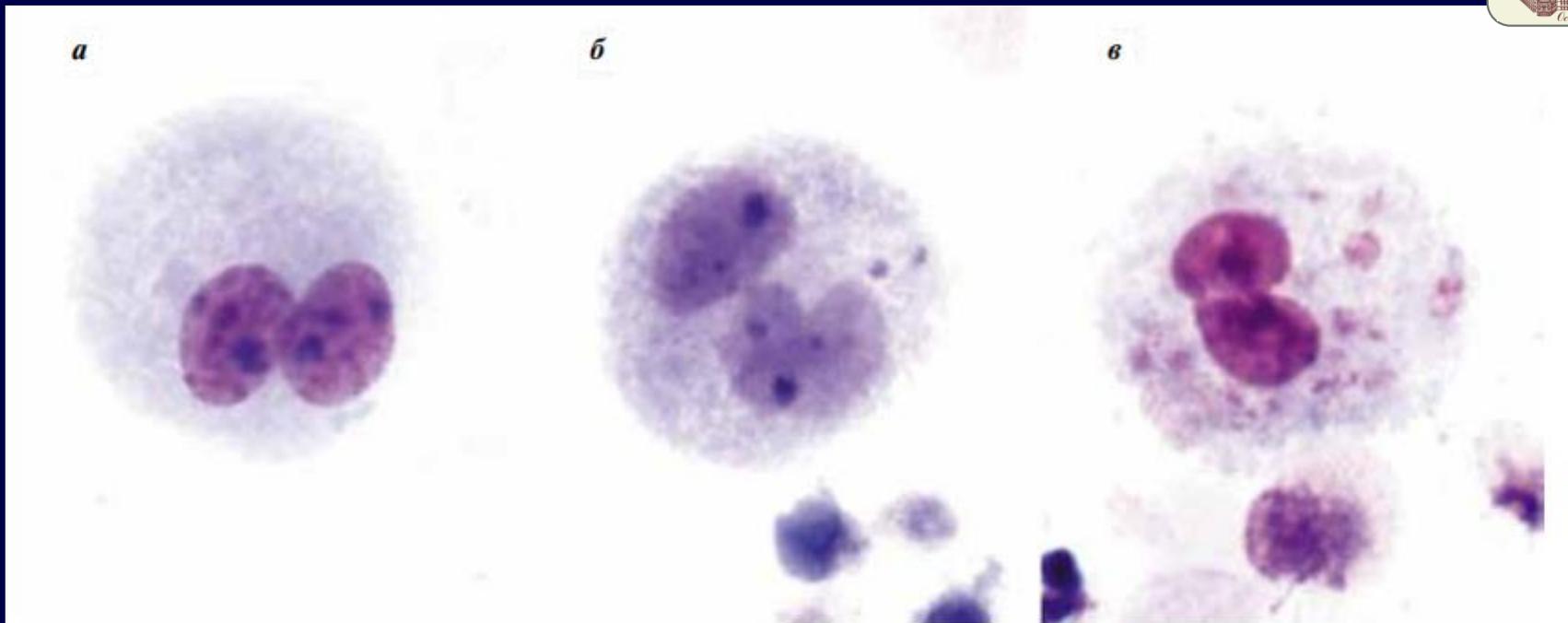


Рис. 1. Двухъядерные клетки в микроядерном тесте: а – без микроядер (контроль), б – с двумя микроядрами, в – с множественными микроядрами
Fig. 1. Binuclear cells in micronucleus test: a – without micronuclei (control), б – with two micronuclei, в – with multiple micronuclei

1. Поляков А.С., Носков Я.А., Никитин Ю.В., Тыренко В.В., Колюбаева С.Н., Богданов А.Н., Семелев В.Н., Петрова О.Р., Бондарчук С.В., Жоголев Д.К., Золотарёв А.Д., Ковалев А.В., Пучкова Ю.Е. Разработка ex vivo-модели и оценка химиочувствительности бластных клеток в индивидуализации терапии острых миелоидных лейкозов. Онкогематология. 2019;14(2):59-69. <https://doi.org/10.17650/1818-8346-2019-14-2-59-69>



Микроядерный тест с цитохалазином (генотоксичность)

1. Водорастворимые препараты:

- цитарабин,
- даунорубицин,
- идарубицин,
- митоксантрон,
- децитабин,
- интерферон альфа-2а,
- даунорубицин + интерферон альфа-2а
- цитарабин + интерферон альфа-2а

2. Разведения: от 1 до 3 разведений, максимально для децитабина (290, 580 и 1160 нг/мл) и для даунорубицина (1700, 3400 и 6800 нг/мл), минимально для интерферона альфа-2а (только 3600 МЕ/мл)

3. Кратность различий в различных пробах и контроле составляла от 1,7 до 14,4

4. «-» элементы неточности и субъективизма

Разрабатываемые методы



1. Усовершенствование (**-упрощение???**) методов выделения и культивирования опухолевых клеток
2. Обоснование выбора и апробация других **воспроизводимых методов оценки химиочувствительности** (подсчета живых и погибших клеток - точно или Real time)
3. Применимость к оценке эффективности «не водорастворимых» препаратов
4. Перспективы внедрения в клиническую практику (?)

На фото: слушатели факультетов подготовки врачей – члены ВНОКС кафедры факультетской терапии Золотарев А.Д. и Жоголев Д.К.

Ex vivo-модель ОМЛ, перспективы индивидуализации терапии

Перспективы применения xCELLigence® Real-Time Cell Analyzers

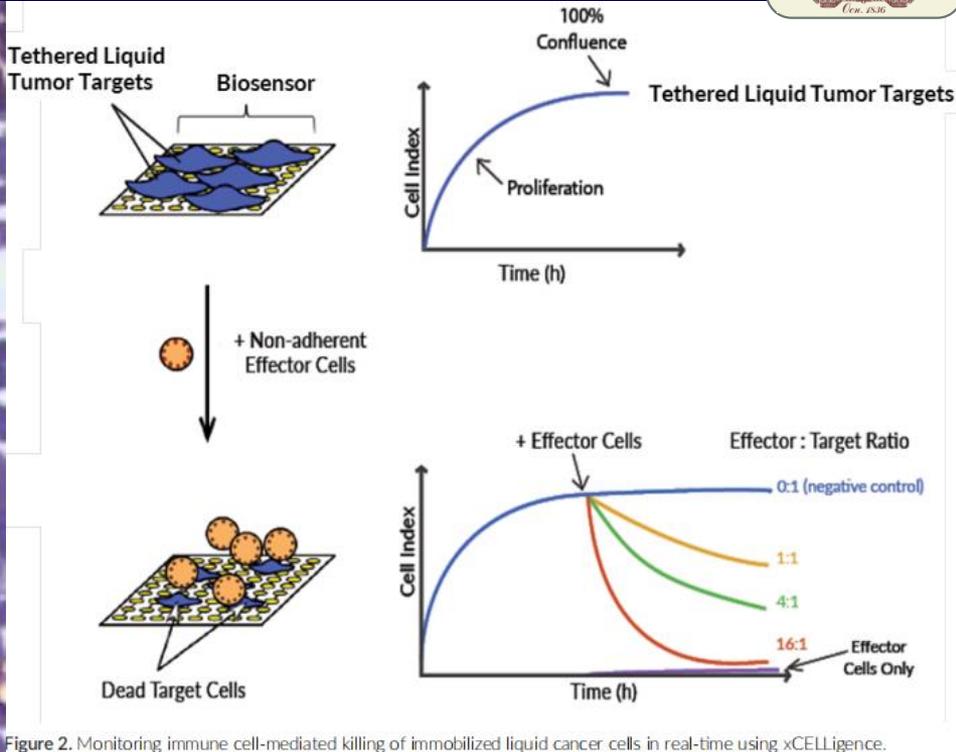
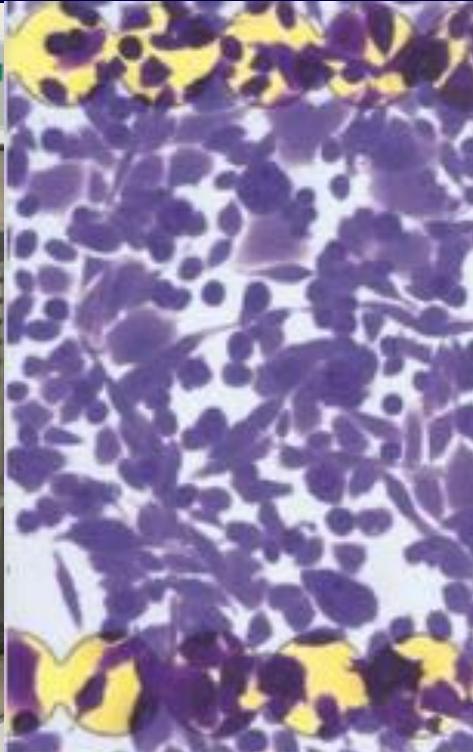
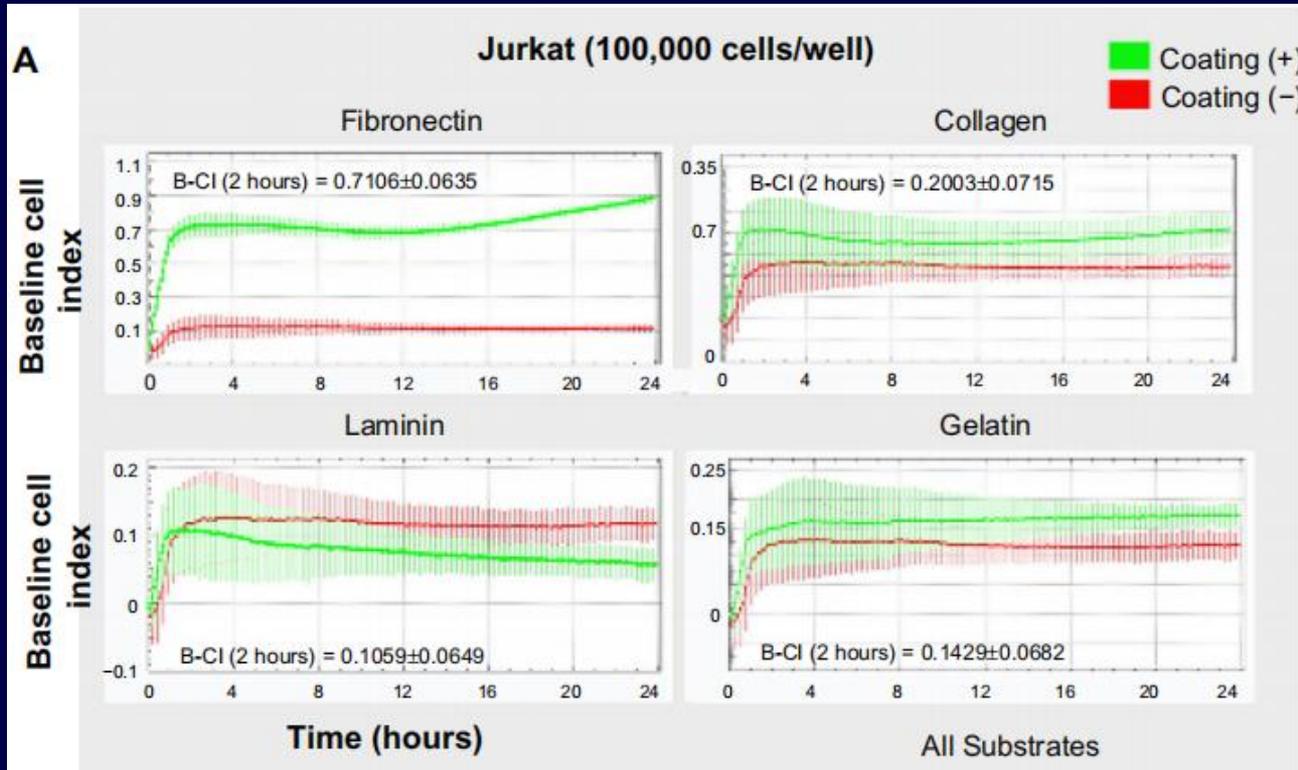


Figure 2. Monitoring immune cell-mediated killing of immobilized liquid cancer cells in real-time using xCELLigence.

1. Cerignoli et al. In Vitro Immunotherapy Potency Assays Using Real-Time Cell Analysis. PLoS One. 2018 Mar 2;13(3):e0193498.
2. Peper et al. An impedance based cytotoxicity assay for real-time and label-free assessment of T-cell-mediated killing of adherent cells. J Immunol Methods. 2014 Mar;405:192-8.

Ex vivo–модель ОМЛ, перспективы индивидуализации терапии

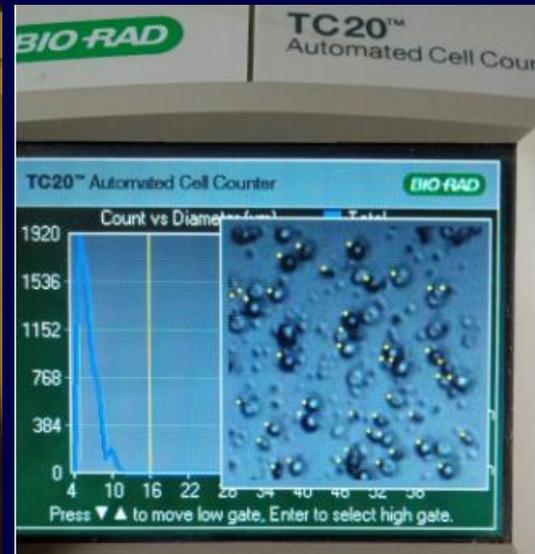
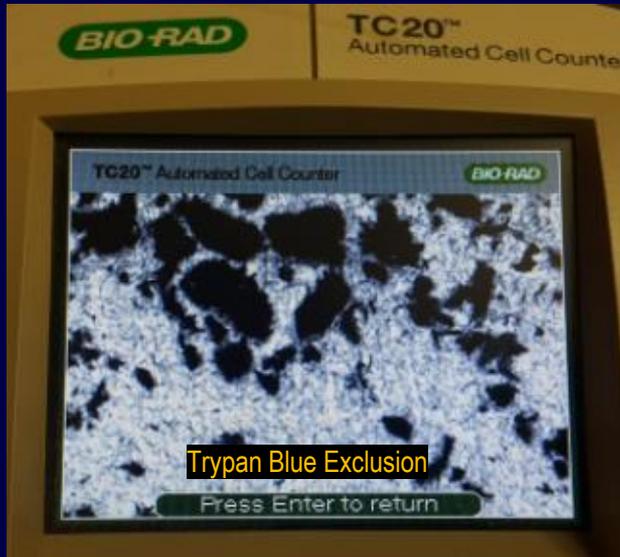
Перспективы применения xCELLigence® Real-Time Cell Analyzers



1. Jordi Martinez-Serra et al. xCELLigence system for real-time label-free monitoring of growth and viability of cell lines from hematological malignancies / *OncoTargets and Therapy* 2014;7 985–994

Ex vivo–модель ОМЛ, перспективы индивидуализации терапии

Применение счетчика BioRad® TC20 Automated Cell Counter



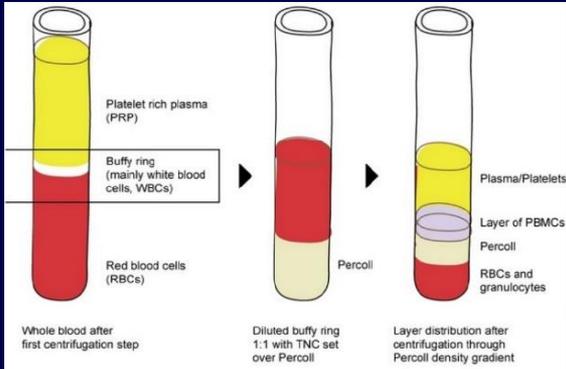
1. Возможность быстрой точной объективной оценки количества «живых» и «погибших» клеток в нативных средах или культуре
2. «-» - необходимость предварительного выделения клеток, для определения «погибших» необходима очистка от «шлаков»

1. Urja N. Desai et al. Enhancement of the cytotoxic effects of Cytarabine in synergism with Hesperidine and Silibinin in Acute Myeloid Leukemia: An in-vitro approach / Journal of Cancer Research and Therapeutics - April-June 2015 - Volume 11 - Issue 2

Ex vivo–модель ОМЛ, перспективы индивидуализации терапии

Применение счетчика BioRad® TC20 Automated Cell Counter

Варианты решения проблем (выделение, очистка):



- 1. Flow-сортировка
- 2. культуральное выделение

3. масс-оптическая сепарация СРЕКТРА OPTIA®



• **Персонализированная** (**Personalized**) - индивидуализация



1. Поляков А.С., Носков Я.А., Никитин Ю.В., Тыренко В.В., Колюбаева С.Н., Богданов А.Н., Семелев В.Н., Петрова О.Р., Бондарчук С.В., Жоголев Д.К., Золотарёв А.Д., Ковалев А.В., Пучкова Ю.Е. Разработка ex vivo-модели и оценка химиочувствительности бластных клеток в индивидуализации терапии острых миелоидных лейкозов. Онкогематология. 2019;14(2):59-69. <https://doi.org/10.17650/1818-8346-2019-14-2-59-69>

Ex vivo–модель ОМЛ, перспективы индивидуализации терапии



УТВЕРЖДАЮ

Министр обороны Российской Федерации
генерал армии

С.Шойгу

«___» _____ 2020 г.

**ПРОГРАММА РАЗВИТИЯ
ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО ВОЕННОГО
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ВОЕННО-МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ ИМЕНИ С.М.КИРОВОА»
МИНИСТЕРСТВА ОБОРОНЫ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
НА ПЕРИОД ДО 2025 ГОДА**

Благодарности:

(творческие коллективы)

- Кафедра и клиника факультетской терапии к.м.н. Носков Я.А., Петров В.В.
- Научно-исследовательский институт клинической терапии
- Кафедра клинической терапии
- Кружок Военно-научной клинической факультетской терапии



С.М. Кирова)

а – д.м.н. проф. Тыренко В.В.,
клинической лаборатории.

Н.

– Никитин Ю.В.

(НОКС) при кафедре
Г.А., Сербин А.Н.



Здание Михайловской клинической больницы

Клинической терапии Военно-медицинской академии