





ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
НАУКИ «КИРОВСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ  
ГЕМАТОЛОГИИ И ПЕРЕЛИВАНИЯ КРОВИ ФЕДЕРАЛЬНОГО МЕДИКО-  
БИОЛОГИЧЕСКОГО АГЕНТСТВА»

# **Актуальные вопросы трансфузиологии и онкогематологии**

**г.Киров**

**9-10 ноября 2023 года**

УДК 615.38+616.1/9

ББК 53

A437

Актуальные вопросы трансфузиологии и онкогематологии [Текст]: сб. материалов научн.-практ. конф. молодых ученых и спец. / [редкол.: И.В.Парамонов (отв. ред.) и др.] - Киров: ООО «Флат-Принт», 2023. – ... с.

Conference Organizer:

FSBSI «Kirov Scientific Research Institute of Hematology and Blood Transfusion

FMBA of Russia» Editorial Council:

Responsible editor: I. V. Paramonov - Ph.D., director of FGBUN «Kirov Scientific Research Institute of Hematology and Blood Transfusion of FMBA of Russia»;

Deputy Executive Editor: K.A. Vorobiev - Doctor of Biology Sciences, Deputy of

Director for Research;

Executive Secretary: M.E. Kovtunova - Associate Professor, Scientific Secretary of the Institute.

Topical issues of transfusiology and oncohematology / FSBSI RRI of H&BT of FMBA of Russia. -  
Kirov: Open Company «Flat-Print», 2023. - 235 with.

ISBN

Collection of scientific works of the Scientific and Practical Conference of young scientists and specialists «Actual questions of transfusion and oncohematology». The collection contains articles on topical problems of industrial and clinical transfusiology, diagnosis and treatment of oncohematological diseases.

© FSBSI «Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion of FMBA of Russia»,  
2023

© Design. LLC «Concordica», 2023 ISBN

СОДЕРЖАНИЕ

*Дубровина А.А., Трегубова Е.В., Назарова Е.Л., Осипова Е.С., Фокина Е.С. Ассоциация мутационного статуса гена NOTCH1 с молекулярно-генетическими характеристиками хронического лимфолейкоза . . . . . 8*

*Дружинина С.С., Логинова М.А., Смирнова Д.Н., Обухов И.П., Репницына К.О., Парамонов И.В. Результаты подбора совместимых доноров для пациентов с редкими HLA-аллелями в генотипе . . . . . 18*

*Загарских А.Н., Исаева Н.В., Осипова Е.С. Аутоиммунные антитромбоцитарные антитела при иммунной тромбоцитопенической пурпуре. . . . . 28*

*Коновалова Е.А., Калинина Е.Н., Кормицикова Е.С., Йовдий А.В. Оптимизация методики определения содержания антирезус Rh<sub>0</sub>(D) антител методом непрямой агглютинации в геле . . . . . 34*

*Коновалова Е.А., Вильданова Н.С., Рыболовлева Т.Н., Кормицикова Е.С. Определение содержания анти-D антител методом неконкурентного иммуноферментного анализа . . . . . 40*

*Коробов С.О., Назарова Е.Л., Прозоров Д.В. Взаимосвязь тяжелых инфекционных осложнений острого миелоидного лейкоза с полиморфным профилем генов иммунного ответа . . . . . 49*

*Кудрявцева Т.Л., Попонина Е.А., Попова С.В., Пестрикова А.О., Назарова Е.Л., Воробьев К.А., Караваева А.В., Рыболовлева Т.Н., Смирнова Д.Н. Получение псевдолентивирусных частиц, несущих универсальный химерный антигенный рецептор. . . . . 58*

*Лагунова М.В., Зорина Н.А., Минаева Н.В., Хоробрых М.Н. Сравнительный анализ токсичности режимов предтрансплантационной подготовки перед ауто-ТГСК при множественной миеломе . . . . . 70*

*Минаев М.С., Перфилова Е.А., Ванеева Е.В., Глубоковских Н.В., Дьяконов Д.А. Гистопатологические особенности и прогностическое значение Т- и В-клеток опухолевого микроокружения при нодулярном склерозе классической лимфомы Ходжкина . . . . . 79*

- Морозова М.Л., Исаева Н.В., Хоробрых М.Н.** Влияние минимальной остаточной болезни в предтрансплантационном периоде у больных множественной миеломой на восстановление гемопоэза . . . . . 95
- Обухов И.П., Логинова М.А., Смирнова Д.Н., Дружинна С.С., Репницына К.О., Парамонов И.В.** Оценка поиска информативных маркеров у пар пациент/донор для мониторинга химеризма методом InDel-ПЦР. . . . . 103
- Пестрикова А.О., Попонина Е.А., Попова С.В., Кудрявцева Т.Л., Исаева Н.В., Воробьев К.А.** Трансдукция лимфоцитов лентивирусными частицами, несущими универсальный химерный антигенный рецептор. . . . . 111
- Пинегина М.С., Кривокорытова Т.В., Шерстнев Ф.С., Калинина С.Л., Вязникова О.Э., Панихина Н.Р.** Тромботическая тромбоцитопеническая пурпура — проблемы диагностики и терапии (Клинический случай) . . . . . 119
- Прозоров Д.В., Назарова Е.Л., Рыболовлева Т.Н., Коробов С.О., Хоробрых М.Н.** Реактивация ВК-вируса после трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток . . . . . 126
- Репницына К.О., Логинова М.А., Смирнова Д.Н., Дружинина С.С., Обухов И.П.** Оценка результатов поиска совместимых доноров для пациентов, нуждающихся в трансплантации гемопоэтических стволовых клеток. . . . . 134
- Рыболовлева Т.Н., Трегубова Е.В., Назарова Е.Л., Фокина Е.С., Докшина И.А.** Оценка уровня свободно циркулирующей ДНК у онкогематологических больных 142
- Сарнова М.В., Дьяконов Д.А., Ванеева Е.В., Росин В.А., Самарина С.В.** Взаимосвязь коэкспрессии белков p14ARF и p53 с выживаемостью больных диффузной В-крупноклеточной лимфомой . . . . . 153
- Смирнова Д.Н., Логинова М.А., Дружинина С.С., Обухов И.П., Репницына К.О., Парамонов И.В.** Иммуногенетическая характеристика русских доноров гемопоэтических стволовых клеток, проживающих в азиатской части России. 162
- Смольникова М.В., Йовдий А.В., Шерстнев Ф.С.** Антиэритроцитарные антитела у пациентов гематологической клиники . . . . . 183

*Трегубова Е.В., Сарпова М.В., Назарова Е.Л., Минаев М.С., Дьяконов Д.А. Микросателлитная нестабильность и aberrации локуса 9p24.1 при классической лимфоме Ходжкина . . . . . 189*

*Турубанова А.Н., Сарпова М.В., Дьяконов Д.А., Росин В.А., Самарина С.В., Головки С.Д. Взаимосвязь хромосомных aberrаций в локусе BCL6 (3q27) с выживаемостью больных диффузной В-крупноклеточной лимфомой . . . . . 197*

УДК 616-006.446.2

ГРНТИ 76.29.33

*А.А. Дубровина*

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», Киров  
младший научный сотрудник  
лаборатории клеточной и молекулярной иммунологии

*A.A.Dubrovina*

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical and Biological Agency, Kirov  
Junior Researcher of the Laboratory of Cellular And Molecular Immunology  
E-mail: dubrovina@niigpk.ru

*Е.В. Трезубова*

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», Киров  
младший научный сотрудник  
лаборатории клеточной и молекулярной иммунологии

*E.V. Tregubova*

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical and Biological Agency, Kirov  
Junior Researcher of the Laboratory of Cellular And Molecular Immunology  
E-mail: tregubova@niigpk.ru

*Е.Л. Назарова*

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», Киров  
кандидат медицинских наук, заведующая лабораторией  
клеточной и молекулярной иммунологии



*E.L. Nazarova*

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of  
Hematology and Blood Transfusion under  
the Federal Medical and Biological Agency, Kirov  
PhD, MD, Head of the of the Laboratory of Cellular And Molecular Immunology  
E-mail: nazarova@niigpk.ru

*E.C. Осипова*

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский  
научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови  
Федерального медико-биологического агентства», Киров  
врач-гематолог клинико-диагностического отделения  
гематологии и химиотерапии

*E.S. Osipova*

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of  
Hematology and Blood Transfusion under  
the Federal Medical and Biological Agency, Kirov  
Hematologist of Clinical and Diagnostics Department of Hematology and  
Chemotherapy  
E-mail: elena.osipova93@bk.ru

*E.C. Фокина*

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский  
научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови  
Федерального медико-биологического агентства», Киров  
к.м.н., врач-гематолог взрослого отделения гематологии и химиотерапии

*E.S. Fokina*

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of  
Hematology and Blood Transfusion under  
the Federal Medical and Biological Agency, Kirov  
PhD, MD, Hematologist of Adult Department of Hematology and Chemotherapy  
E-mail: fokina@niigpk.ru

## Ассоциация мутационного статуса гена *NOTCH1* с молекулярно-генетическими характеристиками хронического лимфолейкоза

### The association of the *NOTCH1* gene mutation status with molecular and genetic specifications of chronic lymphocytic leukemia

**Аннотация.** В работе изучена частота встречаемости мутации *c.7544\_7545delCT* гена *NOTCH1* у пациентов с хроническим лимфолейкозом в зависимости от гендерных и возрастных особенностей, от стадии заболевания, а также от мутационного статуса генов *IGHV*. Доказана ассоциация делеции гена *NOTCH1* с немутированным подтипом ХЛЛ.

**Abstract.** At this study the frequency of a mutation *c.7544\_7545delCT* of the *NOTCH1* gene has been studied in patients with chronic lymphocytic leukemia depending on gender and age features, on the disease stage, and also the mutational status of *IGHV* genes. It was demonstrated the deletion of the *NOTCH1* gene has been associated with unmutated CLL.

**Ключевые слова:** хронический лимфолейкоз; *NOTCH1*; гены переменных участков тяжелых цепей иммуноглобулинов; немутированный подтип.

**Index terms:** chronic lymphocytic leukemia; *NOTCH1* gene; immunoglobulin heavy chain variable region genes; unmutated CLL.

Хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ) относится к группе лимфоидных злокачественных новообразований и характеризуется накоплением в крови, костном мозге и лимфатических органах атипичных CD5+ зрелых В-лимфоцитов [12, 4, 6]. Для ХЛЛ типичны крайне гетерогенные клинические проявления: от индолентного течения с отсутствием необходимости в лечении на протяжении многих лет, до агрессивного, рецидивирующего с назначением терапии уже в дебюте заболевания [4].

Изучение причин такого переменного течения ХЛЛ привело к открытию двух пулов клеток, отличающихся между собой уровнем соматических гипермутаций (СГМ) генов переменных участков тяжелых цепей иммуноглобулинов (Immunoglobulin Heavy Chain Variable Region Gene, *IGHV*) В-клеточного рецептора. Субстратом мутированного подтипа заболевания (М-ХЛЛ) являются клетки с перестроенными генами *IGHV*, контактировавшие с антигеном и трансформировавшиеся уже после выхода из герминативного центра [4, 3]. В-клетки, которые не дифференцировались в герминативном центре лимфоузлов и не подвергались

СГМ генов, характеризуют немутированный подтип ХЛЛ (нМ-ХЛЛ). При нМ-ХЛЛ наблюдается раннее развитие рецидива, быстрое прогрессирование заболевания и короткая продолжительность достигнутого ответа на терапию флударабином [12, 3]. Кроме того, при нМ-ХЛЛ чаще, чем при М-ХЛЛ, обнаруживаются мутации драйверных генов [3].

Необходимо отметить, что СГМ происходит и в В-клетках здоровых людей, однако в опухолевых клетках экспрессируется более узкий профиль генов *IGHV* [2]. Так, при ХЛЛ чаще перестраиваются гены *IGHV3-23*, *IGHV3-7*, *IGHV1-69*, *IGHV4-34* семейств VH3, VH1 и VH4. В большей степени в патогенезе нМ-ХЛЛ участвуют гены семейства VH1 [8, 2]. Многими исследователями установлено, что вовлечение определенных *IGHV*-генов коррелирует с клиническим течением заболевания [8, 12]. Например, ген *IGHV3-21/IGVL3-21* является независимым маркером неблагоприятного прогноза и встречается практически с одинаковой частотой при М-ХЛЛ и нМ-ХЛЛ [8].

Несмотря на доказанную значимость определения мутационного статуса генов *IGHV* у пациентов с ХЛЛ, не удается до конца объяснить гетерогенность характера течения заболевания, так как внутри этих генетических подтипов могут наблюдаться различия в поведении опухолевого клона. Вариабельность клинических проявлений ХЛЛ и эффективность терапии обусловлена и генетическими нарушениями, которые способствуют сохранению и поддержанию высокого пролиферативного потенциала опухолевого клона [1, 12]. Аномалии генов сигнального пути NOTCH (Translocation-association Notch Homolog) приводят к нарушениям процессов апоптоза и терминальной стадии дифференцировки В-лимфоцитов, обеспечивают длительную выживаемость этих клеток и резистентность к терапии моноклональными антителами против CD20 [7]. Мутации драйверного гена *NOTCH1* (Translocation-association Notch Homolog, Tan1) определяются у 8-15% больных в любой стадии заболевания [1, 7]. В 75-80% случаев ХЛЛ с абберрантным геном *NOTCH1* наблюдается делеция с.7544\_7545delCT в экзоне 34, приводящая к сдвигу рамки считывания и образованию стоп-кодона [5, 10]. При этом транслируется усеченная форма трансмембранного рецептора без С-концевого домена PEST, ответственного в норме за убиквитирование и деградацию белка [11], тем самым приводя к накоплению активного белка и неконтролируемой передаче сигнала по NOTCH1-пути [10, 7]. Мутация с.7544\_7545delCT чаще определяется в опухолевых клетках с немутированными генами *IGHV* [10] и связана

с низкой выживаемостью пациентов ХЛЛ, резистентностью к лечению и риском прогрессирования заболевания [10].

Таким образом, мутационный статус гена *NOTCH1* можно рассматривать как потенциальный дополнительный маркер при стратификации пациентов на группы риска совместно с определением молекулярно-генетического подтипа ХЛЛ, а также для выбора риск-адаптированной терапии.

**Цель.** Оценить частоту встречаемости мутации с.7544\_7545delCT гена *NOTCH1* у пациентов с ХЛЛ в зависимости от возрастных и гендерных характеристик пациентов, а также клинических и молекулярно-генетических особенностей заболевания.

### **Материалы и методы.**

В исследование включено 79 пациентов с ХЛЛ, наблюдавшихся в клинике КНИИГиПК ФМБА России в период с января 2019 г. по май 2023 г. Из них 46 (58,2%) мужчин и 33 (41,8%) женщины (соотношение – 1,4:1). Возраст больных в дебюте заболевания составил от 36 до 93 лет, медиана – 66 лет (Q1-Q3:58-70). Стадия А по классификации, предложенной J. Binet et al., 1981, при диагностике ХЛЛ установлена у 31 (39,2%) больного ХЛЛ, стадия В – у 34 (43,0%) и стадия С – у 14 (17,8%) пациентов.

В качестве исследуемого материала использовались образцы ДНК, выделенные из периферической крови и костного мозга больных ХЛЛ. На момент взятия материала у 11 (13,9%) пациентов заболевание находилось на стадии диагностики, у 32 (40,5%) – в асимптоматической стадии, у 21 (26,6%) больного – перед назначением терапии 1 линии, у 2 (2,5%) – полная ремиссия, у 8 (10,1%) – рецидив, у 3 (3,8%) – прогрессия на фоне терапии, у 1 (1,3%) – смена химиотерапии (в связи с неэффективностью предыдущей линии), у 1 (1,3%) – трансформация в синдром Рихтера.

Мутацию с.7544\_7545delCT гена *NOTCH1* определяли в образцах ДНК методом полимеразной цепной реакции с использованием комплекта реагентов «SYBR Green PCR Master Mix» («Applied Biosystems», США) путем детекции в реальном времени на амплификаторе нуклеиновых кислот «QuantStudio 5» («Life Technologies Holdings Pte. Ltd.», Сингапур).

Мутационный статус генов *IGHV* определяли методом прямого секве-

нирования по Сэнгеру с использованием генетического анализатора «Applied Biosystems 3500X1» (США) в соответствии с рекомендациями Европейской инициативной группы по исследованию хронического лимфолейкоза (ERIC). Анализ и интерпретацию полученных последовательностей осуществляли с помощью онлайн-программы IMGT/V-QUEST ([https://www.imgt.org/IMGT\\_vquest/vquest](https://www.imgt.org/IMGT_vquest/vquest)), одобренной ERIC и Комитетом по номенклатуре генов человека (HGNC). При совпадении исследуемых нуклеотидных последовательностей *IGHV*-генов с герминальными генами более чем на 98% присваивался немутированный статус ХЛЛ (нМ-ХЛЛ), при идентичности менее 98% – мутированный (М-ХЛЛ).

Статистическую обработку данных проводили с помощью программного обеспечения STADIA. При сравнении категориальных переменных использовали двусторонний точный критерий Фишера и метод сравнения пропорций (post-hoc-анализ) с применением поправки Бенджамини-Хохберга. Статистически значимыми считали различия при  $p < 0,05$ .

**Результаты.** Мутация с.7544\_7545delCT гена *NOTCH1* выявлена у 11 из 79 (13,9%) пациентов с ХЛЛ. Делетированный вариант обнаружен у 6/46 (13,0%)

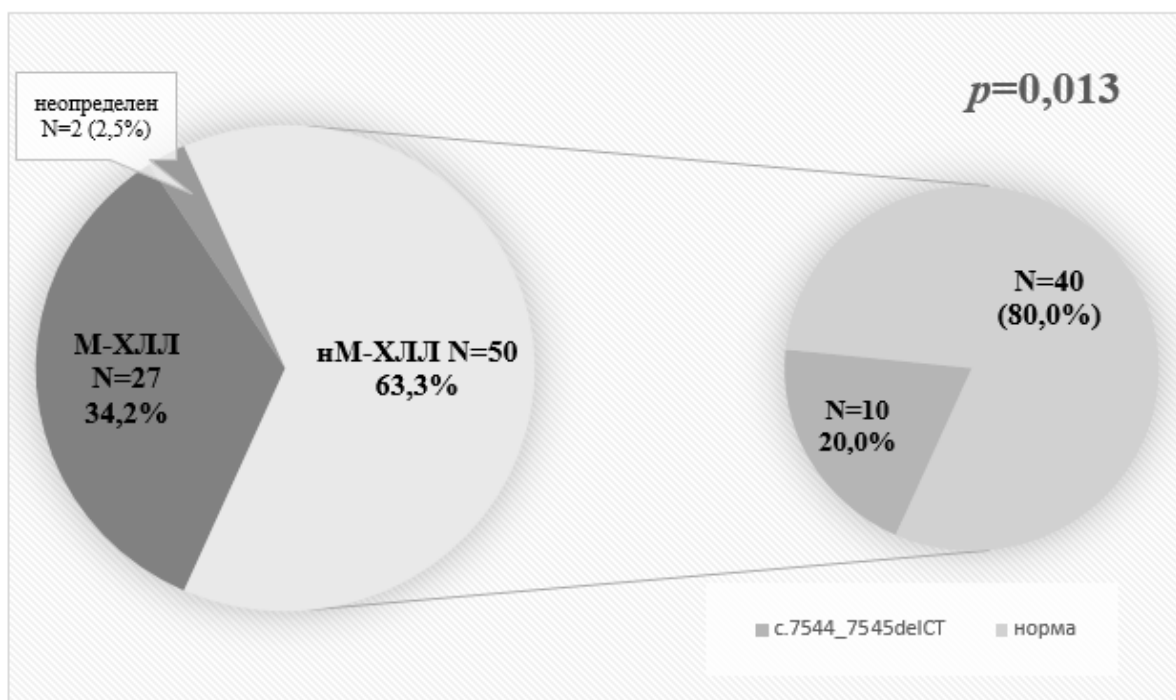


Рисунок 1 – Частота встречаемости мутации с.7544\_7545delCT гена *NOTCH1* в группах ХЛЛ

Проведено исследование репертуара семейств *IGHV*-генов. Чаще мутированные *IGHV*-гены относились к семействам VH1 – 20 (26,0%), VH3 – 32 (41,6%), VH4 – 19 (24,7%) образцов. Мутация с.7544\_7545delCT в большинстве случаев сочеталась с генами семейств: VH4 (4/10 – 40%), VH1 (3/10 – 30%), VH2, VH3 и VH5 – по 1 случаю (по 10% соответственно). При парных сравнениях (post-hoc-анализ) обнаружено, что у больных ХЛЛ делеция *NOTCH1* достоверно реже встречалась в комбинации с генами семейства VH3 (p=0,03; ОШ=0,13; 95% ДИ=0,02-1,11) (таблица 1).

Таблица 1 – Мутационный статус генов *NOTCH1* и *IGHV* у больных хроническим лимфоцитарным лейкозом

Семейство VH-генов (кол- во случаев)	Статус гена <i>NOTCH1</i>		p	нМ-ХЛЛ		p
	с.7544_7545delCT, n (%)	норма, n (%)		с.7544_7545delCT, n (%)	норма, n (%)	
VH1 (20)	3 (3,9)	17 (22,1)	-	3 (6,0)	14 (28,0)	-
VH2 (3)	1 (1,3)	2 (2,6)	-	1 (2,0)	1 (2,0)	-
<b>VH3 (32)</b>	<b>1 (1,3)</b>	<b>31 (40,3)</b>	<b>0,03*</b>	1 (2,0)	17 (34,0)	>0,05*
VH4 (19)	4 (5,2)	15 (19,5)	-	4 (8,0)	6 (12,0)	-
VH5 (3)	1 (1,3)	2 (2,5)	-	1 (2,0)	2 (4,0)	-
<b>VH3 vs. VH1,2,4,5</b>	<b>9 (11,7)</b>	<b>36 (46,7)</b>	<b>0,04**</b>	9 (18,0)	23 (46,0)	0,07**

\* – post-hoc-анализ с поправкой Бенджамини-Хохберга

\*\* – с использованием точного критерия Фишера

В группе пациентов с нМ-ХЛЛ распределение частот мутации гена *NOTCH1* в зависимости от семейства *IGHV*-генов соответствовало таковому в общей группе больных (таблица 1), однако статистически значимых различий не выявлено. При изучении сочетанного носительства мутации с отдельными генами *IGHV* установлено, что делеция с.7544\_7545delCT чаще ассоциирована с генами *IGHV1-69* (3/10, 30%) и *IGHV4-39* (3/10, 30%). Также исследуемая делеция встречалась в образцах с экспрессией *IGHV3-11*, *IGHV4-59* и *IGHV5-10-1*: по 1 (10%) случаю соответственно.

Проведен мониторинг распределения мутации гена *NOTCH1* в группах больных в зависимости от наступления неблагоприятного события (рецидив, неэффективность терапии, трансформация в синдром Рихтера) за период наблюдения пациентов. Делеция с.7544\_7545delCT обнаружена у 2/20 (10%) больных с агрессивным течением и у 9/59 (15,3%) с индолентной формой ХЛЛ. Чаще абберация

гена *NOTCH1* сочеталась с мутированным статусом генов *IGHV4-39* (4/9 случаев – 44,4%) при благоприятном течении и с *IGVH3-11* и *IGVH1-69* (по 1 случаю, по 50% соответственно) при неблагоприятном исходе заболевания.

**Обсуждение.** В исследовании выявлено, что 63,3% пациентов имели нМ-ХЛЛ, который ассоциирован с неблагоприятным прогнозом. В этой группе у одной трети случаев заболевание рецидивировало или наблюдалась рефрактерность к терапии.

Около 20% больных нМ-ХЛЛ были носителями мутации с.7544\_7545delСТ гена *NOTCH1*, причем делетированный вариант не встречался у пациентов с М-ХЛЛ. Это может быть связано с приоритетно более высокой частотой драйверных мутаций при немутированном ХЛЛ. У большинства пациентов (80%) с делецией гена *NOTCH1* заболевание носило индолентный характер, в 2 случаях установлены рецидив и резистентность к терапии 1 линии.

Наличие мутации гена *NOTCH1* не имело гендерных и возрастных различий, а также не ассоциировано со стадией в дебюте заболевания. Полученные данные согласуются с результатами других исследователей [11, 9].

Делеция с.7544\_7545delСТ в 7,7 раз реже сочетается с *IGHV*-генами семейства VH3 по сравнению с объединенной группой семейств VH1, 2, 4, 5, а также по сравнению с каждым семейством по отдельности. Данное утверждение оказалось несправедливым для распределения при нМ-ХЛЛ, что может быть обусловлено небольшим объемом выборки пациентов. Делетированный вариант *NOTCH1* чаще встречается в комбинации с генами *IGHV1-69* и *IGHV4-39* (60% случаев).

**Заключение.** Мутации драйверных генов (в частности, гена *NOTCH1*) основных сигнальных путей при ХЛЛ обеспечивают выживание и эволюцию опухолевого клона, тем самым играя значимую роль в различии течения заболевания. Оценка их мутационного профиля у пациентов и раннее выявление нарушений уже в дебюте ХЛЛ является необходимым для определения дополнительных факторов стратификации больных на группы риска. Таким образом, комплексный подход с учетом результатов клинико-лабораторных, в том числе молекулярно-генетических, исследований может способствовать оптимизации терапевтических подходов к лечению пациентов с хроническим лимфолейкозом.

## Список литературы

1. Кучер Е.В. Роль цитогенетических и молекулярно-генетических исследований в диагностике и прогнозировании течения хронического лимфолейкоза / Е. В. Кучер, Г. И. Мороз, С. Н. Гайдукова. - DOI 10.34883/PI.2021.7.1.007. - Текст: электронный // Гематология. Трансфузиология. Восточная Европа. - 2021. - № 1(7). - С. 78-89. - URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/rol-tsitogeneticheskikh-metodov-issledovaniya-v-diagnostike-i-terapii-hronicheskogo-limfoleykoza> (дата обращения: 24.04.2023).
2. Репертуар генов тяжелой цепи иммуноглобулинов при В-клеточном хроническом лимфолейкозе в России и Беларуси / Б. В. Бидерман, Е. А. Никитин, Т. Ф. Сергиенко [и др.]. - doi.org/10.17650/1818-8346-2012-7-3-38-42. - Текст: электронный // Онкогематология. - 2012. - №7(3). - С. 38-42. - URL: <https://oncohematology.abvpress.ru/ongm/article/view/52> (дата обращения: 24.04.2023).
3. Стадник, Е.А., Румянцев, А.М. Роль мутационного статуса *VH*-генов в патогенезе и подходах к терапии хронического лимфолейкоза / Е. А. Стадник, А. М. Румянцев. - Москва: Экон-Информ, 2020. - 39 с. - ISBN 978-5-907233-71-3. - URL: <https://rusoncohem.ru/wp-content/uploads/2020/06/stadnikfin2020bloksoblozhkoj.pdf> (дата обращения: 24.04.2023). - Текст: электронный.
4. Хронический лимфоцитарный лейкоз / лимфома из малых лимфоцитов. Клинические рекомендации. Общероссийский национальный союз «Ассоциация онкологов России». - Текст: электронный // 2020. - 64 с. - URL: [https://old.oncology-association.ru/files/clinical-guidelines-2020/hronicheskij\\_limfocitarnyj\\_lejkoz.pdf](https://old.oncology-association.ru/files/clinical-guidelines-2020/hronicheskij_limfocitarnyj_lejkoz.pdf) (дата обращения: 23.01.2023).
5. A Novel Assay for the Identification of NOTCH1 PEST Domain Mutations in Chronic Lymphocytic Leukemia / P. V. Campregher, R. C. Petroni, N. H. Muto [et al.]. - doi: 10.1155/2016/4247908. - Текст: электронный // BioMed Research International. - 2016. - V.2016: Article ID 4247908. - 5 p. - URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28074183/> (дата обращения: 7.06.2023).
6. Chronic lymphocytic leukemia: from molecular pathogenesis to novel therapeutic strategies / J. Delgado, F. Nadeu, D. Colomer, E. Campo. - doi:10.3324/haematol.2019.236000. - Текст: электронный // Haematologica. - 2020. - V. 105(9). - P. 2205-2217. - URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33054046/> (дата обращения: 8.11.2022).
7. Detection of *NOTCH1* c.7541\_7542delCT mutation in chronic lymphocytic leukemia using conventional and real-time polymerase chain reaction / N.I. Bilous, I. V. Abramenko, A. A. Chumak [et al.]. - doi.org/10.31768/2312-8852.2016.38(2):112-116. - Текст : электронный // Experimental Oncology. - 2016. - V. 38(2). - P.112-116. - URL: <https://app.dimensions.ai/>



details/publication/pub.1079293877 (дата обращения: 7.06.2023).

8. Karan-Djurasevic, T. Somatic Hypermutational Status and Gene Repertoire of Immunoglobulin Rearrangements in Chronic Lymphocytic Leukemia / T. Karan-Djurasevic, S. Pavlovic. - DOI: 10.5772/intechopen.69110 - Текст : электронный // *Lymphocyte Updates - Cancer, Autoimmunity and Infection* / G. Isvoranu . - London: IntechOpen, 2017. - ISBN978-953-51-3344-5. - 192 p. - URL: <https://www.intechopen.com/chapters/55668> (дата обращения: 7.06.2023).

9. *NOTCH1* mutations identify a chronic lymphocytic leukemia patient subset with worse prognosis in the setting of a rituximab-based induction and consolidation treatment / M.D. Vo, M. Del Principe, F. Pozzo [et al]. - doi.org/10.1007/s00277-014-2117-x. - Текст: электронный // *Annals of Hematology*. - 2014. - V.93. - P. 1765–1774. - URL: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00277-014-2117-x#article-info> (дата обращения: 21.06.2023).

10. NOTCH1, SF3B1, MDM2 and MYD88 mutations in patients with chronic lymphocytic leukemia / Y. Maleki, Z. Alahbakhshi, Z. Heidari [et al]. - DOI: 10.3892/ol.2019.10048. - Текст: электронный // *Oncology letters*. - 2019. - V. 17. - P.4016-4023. - URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30930998/> (дата обращения: 04.05.2023).

11. Ultrasensitive Detection of *NOTCH1* c.7544\_7545delCT Mutations in Chronic Lymphocytic Leukemia by Droplet Digital PCR Reveals High Frequency of Subclonal Mutations and Predicts Clinical Outcome in Cases with Trisomy 12 / C. Hoofd, S. J. Huang, S. Gusscott [et al]. - doi.org/10.1016/j.jmoldx.2020.01.008. - Текст: электронный // *The Journal of Molecular Diagnostics*. - 2020. - V. 22 (4). - P.571-578. - URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32036086/> (дата обращения: 24.04.2023).

12. Wiestner, A. Validating genomic tools for precision medicine in CLL: ERIC leads the way / A. Wiestner. - doi:10.3324/haematol.2020.270652. - Текст: электронный // *Haematologica*. - 2021. - V. 106(3). - P. 656 - 658. - URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33645943/> (дата обращения: 12.12.2022).

УДК 616.419: 576.53:616-08-07

ГРНТИ 75.03.39

*С.С. Дружинина*

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
«Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания  
крови Федерального медико-биологического агентства», Киров  
младший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории  
прикладной иммуногенетики

*S.S. Druzhinina*

The Federal State-Financed Scientific Institution  
Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion  
under the Federal Medical Biological Agency, Kirov  
Research assistant of the research laboratory of applied immunogenetics  
e-mail: [druzhinina@niigpk.ru](mailto:druzhinina@niigpk.ru)

*М.А. Логинова*

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
«Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания  
крови Федерального медико-биологического агентства», Киров  
доктор биологических наук, заведующий научно-исследовательской  
лабораторией прикладной иммуногенетики

*M.A. Loginova*

The Federal State-Financed Scientific Institution  
Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion  
under the Federal Medical Biological Agency, Kirov  
Doctor of Sciences in Biology, Head of the research laboratory of applied  
immunogenetics  
e-mail: [loginova@niigpk.ru](mailto:loginova@niigpk.ru)

*Д.Н. Смирнова*

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
«Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания  
крови Федерального медико-биологического агентства», Киров  
кандидат биологических наук, научный сотрудник научно-исследовательской  
лаборатории прикладной иммуногенетики

*D.N. Smirnova,*

The Federal State-Financed Scientific Institution  
Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion  
under the Federal Medical Biological Agency, Kirov  
PhD, researcher of the research laboratory of applied immunogenetics  
e-mail: smirnovadn@niigpk.ru

*И.П. Обухов,*

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
«Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания  
крови Федерального медико-биологического агентства», Киров  
лаборант-исследователь научно-исследовательской лаборатории прикладной  
иммуногенетики

*I.P. Obukhov*

The Federal State-Financed Scientific Institution  
Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion  
under the Federal Medical Biological Agency, Kirov  
Research technician of the research laboratory of applied immunogenetics  
e-mail: obuhov@niigpk.ru

*К.О. Репницына*

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
«Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания  
крови Федерального медико-биологического агентства», Киров  
лаборант-исследователь научно-исследовательской лаборатории прикладной  
иммуногенетики

*К.О. Repnitsyna*

The Federal State-Financed Scientific Institution  
Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion  
under the Federal Medical Biological Agency, Kirov  
Research technician of the research laboratory of applied immunogenetics  
e-mail: repnitsina@niigpk.ru

*И.В. Парамонов*

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
«Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания

крови Федерального медико-биологического агентства», Киров  
доктор медицинских наук, директор института

*I.V. Paramonov*

The Federal State-Financed Scientific Institution  
Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion  
under the Federal Medical Biological Agency, Kirov  
Doctor of Sciences in Medicine, Head of the Institute  
e-mail: paramonov@niigpk.ru

## **Результаты подбора совместимых доноров для пациентов с редкими HLA-аллелями в генотипе**

### **The results of the selection of compatible donors for patients with rare HLA alleles in the genotype**

*Аннотация.* Проведен анализ HLA-профилей 258 онкогематологических пациентов ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России, имеющих показания к проведению алло-ТГСК. Оценены особенности подбора гистосовместимых доноров для реципиентов, имеющих в генотипе редкие HLA-аллели.

*Abstract.* The analysis of HLA-profiles of 258 oncohematological patients of the FSBSI KNIIGiPK FMBA of Russia with indications for allo-HSCT was carried out. The features of the selection of histocompatible donors for recipients with rare HLA alleles in the genotype were evaluated.

*Ключевые слова:* HLA-типирование; гистосовместимость, аллогенная трансплантация; донорство костного мозга; гемопоэтические стволовые клетки; CWD-каталог.

*Index terms:* HLA- typing; histocompatibility; allogeneic transplantation; bone marrow donation; hematopoietic stem cells; CWD-catalog.

**Введение.** Одним из важнейших критериев подбора донора при аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК), которая по-прежнему остается наиболее эффективным методом лечения онкогематологических заболеваний, является совместимость пары донор-реципиент по генам HLA (HLA, Human Leukocyte Antigens - система гистосовместимости человека). Идеальными донорами можно считать не имеющих противопоказаний к трансплантации HLA-идентичных сиблингов (siblings, sibs — брат или сестра), так как

они совпадают не только по HLA-аллелям, но и по другим генам внутри HLA-гаплотипов, что существенно снижает риск посттрансплантационных осложнений [1]. Согласно классическим законам наследования, вероятность совпадения сиблингов равна 25%, а на практике эта цифра оказывается значительно ниже, так как далеко не у каждого пациента есть родные братья и сестры. В связи с этим возникает необходимость поиска совместимых неродственных доноров, эффективность и продолжительность которого напрямую зависит от распространенности HLA-гаплотипов пациента [2, 3].

При многочисленном анализе частот встречаемости HLA-аллелей у различных популяций потенциальных доноров, проживающих на территории России, подтвержден высокий полиморфизм генов системы тканевой совместимости [4-10]. При этом часть HLA-аллелей являются весьма распространенными как среди российских, так и доноров костного мозга Всемирной поисковой системы (BMDW – Bone Marrow Donors Worldwide), насчитывающей более 40 млн потенциальных добровольцев [11]. И в случае, когда у пациента выявляется даже один HLA-гаплотип, включающий наиболее распространенные HLA-аллели, вероятность найти совместимого неродственного донора значительно выше, чем для больных, не имеющих такого гаплотипа [12].

Именно поэтому особый интерес представляет выявление редких HLA-аллелей у пациентов, нуждающихся в алло-ТГСК. Это позволит сделать выводы о репрезентативности регистра или необходимости его расширения за счет привлечения доноров из различных регионов России.

**Цель исследования** – оценить результаты подбора доноров для пациентов с редкими HLA-аллелями, нуждающихся в трансплантации гемопоэтических стволовых клеток.

### **Материалы и методы**

Объектом исследования являлись пациенты клиники ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России, имеющие показания к алло-ТГСК. Препараты ДНК для проведения гистотипирования получены из образцов цельной крови методом колоночной фильтрации с помощью наборов QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN GmbH, Германия). Концентрацию препаратов ДНК определяли спектрофотометрически на приборе TECAN Infinite 200 (TECAN, Швейцария).

HLA-типирование по локусам HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1, HLA-DQB1 в высоком разрешении проводили по технологии секвенирования (SBT) с использованием наборов реагентов PROTRANS S3/S4 (Protrans, Германия). Капиллярный электрофорез осуществляли с помощью генетического анализатора 3500xl (Applied Biosystems, США), полученные данные анализировали в программном обеспечении SEQUENCE PILOT (JSI medical systems, Германия). Для определения частот HLA-аллелей методом максимального правдоподобия с помощью EM-алгоритма для полилокусных данных использовали программное обеспечение Arlequin v.3.5 [13].

Для оценки распространенности HLA-аллелей использовали Европейский CWD-каталог (каталог распространенных и хорошо задокументированных аллелей), в котором аллели разделены на две категории: распространенные (common или C) аллели – наблюдаемые с частотой более 0,001 в референсных популяциях, состоящих не менее чем из 1500 человек, и хорошо задокументированные (well documented или WD) – аллели, выявленные не менее пяти раз у неродственных индивидуумов методом секвенирования [14]. Статус редких (rare или R) присвоен вариантам, не вошедшим в каталог.

**Результаты и обсуждение.** Частоты встречаемости и CWD-статус аллелей HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1 и HLA-DQB1 представлены в Таблицах 1-5. В ходе проведенного исследования выявлены: 30 аллелей по локусу HLA-A, 52 – по локусу HLA-B, 27 – по локусу HLA-C, 32 – по локусу HLA-DRB1, 15– по локусу HLA-DQB1.

Таблица 1 – Аллели локуса HLA-A, частоты их встречаемости и CWD-статус

Аллель	Частота встречаемости	CWD-статус	Аллель	Частота встречаемости	CWD-статус
A*02:01	0.263566	C	A*33:03	0.007752	C
A*03:01	0.155039	C	A*66:01	0.007752	C
A*24:02	0.108527	C	A*68:02	0.007752	C
A*01:01	0.089147	C	A*02:05	0.005814	C
A*11:01	0.052326	C	A*02:06	0.005814	WD
A*25:01	0.048450	C	A*01:02	0.003876	C
A*26:01	0.048450	C	A*02:66	0.003876	R
A*68:01	0.034884	C	A*02:17	0.001938	WD
A*31:01	0.032946	C	A*03:02	0.001938	C
A*32:01	0.029070	C	A*24:03	0.001938	C
A*23:01	0.027132	C	A*24:30	0.001938	R
A*30:01	0.017442	C	A*29:01	0.001938	C

A*68:24	0.015504	C	A*30:02	0.001938	C
A*33:01	0.011628	C	A*30:04	0.001938	C
A*29:02	0.007752	C	A*69:01	0.001938	C

Таблица 2 – Аллели локуса HLA-B, частоты их встречаемости и CWD-статус

Аллель	Частота встречаемости	CWD-статус	Аллель	Частота встречаемости	CWD-статус
B*07:02	0.131783	C	B*58:01	0.007752	C
B*18:01	0.089147	C	B*56:01	0.007752	C
B*13:02	0.081395	C	B*37:01	0.007752	C
B*35:01	0.063953	C	B*27:02	0.007752	C
B*27:05	0.052326	C	B*15:17	0.007752	C
B*44:02	0.044574	C	B*55:01	0.005814	C
B*08:01	0.044574	C	B*44:05	0.005814	C
B*15:01	0.042636	C	B*35:08	0.005814	C
B*39:01	0.031008	C	B*47:01	0.003876	C
B*40:01	0.029070	C	B*18:03	0.003876	C
B*51:01	0.025194	C	B*15:16	0.003876	WD
B*48:01	0.025194	WD	B*73:01	0.001938	C
B*40:02	0.025194	C	B*57:02	0.001938	C
B*38:01	0.025194	C	B*51:349	0.001938	R
B*35:03	0.025194	C	B*51:158	0.001938	R
B*57:01	0.023256	C	B*51:07	0.001938	C
B*49:01	0.023256	C	B*51:05	0.001938	C
B*52:01	0.017442	C	B*51:02	0.001938	C
B*44:03	0.017442	C	B*27:14	0.001938	R
B*14:02	0.015504	C	B*15:34	0.001938	R
B*41:02	0.013566	C	B*15:11	0.001938	WD
B*35:02	0.013566	C	B*15:09	0.001938	WD
B*50:01	0.011628	C	B*15:07	0.001938	WD
B*44:27	0.011628	R	B*15:03	0.001938	WD
B*41:01	0.009690	C	B*07:05	0.001938	C
B*40:06	0.009690	C	B*07:04	0.001938	C

Таблица 3 – Аллели локуса HLA-C, частоты их встречаемости и CWD-статус

Аллель	Частота встречаемости	CWD-статус	Аллель	Частота встречаемости	CWD-статус
C*07:02	0.160853	C	C*12:02	0.017442	C
C*06:02	0.125969	C	C*08:02	0.015504	C
C*04:01	0.122093	C	C*14:02	0.013566	C
C*07:01	0.118217	C	C*08:03	0.007752	R
C*12:03	0.089147	C	C*03:02	0.005814	C
C*02:02	0.063953	C	C*15:05	0.003876	C

C*03:04	0.044574	C	C*16:02	0.003876	C
C*03:03	0.038760	C	C*02:10	0.001938	C
C*01:02	0.034884	C	C*07:18	0.001938	C
C*05:01	0.031008	C	C*16:01	0.001938	C
C*08:01	0.025194	C	C*16:04	0.001938	C
C*07:04	0.023256	C	C*17:03	0.001938	C
C*15:02	0.021318	C	C*18:01	0.001938	WD
C*17:01	0.021318	C			

Таблица 4 – Аллели локуса HLA-DRB1, частоты их встречаемости и CWD-статус

Аллель	Частота встречаемости	CWD-статус	Аллель	Частота встречаемости	CWD-статус
DRB1*07:01	0.158915	C	DRB1*15:02	0.013566	C
DRB1*15:01	0.133721	C	DRB1*01:02	0.007752	C
DRB1*01:01	0.127907	C	DRB1*04:03	0.007752	C
DRB1*03:01	0.071705	C	DRB1*04:08	0.007752	C
DRB1*13:01	0.069767	C	DRB1*10:01	0.007752	C
DRB1*11:04	0.060078	C	DRB1*04:02	0.003876	C
DRB1*11:01	0.052326	C	DRB1*04:05	0.003876	C
DRB1*12:01	0.040698	C	DRB1*11:03	0.003876	C
DRB1*04:01	0.032946	C	DRB1*14:54	0.003876	C
DRB1*13:02	0.032946	C	DRB1*01:03	0.001938	C
DRB1*16:01	0.031008	C	DRB1*04:07	0.001938	C
DRB1*08:01	0.029070	C	DRB1*08:02	0.001938	C
DRB1*09:01	0.027132	C	DRB1*08:03	0.001938	C
DRB1*04:04	0.025194	C	DRB1*11:69	0.001938	R
DRB1*13:03	0.019380	C	DRB1*14:04	0.001938	C
DRB1*14:01	0.013566	C	DRB1*16:02	0.001938	C

Таблица 5 – Аллели локуса HLA-DQB1, частоты их встречаемости и CWD-статус

Аллель	Частота встречаемости	CWD-статус	Аллель	Частота встречаемости	CWD-статус
DQB1*03:01	0.199612	C	DQB1*05:02	0.038760	C
DQB1*05:01	0.149225	C	DQB1*04:02	0.029070	C
DQB1*06:02	0.133721	C	DQB1*06:04	0.021318	C
DQB1*02:02	0.116279	C	DQB1*05:03	0.019380	C
DQB1*02:01	0.075581	C	DQB1*06:01	0.013566	C
DQB1*03:03	0.067829	C	DQB1*06:09	0.007752	C
DQB1*06:03	0.063953	C	DQB1*03:04	0.003876	C
DQB1*03:02	0.060078	C			



В локусе HLA-A два аллеля имеют статус R: A\*02:66 – 0,39% (выявлен у двух пациентов) и A\*24:30 – 0,19% (выявлен у одного пациента). Среди аллелей HLA-B выявлено 5 аллелей со статусом R: B\*44:27, B\*51:349, B\*51:158, B\*27:14, B\*15:34. Интересно, что вариант HLA B\*44:27, имеющий частоту встречаемости 1,16%, выявлен в данном исследовании у 6 пациентов, и, в целом, этот вариант довольно распространен в российских популяциях. В локусе HLA-C определен лишь один вариант со статусом R – C\*08:03, выявленный у 4 пациентов. Аллели локуса HLA-DRB1 имеют статус распространенных за исключением одного варианта, имеющего статус R: DRB1\*11:69 (0,19%), выявленного у одного пациента. Все 15 аллелей локуса HLA-DQB1 относятся к распространенным. Таким образом, 23 пациента из изученной выборки имеют в генотипе редкие аллели.

Аллели, имеющие статус редких в Европейском CWD-каталоге, не являются распространенными и согласно базе данных Allele Frequency Net Database. Исключение составили варианты HLA-B\*44:27 и HLA-C\*08:03, которые довольно широко распространены в российских и зарубежных популяциях потенциальных доноров. Аллель HLA-B\*44:27 занимает второе место по частоте выявления в популяции Нижегородской области (1,36%), и значительно реже, но встречается в популяциях доноров Белгородской (0,60%) и Вологодской (0,13%) областей и среди башкир, проживающих на территории Башкортостана (0,40%). Так же этот вариант распространен у жителей Польши (0,80%) и Чехии (0,70%). HLA-C\*08:03 часто встречается в популяциях ненцев (6,70% - это 4 место по частоте выявления) и алеутов о. Беринга (4,30% - 9 место). Реже выявлен у башкир (3,75%), бурятов (1,70%) и татар (0,80%), проживающих в Татарстане, жителей Нижегородской области (0,40%) и Карелии (0,30%) [15].

По результатам проведенного анализа выявлены 23 пациента, в генотипе которых определены указанные выше аллели, из них шестеро имели HLA-идентичных сиблингов. А из 235 пациентов без редких HLA-вариантов 10/10 совместимые братья и сестры были у 31 человека. Но больший интерес для настоящего исследования представляли результаты поиска неродственных совместимых доноров, так как HLA-идентичный родственник донор может отсутствовать у больного, нуждающегося в алло-ТГСК, при любом числе сиблингов в семье [2].

Для всех пациентов осуществлен поиск неродственных доноров в Федеральном регистре доноров костного мозга и гемопоэтических стволовых клеток.

Полностью HLA-совместимого донора удалось подобрать для 169 пациентов без редких аллелей в генотипе и для 3 пациентов с HLA-аллелями, имеющими статус R, что составляет 71,91% и 13,04%, соответственно.

### **Заключение**

Данное исследование показало аллельное разнообразие пациентов, нуждающихся в аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток. Установлено, что наличие в генотипе пациентов редких HLA-аллелей существенно осложняет поиск совместимого неродственного донора. Это свидетельствует о необходимости расширения национального и этнического разнообразия федерального регистра, способствующего увеличению вероятности подбора HLA-идентичных неродственных доноров для российских пациентов с редкими аллелями.

### **Список литературы**

1. E.W. Petersdorf. Mapping MHC haplotype effects in unrelated donor hematopoietic cell transplantation / E.W. Petersdorf, M. Malkki, M.M. Horowitz [et al.] // *Blood*. –2013. – Vol. 121. – № 10. – P. 1896-1905.
2. Хамаганова Е. Г. Вероятность нахождения HLA-идентичного родственного донора для больных с заболеваниями системы крови из семей с разным числом детей / Хамаганова Е. Г., Кузьмина Е. П., Паровичникова Е. Н. [и др.] // *Гематология и трансфузиология*. – 2017. – Т. 62. – № 1. – С. 29-32.
3. Tiercy, J.-M. How to select the best available related or unrelated donor of hematopoietic stem cells / J.-M. Tiercy // *Haematologica*. – 2016. – Vol. 101. – No 4. – P. 680-687.
4. Кутявина С.С. Иммуногенетическая характеристика потенциальных неродственных доноров ГСК, проживающих на территориях Свердловской, Саратовской, Ярославской и Владимирской областей / Кутявина С.С., Логинова М.А., Смирнова Д.Н., Махова О.А.,
5. Парамонов И.В. // *Сибирский научный медицинский журнал*. 2020; 40 (5): 53–65. doi: 10.15372/SSMJ20200506
6. Кутявина С.С. Генетические особенности HLA-аллелей у бурят, проживающих на территории Иркутской области / Кутявина С.С., Логинова М.А., Черанев В.В., Парамонов И.В., Зарубин М.В., Верёвкина Л.Н.// *Гематология и трансфузиология*. -2017 -; 62(3): 147-152. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0234-5730-2017-62-3-147-152>
7. Логинова М.А. Особенности распределения HLA-аллелей и гаплотипов у калмыков / Логинова М.А., Кутявина С.С., Смирнова Д.Н., Черанев В.В., Парамонов И.В. // *Клиническая лабораторная диагностика*. 2019; 64 (4): 243-249 DOI:<http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-4-243-249>

8. Логинова М.А. Иммуногенетическая характеристика потенциальных доноров гемопоэтических стволовых клеток, рекрутированных на территории Северного Кавказа / Логинова М.А., Смирнова Д.Н., Кутявина С.С., Махова О.А., Кашин К.П., Парамонов И.В. // Сибирский научный медицинский журнал. 2021; 41 (1): 69–80. doi: 10.18699/SSMJ20210107.
9. Хамаганова Е. Г. HLA генетическое разнообразие русской популяции, выявленное методом секвенирования следующего поколения / Хамаганова Е. Г., Леонов Е. А., Абдрахимова А. Р. [и др.] // – 2021. – Т. 23, № 3. – С. 509-522. – DOI 10.15789/1563-0625-HDI-2182. – EDN TRNANW.
10. Хамаганова Е. Г. HLA-гаплотипы у доноров гемопоэтических стволовых клеток регистра ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России / Хамаганова Е. Г., Леонов Е. А., Абдрахимова А. Р. [и др.] // Гематология и трансфузиология. – 2022. – Т. 67, № S2. – С. 143-144. – EDN TSZIBW.
11. Ананьева А.В. Анализ распределения частот HLA-аллелей и гаплотипов у потенциальных доноров Национального регистра доноров костного мозга имени Васи Перевощикова / Ананьева А. В., Лексина Я. А., Андрюшкина А. В., Шагимарданова Е. И. // Вестник гематологии. – 2021. – Т. 17, № 3. – С. 41. – EDN VHEBZQ.
12. URL: <https://wmda.info/WMDA> [Электронный ресурс] (дата обращения 28.05.2023).
13. Pedron B. Contribution of HLA-A/B/C/DRB1/DQB1 Common Haplotypes to Donor Search Outcome in Unrelated Hematopoietic Stem Cell Transplantation / Pedron B., Guerin-EI Khourouj V., Dalle J.H. et al.// Biol Blood Marrow Transplant 2011; 17: 1612—1618.
14. Excoffier L. Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. Evolutionary Bioinformatics Online / Excoffier L., Laval G., Schneider S. – 2007. – 23(1). – P. 47-50. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2658868/> (accessed 06 Apr 2017)/
15. Sanchez-Mazas A. Common and Well-documented HLA alleles over all of Europe and within European sud-regions: a catalogue from European Federation of Immunogenetics / A. Sanchez-Mazas, J.M. Nunes, D. Middleton [at all] – Text: electronic // HLA. –2017. –Vol. 89. – №2. – P. 104-113.
16. URL: <http://www.allelefreqencies.net/> The Allele Frequency Net Databas [Электронный ресурс] (дата обращения: 20.06.2023).

УДК 616.155.294:612.017.1

ГРНТИ 76.29.33

*A. N. Zagarskikh*

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
«Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания  
крови Федерального медико-биологического агентства», Киров  
кандидат биологических наук, младший научный сотрудник лаборатории  
клеточной и молекулярной иммунологии

*A. N. Zagarskikh*

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of  
Hematology and Blood Transfusion under  
the Federal Medical Biological Agency, Kirov  
PhD, junior researcher of Cellular and Molecular Immunology Laboratory  
E-mail: zagarskikh@niigpk.ru

*Н. В. Исаева*

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
«Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания  
крови Федерального медико-биологического агентства», Киров  
кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории  
клеточной и молекулярной иммунологии

*N. V. Isaeva*

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of  
Hematology and Blood Transfusion under  
the Federal Medical Biological Agency, Kirov  
PhD, senior researcher of Cellular and Molecular Immunology Laboratory  
E-mail: isaeva@niigpk.ru

*E.С. Осипова*

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
«Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания  
крови Федерального медико-биологического агентства», Киров  
врач-гематолог клинико-диагностического отделения гематологии и  
химиотерапии

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agency, Kirov Hematologist of Clinical Diagnostic Department of Hematology and Chemotherapy  
E-mail: elena.osipova93@bk.ru

## **Аутоиммунные антитромбоцитарные антитела при иммунной тромбоцитопенической пурпуре**

### **Autoimmune antiplatelet antibodies in immune thrombocytopenic purpura**

**Аннотация.** Цель - установить частоту встречаемости и значимость аутоенсибилизации к антигенам тромбоцитов у пациентов с иммунной тромбоцитопенической пурпурой (ИТП). Исследование выполняли методом проточной цитометрии. Антитела к тромбоцитам обнаружены у 72,2% больных ИТП. Содержание тромбоцитов у пациентов с аутоенсибилизацией значительно ниже, чем у здоровых лиц. Количество тромбоцитов обратно коррелировало с уровнем аутоантител (коэффициент корреляции -0,5607).

**Abstract.** The aim - to establish the frequency and significance of autosensitization to platelet antigens in patients with immune thrombocytopenic purpura (ITP). The study was performed by flow cytometry. Antibodies to platelets were found in 72.2% of patients with ITP. The platelet count in patients with autosensitization is significantly lower than in healthy individuals. The number of platelets was inversely correlated with the level of autoantibodies (correlation coefficient -0.5607).

**Ключевые слова:** иммунная тромбоцитопеническая пурпура; проточная цитометрия; аутоиммунные антитромбоцитарные антитела.

**Index terms:** immune thrombocytopenic purpura; flow cytometry; autoimmune antiplatelet antibodies.

**Введение.** Иммунная тромбоцитопеническая пурпура (иммунная тромбоцитопения, ИТП) включает в себя гаптеновые и аллоиммунные формы тромбоцитопений [7,3]. ИТП - приобретенное аутоиммунное заболевание, характеризующееся низким количеством тромбоцитов в крови (менее  $100 \times 10^9/\text{л}$ ) в результате их разрушения и нарушения продукции с геморрагическим синдромом различной степени выраженности или без него [2,5,6,9]. Для пациентов с низким уровнем тромбоцитов ( $<20 \times 10^9/\text{л}$ ) характерны: спонтанные кровоподтеки, повышенный риск кровотечений из слизистых оболочек и при травмах [10].

ИТП является наиболее часто встречающейся нозологической формой тромбоцитопений иммунного генеза и регистрируется приблизительно в 2–4 случаях на 100 000 населения в год. Во взрослом возрасте у женщин это заболевание фиксируется в 2 раза чаще, чем у мужчин, а у детей его частота у мальчиков и девочек одинакова [8,10,11].

Для диагностики ИТП не существует стандартных исследований или биомаркеров. По данным метаанализа J.R. Urbensky и соавт., основанного на оценке 18 работ (1170 пациентов с ИТП), чувствительность теста на присутствие аутоантител к тромбоцитам низкая (53%), а специфичность, напротив, высокая (>90%). Таким образом, положительный результат на их наличие может быть полезен для подтверждения ИТП, но отрицательный результат не исключает ее присутствие [12]. Для оценки содержания антител на поверхности тромбоцитов пациента чаще всего проводят измерение общего уровня тромбоцитассоциированных иммуноглобулинов (IgG). Для этого применяют флуоресцентно меченые маркеры, связывание которых с тромбоцитами регистрируют с помощью проточного цитофлуориметра. Метод обладает высокой чувствительностью и специфичностью [1]. Этот показатель часто используется в клинической практике, так как, во-первых, отсутствие аутоантител исключает вклад иммунной системы в развитие тромбоцитопении, а, во-вторых, повышение их уровня коррелирует со степенью снижения числа тромбоцитов (большее количество иммуноглобулинов, фиксированных на поверхности тромбоцитов, ассоциировано с их более быстрым выведением из кровотока) [3]. Тест успешно используется для выявления аутосенсibilизации при многократных трансфузиях концентрата тромбоцитов больным [4]. Актуальной проблемой является оценка антитромбоцитарных антител и их значимости у пациентов с ИТП.

**Цель.** Установить частоту встречаемости и значимость аутосенсibilизации к антигенам тромбоцитов у пациентов с иммунной тромбоцитопенической пурпурой.

### **Материалы и методы**

Антитромбоцитарные антитела определяли у 36 пациентов с впервые выявленной иммунной (идиопатической) тромбоцитопенической пурпурой, обратившихся в ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России в период с 2015 по 2023 гг. Среди

обследованных 8 (22,2%) мужчин и 28 (77,8 %) женщин с медианой возраста 40 (Q1-Q3, 33-63) лет. У пациентов исключены: наследственная тромбоцитопения, аутоиммунные, инфекционные и опухолевые сопутствующие заболевания, недавняя вакцинация, беременность. Наличие антител оценивали у 21 донора (крови и/или ее компонентов, гемопоэтических стволовых клеток), обследованных и допущенных к донации.

Для окрашивания клеток применяли моноклональные антитела, меченные флуорохромом FITC: CD41 и Mouse Anti-Human IgG (BD Pharmingen, США). При проведении процедуры использовали растворы Хенкса и фиколл-урографина, CellWash (BD, США), CellWash, содержащий бычий сывороточный альбумин (БСА) с концентрацией 1%. Уровень антитромбоцитарных антител оценивали с помощью проточного цитофлюориметра FACS Canto II (BD, США). Исследование включало в себя: выделение тромбоцитов из периферической крови больных и доноров, их инкубацию с аутологичной сывороткой, окрашивание моноклональными антителами, лазерную проточную цитометрию, анализ и интерпретацию полученных данных [4].

При статистическом анализе рассчитывали U-критерий Манна-Уитни и коэффициент корреляции Пирсона, различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ . Данные представляли в виде медианы (Me) и межквартильного диапазона (Q1-Q3).

### **Результаты исследования и их обсуждение**

У всех доноров содержание тромбоцитов, связавшихся с IgG, после инкубации с аутосывороткой не превышало 3% (медиана - 0,6 % (Q1-Q3, 0-1,5)). Данный показатель принимали за значение нормы. При обследовании пациентов с ИТП обнаружено, что уровень антитромбоцитарных антител у них варьировал в пределах от 0 до 27,6%, медиана – 4,35% (2,3-12,6). Выявлены статистически значимые отличия в содержании аутоантител к тромбоцитам у больных ИТП при сравнении с группой доноров: 4,35 (2,3-12,6)% против 0,6 (0-1,5)% соответственно,  $p < 0,00001$ .

У 72,2% пациентов установлена аутосенсibilизация к антигенам тромбоцитов (рисунок). Можно предположить, что отсутствие сывороточных антител при ИТП объясняется либо их фиксацией на тромбоцитах, либо низким титром, который невозможно выявить, либо меньшей восприимчивостью к действию ан-

тител тестируемых тромбоцитов. У больных ИТП с аутосенсibiliзацией количество тромбоцитов достоверно ниже, чем у здоровых лиц:  $16,0 \times 10^9/\text{л}$  (9,8-53,0) к  $212,3 \times 10^9/\text{л}$  (199,5-231,5) соответственно,  $p < 0,00001$ . Не зафиксировано статистически значимых различий в содержании тромбоцитов между пациентами с аутосенсibiliзацией и без нее:  $16,0 \times 10^9/\text{л}$  (9,8-53,0) и  $30,5 \times 10^9/\text{л}$  (11,0-49,5) соответственно,  $p = 0,56192$ . Различий в уровне аутоантител у лиц мужского и женского пола не обнаружено: 4,0 (3,4-8,1)% к 5,6 (4,0-10,0)% соответственно,  $p = 0,19706$ .

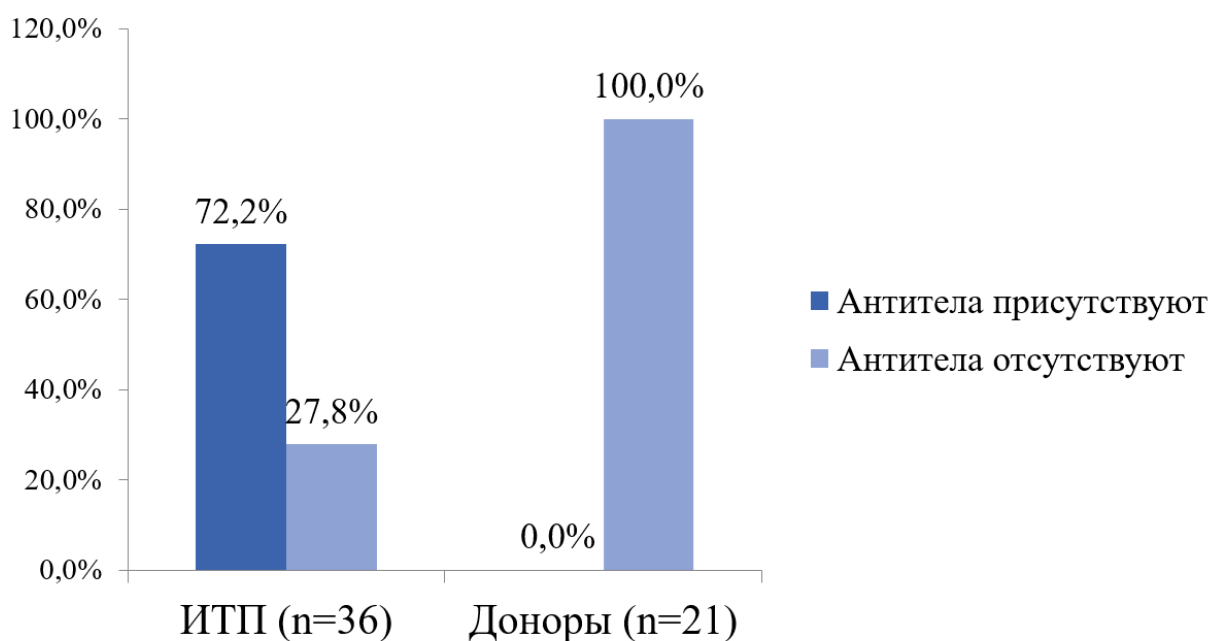


Рисунок – Результаты обследования на наличие аутосенсibiliзации к антигенам тромбоцитов

Установлена обратная корреляционная связь между содержанием тромбоцитов и уровнем антитромбоцитарных антител ( $r = -0,5607$ ,  $p = 0,000041$ ). Полученные результаты согласуются с ранее опубликованными данными А.В Мазурова и соавт. [2].

**Заключение.** Антитела к тромбоцитам обнаружены у 72, 2% больных ИТП. У пациентов с аутосенсibiliзацией содержание тромбоцитов значительно ниже, чем у здоровых лиц. У больных с наличием сенсibiliзации и без нее таких различий не установлено. Количество тромбоцитов обратно коррелировало с уровнем аутоантител (коэффициент корреляции  $-0,5607$ ). Таким образом, выявление



антитромбоцитарных антител является важным диагностическим критерием для подтверждения иммунной природы заболевания и принятия решения о дальнейшей тактике лечения.

### Список литературы

1. Антигены и антитела к тромбоцитам (обзор литературы) / Н.В. Минеева, И.И. Кробинец, М.Н. Блинов и соавт. // Онкогематология. – 2013. – №3. – С. 57-65.
2. Клинические рекомендации по диагностике и лечению идиопатической тромбоцитопенической пурпуры (первичной иммунной тромбоцитопении) у взрослых / А.А. Меликян, Е.Н. Путова, Н.В. Цветаева. – 2014. – 42 с.
3. Мазуров А.В., Хаспекова С.Г., Васильев С.А. Диагностика тромбоцитопений // Терапевтический архив. – 2018. – Т. 90, №7. – С. 4-13. <https://doi.org/10.26442/terarkh20189074-13>.
4. Способ определения аутоантител к тромбоцитам: патент №2488114 Российская Федерация, С1 / Е.В. Бутина, Г.А. Зайцева, Н.В. Исаева, Е.А. Васкина, И.А. Докшина; заявитель и патентообладатель Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства» (RU). №2488114; заявл. 10.01.2012, опубл. 20.07.2013, бюл. № 20
5. American Society of Hematology 2019 guidelines for immune thrombocytopenia / C. Neunert, Terrell D.R., Arnold D.M. [et al] // Blood Adv. – 2019. – Vol. 3. – P. 3829–3866. doi: 10.1182/bloodadvances.2019000966.
6. Immune Thrombocytopenic Purpura / N. M. Pietras, A. L. Pearson-Shaver // European Journal of Hematology. – 2023. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32965953/>.
7. International consensus report on the investigation and management of primary immune thrombocytopenia / D. Provan, R. Stasi, A. C. Newland [et al] // Blood. – 2010. – Vol. 115. – P. 168- 186. doi: 10.1182/blood-2009-06-225565.
8. Kistanguri G., McCrae Keith R. Immune Thrombocytopenia // Hematol Oncol Clin North Am. – 2013. – Vol. 27(3). – P. 495–520. doi: 10.1016/j.hoc.2013.03.001.
9. Management of immune thrombocytopenia: 2022 update of Korean experts recommendations / Y.H. Park, Kim D-Y, S. Kim [et al] // Blood Res. – 2022. – 57(1). – P. 20–28. doi:10.5045/br.2022.2022043.

10. Michel M. Immune thrombocytopenic purpura: epidemiology and implications for patients // European Journal of Hematology. – 2009. – Vol. 82. – P. 3-7. doi: 10.1111/j.1600-0609.2008.01206.x.
11. The incidence of immune thrombocytopenic purpura in children and adults: A critical review of published reports / D.R. Terrell, L.A. Beebe, S.K. Vesely [et al] // Am J Hematol.– 2010. – Vol. 85. –P. 174–180. doi: 10.1002/ajh.21616.
12. The sensitivity and specificity of platelet autoantibody testing in immune thrombocytopenia: a systematic review and meta-analysis of a diagnostic test / J.R. Vrbensky, J.E. Moore, D.M. Arnold [et al] // Thromb Haemost. – 2019. – 17(5). – P. 787-794. doi: 10.1111/jth.14419.

УДК 615.072

ГРНТИ 76.03.55

*Е.А. Коновалова*

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», Киров  
лаборант-исследователь лаборатории препаратов крови

*E. A. Konovalova*

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agency,  
Kirov

Laboratory Assistant-researcher of the Blood Products Laboratory

E-mail: konovalovaea@niigpk.ru

*Е.Н. Калинина*

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», Киров  
младший научный сотрудник лаборатории препаратов крови

*E.N. Kalinina*

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agency,  
Kirov

Junior Researcher of the Blood Products Laboratory

E-mail: kalinaen@niigpk.ru

*E.С. Кормщикова*

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови

Федерального медико-биологического агентства», Киров

кандидат биологических наук, заведующий лабораторией препаратов крови

*E. S. Kormshchikova*

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agency,

Kirov

Candidate of Biological Sciences, Head of the Blood Products Laboratory

E-mail: kormschikova@niigpk.ru

*А.В. Йовдий*

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови

Федерального медико-биологического агентства», Киров

кандидат медицинских наук, заведующий лабораторией иммуногематологии

*A. V. Yovdiy*

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agency,

Kirov

Candidate of medical sciences, Head of Laboratory of Immunohematology

E-mail: yovdiy@niigpk.ru

## Оптимизация методики определения содержания антирезус $Rh_0(D)$ антител методом непрямой агглютинации в геле

### Optimization of the methodology for determining the content of anti-D antibodies by indirect gel agglutination

**Аннотация.** Проведен сравнительный анализ результатов количественного определения антирезус  $Rh_0(D)$  антител методом непрямой агглютинации в геле с использованием различных реагентов папаинизированных эритроцитов. Показана возможность замены редкого фенотипа эритроцитов 0R2R2 (ccDEE) на более распространенный 0R1R1 (CCDee). Это позволит проводить ферментативную обработку донорского биоматериала в лабораторных условиях и решит проблему ограниченной доступности коммерческих реагентов, связанную с длительностью их поставок и высокой стоимостью.

**Abstract.** A comparative analysis of the results of the quantitative determination of anti-D antibodies by indirect gel agglutination using various reagents of papainized erythrocytes was carried out. The possibility of replacing the rare erythrocyte phenotype 0R2R2 (ccDEE) with the more common 0R1R1 (CCDee) has been shown. This is make it possible to carry out enzymatic processing of donor biomaterial in the laboratory and solve the problem of limited availability of commercial reagents, associated with the duration of their supply and high cost.

**Ключевые слова:** антирезус  $Rh_0(D)$  антитела; количественное определение; непрямая агглютинация; гелевые карты; папаинизированные эритроциты.

**Index terms:** anti-D antibodies; quantitative determination; indirect agglutination; gel cards; papainized erythrocytes.

**Введение.** Для профилактики резус-иммунизации беременных женщин с отрицательным резус-фактором, гемолитической болезни новорожденных и перинатальной смертности препаратом выбора считается иммуноглобулин человека антирезус  $Rh_0(D)$  [1, 2]. Такая профилактика эффективна более чем в 99 % случаев при достаточности дозы и своевременности введения лекарственного средства [3, 4]. Объем дозы рассчитывается в зависимости от специфической активности препарата, которая является основным показателем его качества и характеризуется содержанием антирезус  $Rh_0(D)$  антител. Обязательная оценка этой характеристики при выпускающем контроле и государственной экспертизе регламентирована как в Российской Федерации, так и за рубежом [5 – 7].

Одна из рекомендованных методик контроля специфической (антирезусной)

активности – непрямая агглютинация в геле [6 – 9]. В настоящее время она наиболее широко применяется на фармацевтических предприятиях и в учреждениях службы крови. Однако для выполнения анализа необходимы папаинизированные эритроциты фенотипа 0R2R2 (ccDEE). На сегодняшний день на отечественном рынке представлен импортный набор готовых папаинизированных эритроцитов ID-DiaCell IP-IIP-IIIP papainized (BioRad DiaMed GmbH, Швейцария). В Российской Федерации его доступность ограничена сложностями логистики, связанными с необходимостью транспортировки с соблюдением температурного режима и пересечения государственных границ, что влечет за собой увеличение времени поставки и стоимости реагента. Включение в преаналитический этап исследования процедуры ферментативной обработки донорского биоматериала затруднено тем, что фенотип эритроцитов 0R2R2 (ccDEE) крайне редко встречается в популяции доноров. Его замена на более распространенный фенотип позволит решить проблему зависимости от импорта дорогостоящего реагента зарубежного производства. В связи с этим актуальной задачей является оценка возможности применения при выполнении анализа папаинизированных эритроцитов фенотипа 0R1R1 (CCDee).

**Цель.** Оптимизировать методику определения содержания антирезус Rh<sub>0</sub>(D) антител методом непрямо́й агглютинации в геле.

### **Материалы и методы**

Исследовали экспериментальную партию лиофилизированного концентрата анти-D антител, изготовленную в ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России, и международный стандартный образец (МСО) анти-D иммуноглобулина WHO International Standard Anti-D immunoglobulin (code 16/332, version 3, NIBSC, Великобритания) с содержанием антирезус Rh<sub>0</sub>(D) антител 297 МЕ/мл.

Специфическую (антирезусную) активность устанавливали в реакции непрямо́й агглютинации со стандартными папаинизированными эритроцитами человека в гелевых картах ID Coombs Anti-IgG (DiaMed GmbH, Швейцария), используя центрифугу ID-Centrifuge L (Bio-Rad Laboratories, Франция) и термостат-инкубатор Memmert IN75 (Mettler, Германия) [8]. Испытуемый и стандартный образцы тестировали с использованием готовых папаинизированных эритроцитов фенотипов 0R2R2 (ccDEE) и 0R1R1 (CCDee) из набора реагентов ID-DiaCell IP-IIP-IIIP papainized (BioRad DiaMed GmbH, Швейцария). Для срав-

нения папаинизировали эритроциты фенотипов 0R2R2 (ccDEE) и 0R1R1 (CCDee) из набора реагентов ID-DiaCell IP-IIP-IIIP (BioRad DiaMed GmbH, Швейцария), а также донорские эритроциты фенотипа 0R1R1 (CCDee) – пул, полученный от трех доноров и хранившийся не более 3 суток. Для приготовления 0,1 % раствора папаина лиофилизат растворяли в воде в соотношении 1:1, инкубировали при температуре  $(37 \pm 0,5)$  °C в течение 10 – 15 минут. Эритроциты отмывали не менее 3 раз в 10-кратном объеме фосфатного буферного раствора до получения прозрачной надосадочной жидкости. Смешивали в равных объемах отмывые эритроциты и 0,1 % раствор папаина, инкубировали в течение 15 минут при температуре  $(37,0 \pm 0,5)$  °C, центрифугировали при скорости 1500 – 2000 об/мин в течение 10 минут, удаляли надосадочную жидкость, осадок ресуспендировали в десятикратном объеме фосфатного буферного раствора и центрифугировали при тех же условиях. Для приготовления 0,8% суспензии папаинизированных эритроцитов 1 объем осадка эритроцитов ресуспендировали в 124 объемах фосфатного буферного раствора, содержащего 2 г/л бычьего сывороточного альбумина.

Количественную оценку проводили по отношению к МСО. Для этого готовили серию 1,5-кратных разведений испытуемого и стандартного образцов. За титр антитрезус  $Rh_0(D)$  антител принимали максимальное разведение, при котором наблюдается агглютинация любой интенсивности. Содержание антител, выраженное в международных единицах (МЕ), вычисляли, исходя из полученных значений титра для испытуемого и стандартного образцов. Для проверки правильности результатов анализировали независимый ряд разведений МСО.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы MS Excel (Microsoft Corporation, США). Для полученных значений рассчитывали медиану. Воспроизводимость результатов и различия между выборками характеризовали размахом варьирования, правильность – смещением относительно аттестованного (номинального) значения.

### **Результаты и их обсуждение**

Результаты оценки специфической активности экспериментальной партии лиофилизированного концентрата антитрезус  $Rh_0(D)$  антител и МСО с использованием различных реагентов папаинизированных эритроцитов приведены в Таблице 1.

Таблица 1 – Результаты оценки специфической (антирезусной) активности с использованием различных реагентов папаинизированных эритроцитов

Испытуемый образец	Содержание антирезус Rh <sub>0</sub> (D) антител (МЕ/мл), определенное с использованием папаинизированных эритроцитов:			
	вариант 1	вариант 2	вариант 3	вариант 4
Экспериментальная партия лиофилизированного концентрата анти-D антител	30 – 45 (Me = 30; n = 6)	30 – 45 (Me = 30; n = 8)	30 – 45 (Me = 30; n = 5)	30 – 45 (Me = 30; n = 9)
Международный стандартный образец анти-D иммуноглобулина	297 – 446 (Me = 297; n = 6)	297 – 446 (Me = 297; n = 4)	297 – 446 (Me = 297; n = 3)	297 – 446 (Me = 297; n = 7)
Примечания: вариант 1 – папаинизированные эритроциты фенотипа 0R2R2 (ccDEE), вариант 2 – папаинизированные эритроциты фенотипа 0R1R1 (CCDee), вариант 3 – стандартные папаинизированные эритроциты из набора реагентов ID-DiaCell IP-IP-IP papainized (BioRad DiaMed GmbH, Швейцария), вариант 4 – папаинизированные эритроциты, полученные в лабораторных условиях в ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России, Me – медиана.				

Во всех сериях определений размах варьирования результатов не превышал 1,5-кратный шаг титрования, что свидетельствует об удовлетворительной сходимости экспериментальных данных. Их правильность подтверждена при тестировании МСО, в рамках которого максимальное смещение результата относительно аттестованного значения составило один шаг титрования. В ходе статистической обработки данных, полученных при использовании папаинизированных эритроцитов двух разных фенотипов, рассчитанные значения медианы специфической (антирезусной) активности совпали. То же самое показано при сравнении результатов тестирования с готовым реагентом стандартных папаинизированных эритроцитов и при проведении ферментативной обработки биоматериала непосредственно перед анализом в лабораторных условиях.

### Заключение

Доказана возможность применения папаинизированных донорских эритроцитов фенотипа 0R1R1 (CCDee) для определения содержания антирезус Rh<sub>0</sub>(D) антител методом непрямой агглютинации в геле.

### Список литературы

1. Диагностика, лечение, профилактика гемолитической болезни плода при резус-сенсibilизации / Савельева Г.М., Курцер М.А., Панина О.Б. [и др.] // Российский вестник перинатологии и педиатрии. – 2006. – N 6 (51). – С.73-78.
2. Hannafin B., Lovecchio F., Blackburn P. Do Rh-negative women with first trimester spontaneous abortions need Rh immune globulin? // Am J Emerg Med. – 2006. – N 4 (24). – P. 487-490.
3. Scott M.L. The complexities of the Rh system // Vox Sang. – 2004. – Vol. 87. – P. 58-62.
4. The kinetics of routine antenatal prophylactic intramuscular injections of polyclonal anti-D immunoglobulin / MacKenzie I.Z., Roseman F., Findlay J. [et al.] // BJOG. – 2006. – N 1 (113). – P. 97-101.
5. ОФС.1.8.1.0003.15 «Иммуноглобулины человека» // Государственная Фармакопея Российской Федерации. – XIV изд. Т. 2. – М., 2018. С. 3084 – 3089.
6. Human Anti-D Immunoglobulin // European Pharmacopoeia. – 10 ed. Supp. 10.7. – Strasbourg, 2022. 6661.
7. Human Anti-D Immunoglobulin for intravenous administration // European Pharmacopoeia. – 10 ed. Supp. 10.7. – Strasbourg, 2022. 6661.
8. ОФС.1.8.2.0004.15 «Испытание на анти-D антитела в лекарственных препаратах иммуноглобулинов человека» // Государственная Фармакопея Российской Федерации. – XIV изд. Т. 2. – М., 2018. С. 3158 – 3162.
9. Assay of Human Anti-D Immunoglobulin // European Pharmacopoeia. – 11 ed. Supp. 11.0. – Strasbourg, 2022. 2.7.13.



УДК 615.072

ГРНТИ 76.03.55

*Е.А. Коновалова*

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», Киров  
лаборант-исследователь лаборатории препаратов крови

*Е.А. Konovalova*

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agency,  
Kirov

Laboratory assistant-researcher of the Blood Products Laboratory

E-mail: [konovalovaea@niigpk.ru](mailto:konovalovaea@niigpk.ru)

*Н.С. Вильданова*

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», Киров  
младший научный сотрудник лаборатории препаратов крови

*N.S. Vildanova*

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agency,  
Kirov

Junior researcher of the Blood Products Laboratory

E-mail: [vildanova@niigpk.ru](mailto:vildanova@niigpk.ru)

*Т.Н. Рыболовлева*

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», Киров  
младший научный сотрудник лаборатории клеточной и молекулярной иммунологии

*T.N. Rybolovleva*

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of

Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agency,  
Kirov

Junior researcher of the Laboratory of Cellular and Molecular Immunology

E-mail: rybolovleva@niigpk.ru

*E.S. Кормщицова*

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский  
научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови

Федерального медико-биологического агентства», Киров

кандидат биологических наук, заведующий лабораторией препаратов крови

*E.S. Kormshchikova*

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of  
Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agency,

Kirov

Candidate of Sciences in Biology, Head of the Blood Products Laboratory

E-mail: kormschikova@niigpk.ru

## **Определение содержания анти-D антител**

### **методом неконкурентного иммуноферментного анализа**

### **Quantitative determination of anti-D antibodies by non-competitive enzyme immunoassay**

*Аннотация.* Показана возможность применения метода неконкурентного иммуноферментного анализа для определения содержания анти-D антител с использованием конъюгата антивидовых антител к IgG человека с пероксидазой хрена. Подобрана концентрация эритроцитов – 0,001 %, при которой наблюдается дозозависимый эффект между содержанием анти-D антител и оптической плотностью, а также приемлемый уровень фонового сигнала (0,098 ед.). С использованием международного стандартного образца определена аналитическая область методики – от 1,55 до 99,00 МЕ/мл.

*Abstract.* The possibility of using the method of non-competitive enzyme immunoassay for quantitative determining anti-D antibodies using horseradish peroxidase conjugated IgG was shown. The concentration of erythrocytes was selected - 0.001%, a dose-dependent effect is observed between the content of anti-D antibodies and optical density and an acceptable background signal level (0.098 units). Using the international standard sample, the analytical range of the method was determined

from 1.55 to 99.00 IU/ml.

**Ключевые слова:** анти-D антитела; конкурентный иммуноферментный анализ; неконкурентный иммуноферментный анализ; биотинилированные моноклональные анти-D антитела; антивидовые антитела к IgG человека с пероксидазой хрена.

**Index terms:** anti-D antibodies; competitive enzyme-linked assay; non-competitive enzyme immunoassay; biotinylated monoclonal anti-D antibodies; horseradish peroxidase conjugated IgG.

**Введение.** Одним из методов оценки специфической активности антирезусного иммуноглобулина человека является конкурентный иммуноферментный анализ (ИФА), который впервые предложен для определения анти-D антител S.J. Thorpe и соавт. в 2000 г. [2]. Способ основан на конкурентном связывании биотинилированных моноклональных анти-D антител (BRAD-5) и антител исследуемого образца с D-антигеном резус-положительных эритроцитов, иммобилизованных на твердой фазе [2, 4]. Образовавшиеся иммунные комплексы инкубируют с авидин-стрептавидином, конъюгированным щелочной фосфатазой, который специфически связывается через биотин с BRAD-5. Количество связавшегося конъюгата выявляют добавлением субстрата ферментативной реакции – паранитрофенилфосфатом. При этом интенсивность окрашивания обратно пропорциональна содержанию анти-D антител в образцах [1].

В реакции применяются два достаточно узкоспециализированных реагента: авидин-стрептавидин, конъюгированный щелочной фосфатазой, и BRAD-5, который используют исключительно в этой методике. Для решения проблемы их весьма ограниченной доступности необходимо оценить возможность применения способа, основанного на прямом определении концентрации анти-D антител и использовании более распространенных в лабораторной практике реагентов.

**Цель.** Оценить возможность применения метода неконкурентного иммуноферментного анализа для определения анти-D антител.

### **Материалы и методы**

Исследование проводили с использованием 3-го международного стандартного образца (МСО) антирезусного иммуноглобулина человека с активностью 297 МЕ/мл (16/332, NIBSC, Великобритания) и стандартных эритроцитов человека с фенотипами 0R1R1 и 0R2R2, обработанных папаином, ID-DiaCell IP-IP-IP/ID-DiaPanel-P (BioRad DiaMed GmbH, Швейцария). Для приготовления иммуносорбента в лунки F-образного планшета (Corning Inc., США) вносили по 50 мкл

суспензии стандартных эритроцитов, отмытых фосфатным буферным раствором (ФБР, 0,01 М, рН = 7,4). Клетки осаждали в течение 3 минут при 800 об/мин и температуре от 2 до 8°C. Не удаляя надосадочную жидкость, в каждую пробу добавляли по 100 мкл 0,1 % раствора глютаральдегида (Sigma Aldrich, США) и выдерживали при комнатной температуре в течение 10 минут. По истечении времени экспозиции несвязавшиеся с поверхностью планшета эритроциты трехкратно отмывали, внося в лунки по 300 мкл ФБР с помощью автоматического устройства PW40 (Bio-Rad Laboratories Inc., Франция). Перед постановкой анализа в лунки планшета вносили по 250 мкл ФБР, содержащего 20 г/л бычьего сывороточного альбумина (ФБР-БСА20), и инкубировали при комнатной температуре в течение 30 минут, затем удаляли жидкость.

Для определения анти-D антител методом неконкурентного ИФА в лунки планшета с фиксированными эритроцитами вносили по 50 мкл разведений проб в двух независимых повторах, в отрицательный контроль – 50 мкл ФБР-БСА10. После выдерживания при комнатной температуре в течение 60 минут несвязавшиеся антитела отмывали трижды трисовым буфером (ТБР, рН = 7,2), внося каждый раз по 300 мкл, с помощью автоматического промывающего устройства PW40 (Bio-Rad Laboratories, Франция). Образовавшиеся иммунные комплексы выявляли с помощью конъюгата антител кролика к IgG человека с пероксидазой хрена (Elabscience Biotechnology, США) в количестве по 50 мкл при температуре 37 °C в течение 60 минут. Лунки трижды промывали ФБР, каждый раз внося по 350 мкл буфера, с помощью автоматического устройства PW40 (Bio-Rad Laboratories, Франция). Реакционную смесь окрашивали тетраметилбензидином (PanReac Applichem, США) в течение 15 минут при комнатной температуре в защищенном от света месте. Иммуноферментную реакцию останавливали внесением 50 мкл 1 М серной кислоты. Оптическую плотность регистрировали при длине волны 450 нм с помощью фотометра для микропланшетов iMark (Bio-Rad Laboratories Inc., Япония).

### **Результаты и их обсуждение**

На первом этапе исследования выбран способ определения анти-D антител методом неконкурентного ИФА. Для детекции образовавшихся иммунных комплексов наиболее подходят конъюгированные антивидовые антитела к IgG человека с ферментативной меткой. Их использование в реакции позволяет напрямую выявлять анти-D антитела испытуемого образца. При добавлении в реакционную смесь субстрата происходит ферментативная реакция, в результате которой ак-

тивированный хромоген окрашивает раствор. Аналитический сигнал при этом прямо пропорционален содержанию анти-D антител. Для оценки возможности применения изложенного способа выбраны конъюгат с пероксидазой хрена и ее субстрат – тетраметилбензидин, поскольку эти реагенты наиболее доступны и широко применяются в иммунологических исследованиях.

Последовательные разведения МСО, содержащие анти-D антитела в концентрациях 297; 30; 3,0; 0,3; 0,03; 0,015; 0,007 и 0,004 МЕ/мл, инкубировали в лунках иммуносорбента с папаинизированными эритроцитами 0R1R1 и 0R2R2, нанесенными на твердую фазу. Специфичность оценивали с использованием клеток фенотипа 0гг. Зависимости оптической плотности от логарифма концентрации анти-D антител представлены на графике (рисунок 1), согласно которому функциональная связь между аналитическим сигналом и количеством антител в испытуемых образцах отсутствовала. Это подтверждалось вычисленными значениями коэффициентов корреляции ниже 0,2. При использовании эритроцитов 0гг зарегистрированы значения оптической плотности, сопоставимые с аналитическим сигналом в пробах, инкубированных с клетками 0R1R1 и 0R2R2, несущими на поверхности D-антиген.

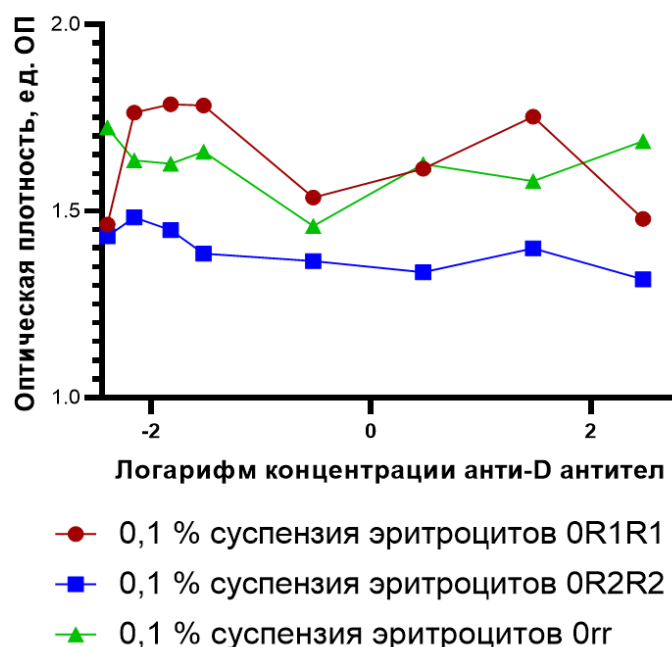


Рисунок 1 – Зависимость аналитического сигнала (оптической плотности) от концентрации анти-D антител при использовании конъюгата антивидовых антител к IgG человека с пероксидазой хрена

Схема дальнейшего эксперимента и полученные результаты представлены на рисунке 2. Путем последовательного исключения компонентов реакции установлено, что присутствие в системе эритроцитов и субстрата пероксидазы приводит к неспецифическому окрашиванию реакционной смеси (испытания № 2 и № 3, рисунок 2). Особенностью данной методики ИФА является то, что в качестве носителя D-антигена используется эритроцит, содержащий целый комплекс биологически активных веществ, необходимых для реализации его высокоспециализированных функций. Пероксидаза – это распространенный в живых клетках фермент, катализирующий реакции окисления различных веществ с помощью перекиси водорода [4]. В связи с этим возможно предположить возникновение неспецифического окрашивания исследуемых проб вследствие взаимодействия пероксидазы эритроцитов с реагентом реакции – тетраметилбензидином.

Компонент реакции	Наличие компонента в системе (+ / -)			
	Испытание № 1	Испытание № 2	Испытание № 3	Испытание № 4
Эритроциты (0,1 % суспензия)	-	+	+	+
Антирезус Rho(D) антитела	+	-	+	+
Конъюгат антител к IgG человека с пероксидазой хрена	+	+	-	+
Субстрат - тетраметилбензидин	+	+	+	-
↓	↓	↓	↓	↓
Оптическая плотность, ед. ОП	0,035	1,576	1,955	0,088

Рисунок 2 – Оценка влияния компонентов реакции на аналитический сигнал

С целью снижения влияния неспецифического окрашивания до фонового уровня подбирали рабочую концентрацию эритроцитов. Десятикратные последовательные разведения МСО с содержанием анти-D антител 0,0099; 0,099; 0,99; 9,9 и 99 МЕ/мл инкубировали с иммобилизованными на твердой фазе эритроцитами с фенотипом 0R2R2 в конечных концентрациях 0,1; 0,01; 0,001; 0,0001 и 0,00001%. Фоновый сигнал для указанных суспензий эритроцитов составил 46

1,882; 0,988; 0,098; 0,055 и 0,042 ед. соответственно. В результате корреляционного анализа полученных данных установлена статистически значимо высокая степень прямой корреляции между концентрацией антител и аналитическим сигналом для 0,001%, 0,0001% и 0,00001% клеточных суспензий (таблица 1).

Таблица 1 – Результаты корреляционного анализа

Статистический параметр	Концентрация эритроцитов / значение статистического параметра				
	0,1 %	0,01 %	0,001 %	0,0001 %	0,00001 %
Коэффициент корреляции $r$	0,54	0,82	0,91	0,87	0,91
95 % ДИ $r$	-0,65 – 0,96	-0,24 – 0,99	0,16 – 0,99	-0,07 – 0,99	0,16 – 0,99
Значимость коэффициента корреляции $r$	Не значим ( $p = 0,35$ )	Не значим ( $p = 0,09$ )	Значим ( $p = 0,03$ )	Значим ( $p = 0,04$ )	Значим ( $p = 0,03$ )

Согласно графику (рисунок 3), в случаях использования 0,0001 и 0,00001 % клеточных суспензий аналитический сигнал ниже 0,2 ед и 0,070 ед. соответственно. При 0,001 % содержании эритроцитов диапазон оптической плотности является оптимальным и составляет от 0,154 ед. до 0,618 ед. При указанной концентрации клеток отмечен адекватный уровень фонового сигнала – 0,098 ед.

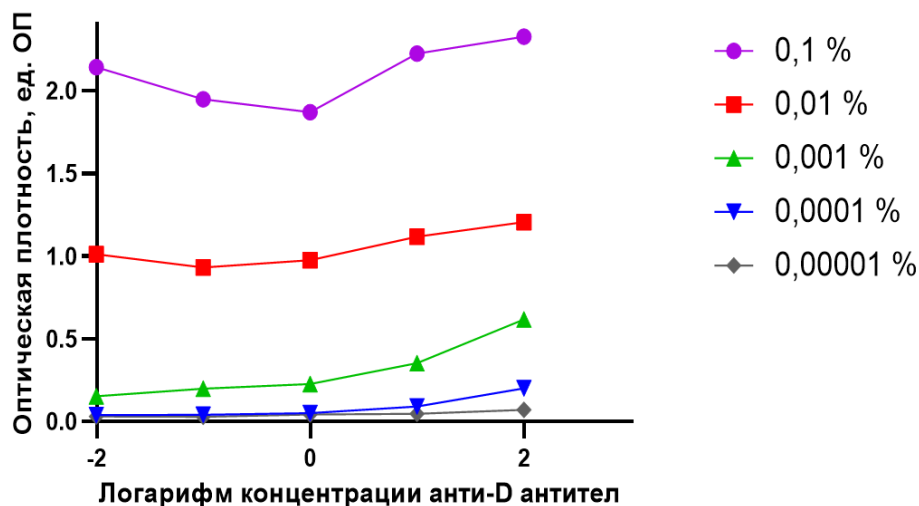


Рисунок 3 – Зависимость оптической плотности от логарифма концентрации анти-D антител при разных концентрациях эритроцитов

Далее с использованием выбранной 0,001 % суспензии клеток проведено определение анти-D антител в семи двукратных последовательных разведениях

МСО с номинальной концентрацией IgG – 99,00; 49,50; 24,75; 12,38; 6,19; 3,09 и 1,55 МЕ/мл. Полученная зависимость оптической плотности от содержания анти-D антител, построенная в логарифмических координатах, была линейна ( $R^2 = 0,969$ ). Это указывает на возможность определения анти-D антител с использованием описанной выше методики в аналитической области от 1,55 до 99,00 МЕ/мл (рисунок4).

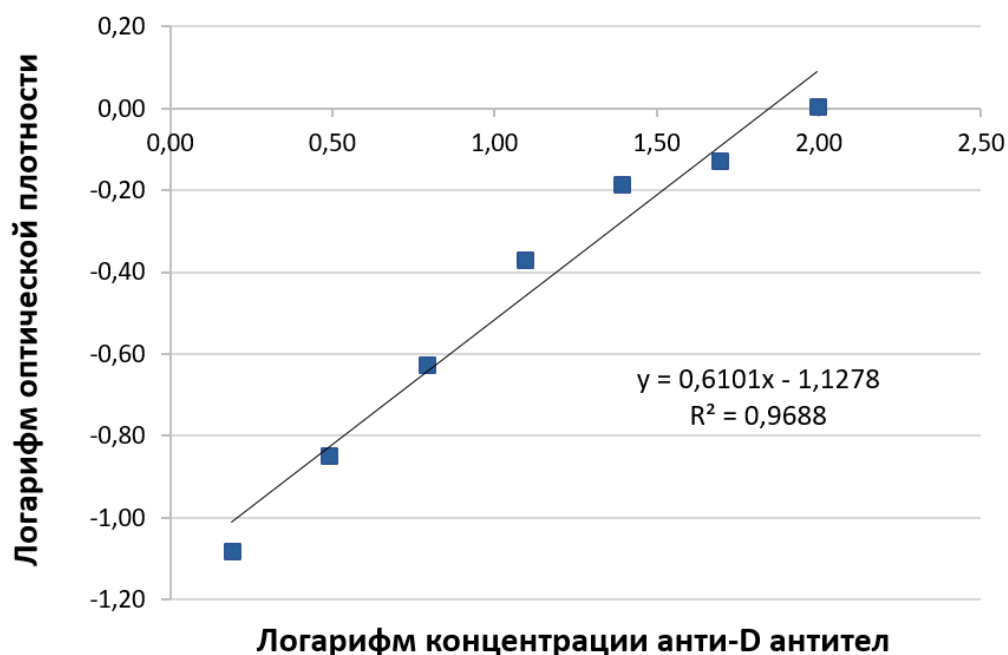


Рисунок 4 – Зависимость логарифма оптической плотности от логарифма концентрации антирезус  $Rh_0(D)$  антител

### Заключение

По результатам проведенного исследования установлена принципиальная возможность количественного определения анти-D антител методом неконкурентного ИФА с использованием конъюгата антител к IgG человека с пероксидазой хрена и ее субстрата тетраметилбензидина. Подобрана концентрация эритроцитов – 0,001 %, при которой наблюдается дозозависимый эффект между содержанием анти-D антител и оптической плотностью, а также приемлемый уровень фонового сигнала (0,098 ед.). С использованием международного стандартного образца определена аналитическая область методики, которая составляет от 1,55 до 99,00 МЕ/мл.



### Список литературы

1. Assay of Human Anti-D Immunoglobulin: European Pharmacopoeia. 10Th ed. Strasbourg : Directorate for the Quality of Medicines of the Council of Europe, 2020.
2. Thorpe S.J., Fox B., Turner C. Competitive enzyme-linked immunoassay of monoclonal immunoglobulin G anti-D preparations // Transfusion Medicine. - 2003. - Vol. 13, N 3. - P.153-160.
3. Гармаза Ю.М. Механизмы развития окислительного стресса при моделировании состояния дефицита ионов цинка в эритроцитах человека invitro / Ю.М. Гармаза, А.В. Тамашевский // Актуальные вопросы биологической физики и химии. – 2018. – Т. 3, № 1. – С. 115-122.
4. Шведова Е.В., Кудашева Э.Ю., Климов В.И. Методы оценки специфической активности препаратов иммуноглобулина человека антирезус Rho(D): современное состояние проблемы // Иммунология. - 2020. - N 3 (41). - С. 256-261.

УДК 616.155.392.8

ГРНТИ 76.03.55

*С.О. Коробов*

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
«Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания  
крови Федерального медико-биологического агентства», Киров  
младший научный сотрудник лаборатории клеточной и молекулярной  
иммунологии

*S.O. Korobov*

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of  
Hematology and Blood Transfusion under  
the Federal Medical Biological Agency, Kirov  
Junior Researcher of the Laboratory of cellular and molecular immunology

E-mail: korobov@niigpk.ru

*Е.Л. Назарова*

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
«Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания  
крови Федерального медико-биологического агентства», Киров

кандидат медицинских наук, заведующий лабораторией клеточной и  
молекулярной иммунологии

*E.L. Nazarova*

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of  
Hematology and Blood Transfusion under  
the Federal Medical Biological Agency, Kirov  
Candidate of Medical Sciences, Head of the laboratory of cellular and molecular  
immunology  
E-mail: nazarova@niigpk.ru

*Д.В. Прозоров*

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский  
научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови  
Федерального медико-биологического агентства», Киров  
младший научный сотрудник лаборатории клеточной и молекулярной  
иммунологии

*D.V. Prozorov*

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of  
Hematology and Blood Transfusion under  
the Federal Medical Biological Agency, Kirov  
junior researcher of the laboratory of cellular and molecular immunology  
E-mail: prozorov@niigpk.ru

### **Взаимосвязь тяжелых инфекционных осложнений острого миелоидного лейкоза с полиморфным профилем генов иммунного ответа**

### **Relationship between severe infectious complications of acute myeloid leukemia and polymorphic profile of immune response genes**

*Аннотация.* Пациенты с острым миелоидным лейкозом ( $n = 83$ ) объединены в 2 кластера на основании схожести их генотипов в 15 локусах генов иммунного ответа. Частота инфекционных осложнений у больных в обоих кластерах различалась (46,3% и 13,3% соответственно,  $\chi^2 = 20,5$ , ОШ 5,53, 95% ДИ 2,61-12,8,  $p < 0,001$ ). Таким образом, генетический ландшафт иммунной системы может оказывать влияние на развитие инфекционных осложнений острого миелоидного лейкоза.

**Abstract.** We stratified 83 patients with acute myeloid leukemia into two clusters based on similarity of their genotypes in 15 immune loci. Frequency of severe infectious complications was significantly different between clusters (46.3% vs 13.3%,  $\chi^2 = 20.5$ , OR 5.53, 95% CI 2.61-12.8,  $p < 0,001$ ). Thereby, we conclude that genetic landscape of immune system may play role in the development of infections complications in acute myeloid leukemia patients.

**Ключевые слова:** острый миелоидный лейкоз; инфекционные осложнения; Toll-подобные рецепторы; интерлейкины; полиморфизм.

**Index terms:** acute myeloid leukemia; infectious complications; Toll-like receptors; interleukins; polymorphism.

**Введение.** Развитие инфекционных осложнений (ИО) у больных острым миелоидным лейкозом (ОМЛ), получающих химиотерапевтическое лечение, представляет актуальную проблему для онкогематологии. Несмотря на совершенствование лечебно-профилактических подходов, частота развития инфекций у больных ОМЛ остается высокой [1, 2]. Их возникновение наиболее характерно для периодов индукции и консолидации ремиссии. Тяжелые ИО являются значимым компонентом смертности у больных острыми лейкозами [2, 3]. Таким образом, существует необходимость в поиске ранних предикторов развития и течения ИО.

Инфекционные осложнения представляют собой мультифакториальный процесс. Помимо маркеров вирулентности возбудителя, на развитие инфекций также оказывают влияние индивидуальные особенности функционирования иммунной системы человека. Известно, что часть ее функций детерминирована генетически. За последнее десятилетие появилось большое количество публикаций о важности изучения генетического профиля при формировании предрасположенности или резистентности к инфекционным заболеваниям [4, 5]. Основная часть генотипической вариабельности обусловлена наличием однонуклеотидных полиморфизмов (SNPs), представляющих собой единичную замену нуклеотида в гене, способных влиять на функцию или структуру его продукта. Таким образом, определение SNPs в генах иммунного ответа может позволить идентифицировать факторы, опосредующие предрасположенность к ИО у больных ОМЛ.

Целью исследования являлась оценка взаимосвязи генетического профиля врожденной иммунной системы с развитием ИО у больных ОМЛ.

## Материалы и методы

В ретроспективное исследование вошли 83 пациента с диагнозом ОМЛ, проходивших стационарное лечение в клинике ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России в 2019 - 2022 гг. Из них 40 (49%) женщин, 43 (51%) мужчины. Медиана возраста пациентов составила 58 (41-66) лет. Наблюдение продолжалось в течение индукционного и консолидационного периодов терапии. Проанализированы результаты 124 (53%) индукционных курсов и 112 (47%) консолидационных. Тяжелым инфекционным осложнением считались эпизоды пневмонии, сепсиса и гнойных инфекций мягких тканей, которые развились у 47 (56,6%) пациентов (таблица 1).

Таблица 1 – Характеристика пациентов

Признак	Характеристика
Возраст, лет	58 (41-66)
Пол	
<i>мужской</i>	43 (57,8%)
<i>женский</i>	40 (48,2%)
Терапия	
<i>индукция</i>	124 (52,5%)
<i>консолидация</i>	112 (47,5%)
Тяжелые инфекционные осложнения	
<i>присутствуют</i>	47 (56,6%)
<i>отсутствуют</i>	36 (43,4%)

Материалом для типирования SNPs служили образцы геномной ДНК, выделенной из периферической крови и аспиратов костного мозга. Для выделения ДНК использовали набор реактивов РИБО-Преп (АМПЛИ-Сенс, Россия). Оценка носительства однонуклеотидных полиморфизмов в генах *TLR2* (R753Q, rs5743708), *TLR3* (L412F, rs3775291), *TLR4* (G896A, rs4986791; *TLR4* C1196T rs4986790), *TLR6* (T745C, rs5743810), *TLR9* (T1237C, rs5743836; G2848A, rs352140), *IL-1B* (T31C, rs1143627; T511C, rs16944; C3953T, rs1143634; G1473C, rs1143623) проводилась с помощью комплекта реагентов «SNP-Экспресс-ЭФ» (НПФ «Литех», Россия) в аллель-специфичной полимеразной цепной реакции. Продукты амплификации детектировались в 3% агарозном геле.

Статистическая обработка данных проводилась в среде программирования R (v3.2.3), с использованием пакетов e1071, scatterplot3d. Количественные характеристики представлены в виде медианы со значениями 1 и 3 квартиля (Me Q1 - Q3). Кластерный анализ произведен с помощью алгоритма С-средних

(C-Means), для оценки различия генотипов использовано манхэттеновское расстояние. C-средних является представителем семейства методов нечеткой/мягкой кластеризации, при котором анализ данных происходит при отсутствии информации о классовой принадлежности (т.н. обучение без учителя). Основной чертой названных методов является то, что принадлежность к кластеру является не однозначной, а представляет из себя вероятность. Данная особенность позволяет формировать более однородные группы за счет исключения объектов, менее похожих на типичного представителя кластера. Для получения и использования вероятностных оценок применен *degree of fuzzification*, равный 2. Наблюдения с вероятностью принадлежности к одному из кластеров менее 55,0% считались шумом.

Визуализация выполнена при помощи метода главных компонент (PCA), позволяющего разложить исходные данные на так называемые главные компоненты. Их число равно количеству исходных переменных, они содержат в себе показатели выборочной дисперсии признаков от наибольшего к наименьшему. Таким образом, при использовании первых нескольких главных компонент PCA позволяет уменьшить размерность данных, делая возможным их графическое отображение.

Для сравнения групп по категориальным признакам использовали критерий  $\chi^2$  Пирсона и точный критерий Фишера. Различия количественных признаков оценивались с помощью критерия Манна-Уитни. Порог статистической значимости выявленных различий установлен на уровне  $p < 0,05$ .

## Результаты

Исследуемая выборка больных разделена на 2 кластера, основанных на разности генотипов пациентов с ОМЛ в локусах *TLR2* R753Q, *TLR3* L412F, *TLR4* G896A, *TLR4* C1196T, *TLR6* T745C, *TLR9* T1237C, *TLR9* G2848A, *IL-1B* T31C, *IL-1B* T511C, *IL-1B* C3953T, *IL-1B* G1473C. Двадцать девять пациентов не соответствовали критериям принадлежности ни к одному из кластеров и при дальнейшем анализе не учитывались.

В таблице 2 представлена характеристика обследованных, отнесенных к каждому кластеру. В кластер 1 отнесены 22 (40,7%) больных с медианой возраста 60 лет, а в кластер 2 – 32 (59,3%) с медианой возраста 54 года. Количество проведенных курсов химиотерапии составило 67 и 98, соответственно (в среднем

1 пациент каждой группы получил 3 курса). Гендерных и возрастных различий между представителями обоих кластеров не отмечено. Количество тяжелых инфекционных осложнений развившихся на фоне химиотерапевтического лечения у пациентов 1 и 2 кластеров статистически значимо различалось (46,3% против 13,3%,  $\chi^2 = 20,5$ , ОШ 5,53, 95% ДИ 2,61-12,8,  $p < 0,001$ ).

Таблица 2 – Характеристика кластеров больных острым миелоидным лейкозом

Признак	Кластер 1	Кластер 2	<i>p</i>
Пол			
<i>Женский, частота (%)</i>	22 (44,9%)	18 (52,9%)	0,51
<i>Мужской, частота (%)</i>	27 (55,1%)	16 (47,1%)	
Тяжелые ИО			
<i>Отсутствуют, частота (%)</i>	8 (36,4%)	18 (56,2%)	< 0,01
<i>Присутствуют, частота (%)</i>	14 (63,3%)	14 (43,8%)	
TLR3 1234C>G			
CC	18 (81,8%)	6 (18,8%)	< 0,01
CT	4 (18,2%)	19 (59,4%)	
TT	0 (0%)	7 (21,9%)	
IL1 $\beta$ -511C>T			
AA	1 (4,5%)	9 (28,1%)	0,06
AG	13 (59,1%)	17 (53,1%)	
GG	8 (36,4%)	6 (18,8%)	
IL1 $\beta$ -1473G>C			
CC	17 (77,3%)	6 (21,9%)	<0,01
CG	5 (22,7%)	21 (65,6%)	
GG	0 (0%)	5 (15,6%)	
IL2 -330G>T			
AA	17 (77,3%)	7 (21,9%)	<0,01
AG	5 (22,7%)	19 (59,4%)	
GG	0 (0%)	6 (18,8%)	
IL10 -1082G>A			
GG	10 (45,5%)	5 (15,6%)	0,04
GA	8 (36,4%)	13 (40,6%)	
AA	4 (18,2%)	14 (43,8%)	
IL10-819C>T			
AA	18 (81,8%)	8 (25,0%)	<0,01
AG	2 (9,1%)	21 (65,6%)	
GG	2 (9,1%)	3 (9,4%)	

При анализе различий в частоте встречаемости генотипов между кластерами были обнаружены значимые особенности распределения генов TLR3 1234C>G, IL1 $\beta$  -1473G>C, IL2 -330G>T, IL10 -1082G>A, IL10-819C>T. У пациентов кластера 1 доминировали носители гомозиготного генотипа дикого типа указанных генов, тогда как во 2 кластере преобладали лица с гетерозиготным генотипом. Распределение генотипов гена IL1 $\gamma$  -511C>T между кластерами было различным, но уровня статистической значимости не достигало.

На Рисунке 1 представлено графическое изображение принадлежности к сформированным с помощью метода главных компонент кластерам. Используются главные компоненты 1, 2 и 3, в сумме объясняющие 51,4% вариаций исходных данных. Можно отметить, что кластеры довольно четко разграничены в пространстве, что свидетельствует об успешной стратификации больных на различные друг от друга группы.

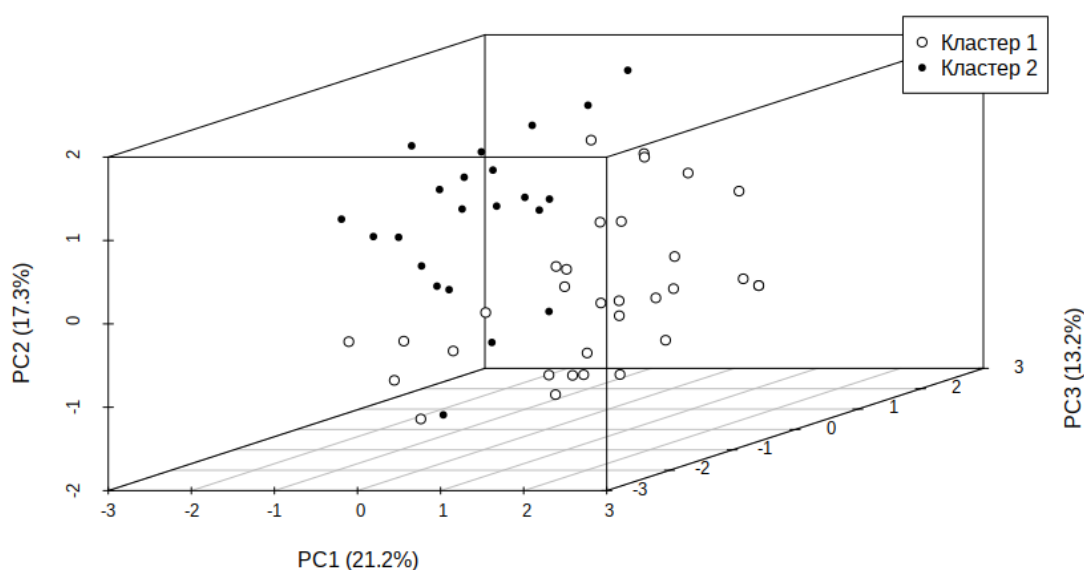


Рисунок 1 — Графическое изображение кластеров больных острым миелоидным лейкозом

На рисунке 1 представлена проекция данных, используемых для кластеризации, в трехмерное пространство при помощи анализа главных компонент. Оси графика представляют собой первые три главные компоненты, наиболее хорошо описывающие исходные данные.

## Обсуждение

Согласно современным представлениям о патогенезе развития инфекционных заболеваний, восприимчивость к инфекциям колеблется в широких пределах между популяциями и между отдельными их представителями [5, 6, 7]. Вклад пациент-ассоциированных маркеров в предрасположенность к развитию инфекций определяется множеством факторов, включая генетические [5, 6]. Ландшафт генетического разнообразия пациентов представляет из себя уникальную комбинацию из множества вариантов генов, большая часть которых обусловлена SNPs. Известно, что единичные SNPs оказывают слабое влияние на признак, что может быть препятствием к определению их роли в патогенезе инфекционного процесса [8]. При незначительном вкладе каждого фактора в исследуемый признак, его воздействие может быть пропущено при статистической обработке. Кластерный анализ основан на объединении наиболее похожих объектов в группы, максимально отличающиеся между собой, и, таким образом, позволяет подойти к оценке генотипа пациента более комплексно, рассматривая его как единое целое, а не набор независимых переменных [9].

В нашем исследовании показана взаимосвязь генетического профиля врожденной иммунной системы с развитием инфекционных осложнений у больных ОМЛ. Генетический ландшафт врожденного иммунитета позволяет выделить среди больных ОМЛ группы с различной частотой тяжелых ИО и, таким образом, может являться свидетельством его влияния на восприимчивость пациентов к инфекциям. Необходимо отметить, что анализ проводился только в отношении генетических факторов, без учета лабораторных и клинических данных. Оценка роли генетического профиля в комбинации с клинико-лабораторными предикторами может помочь более точно оценить его влияние на развитие ИО, что позволит выделить отдельные прогностически значимые группы.

## Выводы

Генетический профиль иммунной системы пациента с ОМЛ может являться одним из факторов, определяющих его индивидуальную восприимчивость к развитию тяжелых инфекционных осложнений. Необходимо дальнейшее, более детальное изучение роли генотипа в формировании предрасположенности к развитию инфекций, включая проспективные исследования и с учетом клинико-лабораторных показателей.



## Список литературы

1. Infectious complications of targeted drugs and biotherapies in acute leukemia. Clinical practice guidelines by the European Conference on Infections in Leukemia (ECIL), a joint venture of the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT), the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC), the International Immunocompromised Host Society (ICHS) and the European Leukemia Net (ELN)/ G. Maschmeyer, L. Bullinger, C. Garcia-Vidal [et al.] // *Leukemia*. — 2022. — Т36. С.1215-1226. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41375-022-01556-7>.
2. Treatment-Related Mortality From Infectious Complications in an Acute Leukemia Clinic/ J. Torres-Flores, R. Espinoza-Zamora, J. Garcia-Mendez [et al.] // *J Hematol*. — 2020. — Т9. №4. — С.123-131. doi:10.14740/jh751.
3. Impact of treatment intensity on infectious complications in patients with acute myeloid leukemia/ R. Tober, U. Schnetzke, M. Fleischmann [et al.] // *J Cancer Res Clin Oncol*. —2023. — Т149 №4. С.1569-1583. doi:10.1007/s00432-022-03995-2.
4. Mukherjee S., Huda S., Sinha Babu S.P. Toll-like receptor polymorphism in host immune response to infectious diseases: A review // *Scand J Immunol*. — 2019. — Т.90 №1. — e12771. doi:10.1111/sji.12771.
5. Alcaïs A., Abel L., Casanova J.L. Human genetics of infectious diseases: between proof of principle and paradigm. // *J Clin Invest*. —2009. — Т.119 №9. — С. 2506-2514.
6. Hill A.V. Evolution, revolution and heresy in the genetics of infectious disease susceptibility. // *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. — 2012. Т.367 №1590 — С.840-849. doi:10.1098/rstb.2011.0275.
7. Baker C, Antonovics J. Evolutionary determinants of genetic variation in susceptibility to infectious diseases in humans. // *PLoS One*. — 2012. Т.7 №1. — e29089. doi:10.1371/journal.pone.0029089.
8. Benefits and limitations of genome-wide association studies/ V. Tam, N. Patel, M Turcotte [et al.] // *Nat Rev Genet*. — 2019. —Т.20 №8. — С.467-484. doi:10.1038/s41576-019-0127-1.
9. Akopov A.S, Moskovtsev A.A, Dolenko S.A, Savina G.D. Cluster analysis in biomedical researches // *Patol Fiziol Eksp Ter*. — 2013. — №4. — С.84-96.

*T.L. Kudryavtseva*

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», Киров  
лаборант-исследователь лаборатории клеточных технологий

*T.L. Kudryavtseva*

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical and Biological Agency, Kirov

Laboratory Assistant Researcher of the Laboratory of Cellular Technologies

E-mail: [tlkudryavtseva@gmail.com](mailto:tlkudryavtseva@gmail.com)

*E.A. Poponina*

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», Киров  
кандидат медицинских наук, заведующий лабораторией клеточных технологий

*E.A. Poponina*

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical and Biological Agency, Kirov

Candidate of Medical Sciences, Head of the Laboratory of Cellular Technologies

E-mail: [poponinaea@niigpk.ru](mailto:poponinaea@niigpk.ru)

*S.V. Popova*

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», Киров  
кандидат биологических наук, младший научный сотрудник лаборатории клеточных технологий

*S.V. Popova*

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical and Biological

Agency, Kirov  
Candidate of Biological Sciences, Junior Researcher of the Laboratory of Cellular  
Technologies  
E-mail: popova@niigpk.ru

*A.O. Пестрикова*  
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский  
научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови  
Федерального медико-биологического агентства», Киров  
лаборант-исследователь лаборатории клеточных технологий

*A.O. Pestrikova*  
The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of  
Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical and Biological  
Agency, Kirov  
Laboratory Assistant Researcher of the Laboratory of Cellular Technologies  
E-mail: pestrikova@niigpk.ru

*Е.Л. Назарова*  
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский  
научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови  
Федерального медико-биологического агентства», Киров  
кандидат медицинских наук, заведующий лабораторией клеточной и  
молекулярной иммунологии

*E.L. Nazarova*  
The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of  
Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical and Biological  
Agency, Kirov  
Candidate of Medical Sciences, Head of the Laboratory of Cellular and Molecular  
Immunology  
E-mail: nazarova@niigpk.ru

*К.А. Воробьев*  
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский  
научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови  
Федерального медико-биологического агентства», Киров  
доктор биологических наук, заместитель директора по научной работе

*K.A. Vorobiev*

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical and Biological Agency, Kirov

Doctor of Biological Sciences, Deputy Director for Research

E-mail: vorobiev@niigpk.ru

*A.B. Karavaeva*

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови

Федерального медико-биологического агентства», Киров  
врач клинической лабораторной диагностики клинической лаборатории

*A.V. Karavaeva*

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical and Biological Agency, Kirov

Doctor of Clinical Laboratory Diagnostics of the Clinical Laboratory

E-mail: karavaevaav@niigpk.ru

*T.N. Rybolovleva*

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови

Федерального медико-биологического агентства», Киров  
младший научный сотрудник лаборатории клеточной и молекулярной иммунологии

*T.N. Rybolovleva*

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical and Biological Agency, Kirov

Junior Researcher of the Laboratory of Cellular and Molecular Immunology

E-mail: rybolovleva@niigpk.ru

*Д.Н. Смирнова*

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови

Федерального медико-биологического агентства», Киров  
кандидат биологических наук, научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории прикладной иммуногенетики

*D.N. Smirnova*

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical and Biological Agency, Kirov

Candidate of Biological Sciences, Researcher of the Research Laboratory of Applied Immunogenetics

E-mail: smirnovadn@niigpk.ru

## **Получение псевдолентивирусных частиц, несущих универсальный химерный антигенный рецептор**

### **Obtaining pseudolentiviral particles carrying a universal chimeric antigen receptor**

***Аннотация.** Трансфекция – процесс введения нуклеиновой кислоты в клетки человека и животных невирусным методом. В настоящее время трансфекция незаменима для создания рекомбинантных вирусных частиц, а также наработки вирусных векторов. Для сборки и наработки полноценных вирусных частиц могут использоваться восприимчивые эукариотические клетки, например, НЕК-клетки (Human Embryonic Kidney). Для повышения эффективности трансфекции клеток линии НЕК293Т в работе нами впервые использовалась система для получения псевдовиральных частиц третьего поколения.*

***Abstract.** Transfection is the process of introducing a nucleic acid into human and animal cells by a non-viral method. Currently, transfection is indispensable for the creation of recombinant viral particles, as well as the development of viral vectors. Receptive eukaryotic cells, such as HEK cells (Human Embryonic Kidney), can be used to assemble and produce full-fledged viral particles. To improve the efficiency of transfection of HEK293T cells, we for the first time used a system for obtaining third-generation pseudoviral particles.*

***Ключевые слова:** химерный антигенный рецептор; трансфекция; лентивирусы; плазмиды.*

***Index terms:** chimeric antigen receptor; transfection; lentiviruses; plasmids.*

**Введение.** Одним из передовых иммунотерапевтических методов, нашедших свое реальное применение в онкогематологии, является адоптивная клеточная терапия генетически модифицированными Т-лимфоцитами [12]. Адоптивная клеточная терапия основана на введении в организм пациента аутологичных или

аллогенных Т-лимфоцитов, которые подверглись *ex vivo* генетической модификации и экспрессирующих на своей поверхности химерные антигенные рецепторы (Chimeric Antigen Receptor, CAR), способные узнавать опухольассоциированные антигены и связываться с ними без участия главного комплекса гистосовместимости I класса [3; 9; 11].

Для доставки генетического материала в Т-лимфоциты используются, в том числе, вирусные векторы. Наиболее часто для генетической модификации Т-лимфоцитов применяются ретровирусные векторы, полученные из гамма-ретровирусов и лентивирусов [4; 5]. В связи со способностью лентивирусных векторов включать в себя большое количество генетического материала (до 8 тысяч пар оснований) и инфицировать делящиеся и неделящиеся клетки, эти вирусы являются перспективным инструментом для доставки целевых генов [14]. Лентивирусы могут обеспечить длительную экспрессию трансгена и индуцируют минимальный иммунный ответ организма-хозяина [16]. Наиболее исследованным лентивирусом является вирус иммунодефицита человека (ВИЧ). В геноме ВИЧ выделяют три гена структурных белков (*GAG*, *POL* и *ENV*) и шесть генов регуляторных белков (*TAT*, *REV*, *VPR*, *VPU*, *NEF* и *VIF*) [2; 8; 17]. Для идентификации и определения ВИЧ выявляют поверхностный антиген р24, который является белком вирусного капсида (внешней оболочки вируса). Несмотря на то, что платформой для разработки лентивирусных векторов служит ВИЧ-1, методы генной инженерии позволяют создавать векторы, безопасные для генотерапии [7; 13]. В частности, из вирусного генома удаляют гены, ответственные за репликацию вируса, его упаковку и выход из клетки. При этом лентивирусные векторы сохраняют функциональную активность (доставка генетического материала и его интеграция в геном), но теряют репликативную [1; 7; 18].

В настоящее время выделяют три поколения лентивирусных векторов, которые различаются числом плазмид, уменьшением количества генов аксессуарных белков, наличием дополнительных делеций в длинном концевом повторе (3'LTR) для создания самоинактивирующегося вектора (SIN) [7]. Первое поколение лентивирусных векторов содержит значительную часть генома ВИЧ и включает три плазмиды. На смену этим конструкциям пришли более безопасные векторы второго поколения, не содержащие гены аксессуарных факторов вирулентности *VIF*, *VPR*, *VPU*, *NEF* [15]. Такие конструкции несут только четыре из девяти генов ВИЧ: *GAG*, *POL*, *TAT*, *REV*. С целью обеспечить безопасность геном лентивируса

третьего поколения разнесен на четыре плазмиды. Гены *GAG* и *POL* кодируются отдельно от *REV* на разных пакующих плаزمидах. *ENV* (VSV-G) также выделен в отдельную плазмиду вирусной оболочки. В сравнительном анализе с гамма-ретровирусными системами лентивирусные векторы показали меньший риск спонтанной рекомбинации [6; 10].

**Материалы и методы.** Культивирование *E. coli* и выделение плазмидных ДНК. На первом этапе исследований проведены подготовительные работы по выделению и очистке плазмид из рекомбинантных штаммов *E. coli*, несущих различные генетические элементы лентивирусного вектора, а также ген универсального химерного антигенного рецептора:

- pLV-CART-Bs-IgG4 (кодирует универсальный CART);
- pCMV-VSV-G (кодирует белок оболочки вируса везикулярного стоматита VSVG);
- pRRE-GAG (кодирует основные вирусные белки Gag, Pol, Tat);
- pRSV-Rev (кодирует вирусную ревертазу).

Плазмидные ДНК выделяли из ночной культуры клеток *E. coli* с использованием набора QIAGEN Plasmid Mini Kit (QIAGEN, США), который обеспечивает высокие выходы плазмидной ДНК, а также чистоту получаемых препаратов (эквивалентную двукратному центрифугированию в градиенте хлористого цезия). Система очистки плазмид QIAGEN не использует такие токсичные вещества, как фенол, хлороформ, бромистый этидий и хлористый цезий, сводя к минимуму опасность для персонала.

Выделение и очистку плазмидных ДНК проводили по следующей схеме: 50 мкл ночной культуры *E. coli* вносили в 5 мл среды LB с добавлением 5 % глюкозы и 50 мкг/мл ампициллина, инкубировали 12-16 часов при температуре 37 °С при непрерывном покачивании платформы (300 об/мин). Культуру центрифугировали при 6000 g в течение 15 минут при температуре 4°С, после чего клеточный осадок тщательно ресуспендировали в 300 мкл буфера P1 с предварительно добавленной к нему РНКазой А (100 мкг/мл). Далее вносили 300 мкл лизирующего буфера P2, содержимое пробирки перемешивали, переворачивая 4-6 раз: образующийся лизат представляет собой вязкую жидкость. После этого в смесь добавляли 300 мкл охлажденного до 4°С буфера P3. Осторожно перемешивали

содержимое пробирки, переворачивая ее 4-6 раз, и инкубировали на льду 5 минут. После добавления буфера Р3 образуется белый рыхлый осадок, жидкость становится менее вязкой. Осадок, в основном, состоит из геномной ДНК, белков и клеточного дебриса. Смесь аккуратно перемешивали и центрифугировали при 15000g в течение 10 минут при температуре 4°C.

На следующем этапе проводили хроматографическую очистку плазмидной ДНК, используя высокоэффективные анионообменные колонки QIAGEN-tip 20 с гравитационным потоком жидкости, входящие в состав набора QIAGEN Plasmid Mini Kit (QIAGEN, США). Плазмидная ДНК избирательно связывается с носителем при низких значениях pH и ионной силы раствора; РНК, белки, метаболиты и другие низкомолекулярные примеси удаляются при промывке колонки раствором со средней ионной силой, а очищенная плазмидная ДНК на последнем этапе элюируется в буфере с высоким содержанием соли.

Подготовка колонки QIAGEN-tip 20 к работе заключалась в ее предварительной промывке 1 мл буфера QBT (буферные растворы QBT, QC, QF входят в состав набора QIAGEN Plasmid Mini Kit (QIAGEN, США)). Для сорбции плазмидной ДНК на носителе в колонку вносили полученный после центрифугирования супернатант (клеточный лизат). После выхода из колонки жидкой фазы QIAGEN-tip 20 дважды промывали буфером QC по 2 мл (с целью удаления мешающих примесей). Элюирование ДНК с носителя осуществляли с помощью 800 мкл буфера QF, элюат собирали в пробирку объемом 15 мл. Преципитацию ДНК проводили добавлением 560 мкл изопропанола (0,7 от объема элюированной ДНК) при комнатной температуре. Смесь перемешивали и центрифугировали при 15000 g в течение 30 минут при температуре 4°C.

После этого жидкость осторожно декантировали, а осадок, содержащий ДНК, промывали 1 мл 70% раствора этанола с последующим центрифугированием при 15000 g в течение 10 минут. Полученный осадок ДНК подсушивали в течение 5-10 минут в открытой пробирке, после чего повторно растворяли в 100 мкл буфера TE (pH 8,0).

Концентрацию плазмидных ДНК определяли на спектрофотометре «TECAN Infinite M200PRO» (Австрия) при длине волны 260 нм, а чистоту препаратов после использования колонок QIAGEN-tip 20 из набора QIAGEN Plasmid Mini Kit (QIAGEN, США) – по соотношению длин волн A260/A280. Для оценки качества



полученных препаратов плазмидных ДНК проводили электрофорез в 2 % агарозном геле в 1х буфере TAE. Для визуализации использовали этидия бромид в концентрации 1 мкг/мл.

Трансфекция клеточной линии НЕК293Т. На следующем этапе исследований выделенные плазмидные ДНК были использованы для получения псевдовиральных частиц в клетках линии НЕК293Т (коллекция культур ИБХ РАН). Для этого клетки НЕК293Т культивировали в пластиковых флаконах в среде DMEM (StemCells, Канада) с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) и 50 ЕД/мл пенициллина, 50 мкг/мл стрептомицина до конфлюэнтности покрытия поверхности 70-80 %. За 1 час до проведения трансфекции осторожно проводили замену среды DMEM (StemCells, Канада) на свежую с добавлением 5 % ЭТС и 50 ЕД/мл пенициллина, 50 мкг/мл стрептомицина, не допуская открепления клеток.

Смесь выделенных ранее плазмидных ДНК готовили в 250 мкл среды RPMI-1640 (БиолоТ, Россия) в следующем соотношении:

плазида pLV-CART-Bs-IgG4 – 2 мкг;

pRRE-GAG – 2 мкг;

pCMV-VSV-G – 0,4 мкг;

pRSV-Rev – 1 мкг.

Трансфекционный агент – полиэтиленимин (BIOZOL, Германия) – в количестве 10 мкл добавляли в 250 мкл заранее внесённой в стерильную пробирку типа Эппендорф среды RPMI-1640 (БиолоТ, Россия), избегая контакта с пластиковой стенкой. После этого среду с полиэтиленимином переносили в подготовленную смесь плазмид, аккуратно перемешивали и инкубировали 15-30 минут при комнатной температуре в темноте, а затем покапельно переносили к клеткам линии НЕК293Т.

Через 24, 72, 96 часов инкубирования трансфицированных клеток НЕК293Т собирали супернатант, содержащий лентивирусные частицы, контролируя состояние культуры микроскопически. Супернатант последовательно центрифугировали при температуре 4 °С при 300 g 5 минут, далее – при 2000 g 10 минут, со-

бирая надосадочную жидкость. Наличие лентивирусных частиц подтверждали, выявляя поверхностный антиген вируса ВИЧ-1 p24 с использованием электрохемилюминисцентного иммунотеста (ИХЛА) HIV Combi PT (Cobas), а также иммуноферментным анализом (ИФА) (набор Lenti-X p24 Rapid Titer Kit, Takara-bio).

Для концентрирования частиц применяли Lenti-X Concentrator (ClonTech, Канада), который добавляли в соотношении 1:3 к супернатанту, содержащему лентивирусные частицы, и инкубировали при 4°C в течение часа. Затем центрифугировали при температуре 4°C при 1500 g 45 минут, аккуратно удаляли надосадочную жидкость, не задевая осадок. Осторожно ресуспендировали осадок в 4 мл фосфатно-солевого буфера (pH 7,2-7,8), аликвотировали и хранили при минус 80 °C или сразу же использовали для постановки следующего этапа – трансдукции лимфоцитов.

**Результаты.** В Таблице 1 представлены характеристики выделенных препаратов плазмидных ДНК для создания псевдовирусных частиц с геном универсального химерного антигенного рецептора, их качество при оценке чистоты после выделения – на Рисунке 1.

Таблица 1 – Характеристики выделенных плазмидных ДНК

Плазида	Концентрация плазмидной ДНК, нг/мкл	Количество выделенной ДНК, мкг	Чистота плазмидной ДНК, A260/A280
pLV-CART-Bs-IgG <sub>4</sub> (n=4)	55,3 [26,5; 119,8]	4,88 [1,33; 11,99]	1,89 [1,84; 1,91]
pRRE-GAG (n=5)	121,5 [119,8; 254,8]	12,15 [11,98; 12,74]	1,88 [1,86; 1,88]
pRSV-Rev (n=5)	171,8 [35,2; 188,6]	8,59 [3,52; 9,43]	1,87 [1,86; 1,89]
pCMV-VSV-G (n=3)	294,3 [267,1; 310,3]	14,71 [13,36; 15,52]	1,88 [1,88; 1,88]

\*Примечание: данные представлены в виде медианы и квартилей

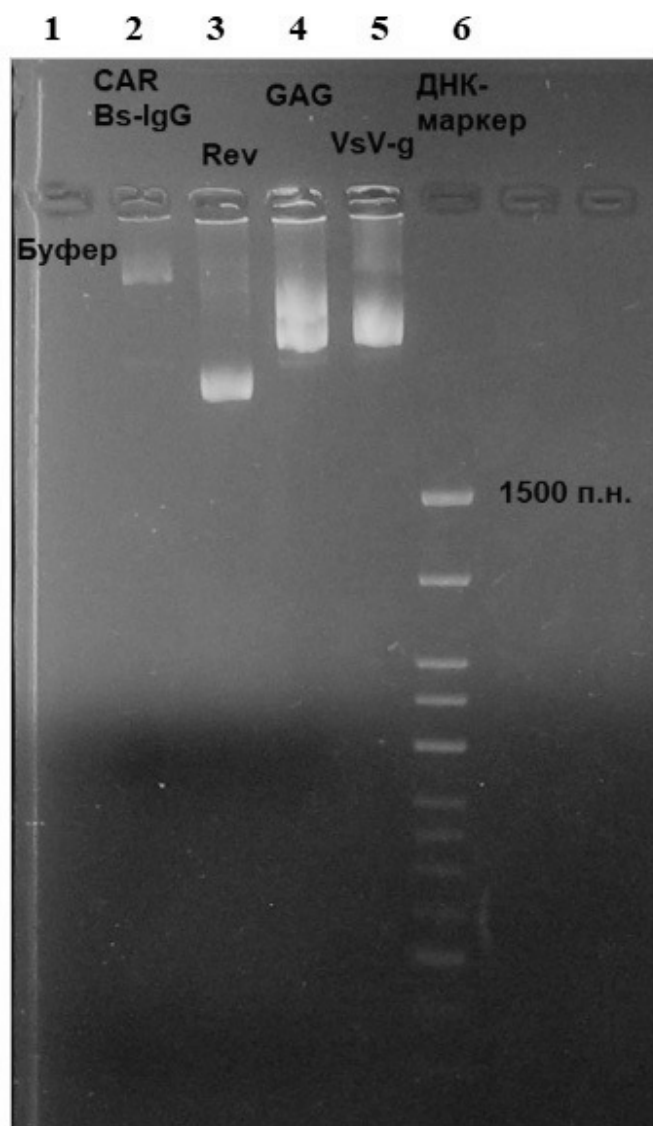


Рисунок 1 – Электрофореграмма препаратов плазмидных ДНК:  
 1 – буфер TE; 2 – плазида pLV-CART-Bs-IgG4; 3 – плазида pRSV-Rev;  
 4 – плазида pRRE-GAG; 5 – плазида pCMV-VSV-G; 6 – ДНК-маркер

При определении лентивирусных частиц в супернатанте использование ИХЛА показало хорошую сопоставимость с данными, полученными методом ИФА: коэффициент корреляции Спирмена составил 0,929, связь между исследуемыми признаками – прямая, зависимость признаков статистически значима ( $p=0,033$ ). Концентрация собранных лентивирусных частиц, определенная с помощью ИФА, – 12,2 [11,4; 17,4] нг/мл, после концентрирования максимальная концентрация – 108,9 нг/мл.

**Заключение.** В ходе проведенной работы отработана методика полупрепаративного выделения и очистки рекомбинантной ДНК с использованием набора

QIAGEN Plasmid Mini Kit (QIAGEN, США), обеспечивающая высокие выход и чистоту целевого продукта, а также эффективную трансфецирующую способность эукариотических клеток HEK293T.

Отработано получение лентивирусных частиц третьего поколения, несущих универсальный химерный антигенный рецептор с внеклеточным белком барстар. Получение лентивирусных частиц подтверждено методами иммуноферментного и иммунохемилюминисцентного анализов.

#### Список литературы

1. Апарцин Е.К. Методы доставки генетического материала в клетки и возможности их применения в генной терапии / Е.К. Апарцин, Н.Ю. Кнауэр // Гены и клетки. – 2016. – № 2.
2. Вирусные векторы для доставки генетического материала в клетку и их использование в нейробиологии (обзор) / Е.А. Епифанова, Е.В. Борисова, В.А. Салина, А.А. Бабаев. – DOI 10.17691/stm2017.9.1.21 // Современные технологии в медицине. – 2017. – Т. 9, № 1. – С. 162-174.
3. Получение CAR T-лимфоцитов, специфичных к CD19, и оценка их функциональной активности *in vitro* / А.В. Петухов, В.А. Маркова, Д.В. Моторин [и др.]. – DOI 10.21320/2500-2139-2018-11-1-1-9 // Клиническая онкогематология. – 2018. – Т. 11, № 1. – С. 1-9.
4. Сравнительный анализ эффективности общедоступных методов трансфекции модельных клеточных линий для задач биотехнологии / П.О. Воробьев, Д.В. Кочетков, К.В. Василенко, А.В. Липатова. – DOI 10.24075/vrgmu.2022.031 // Вестник РГМУ. – 2022. – № 3. – С. 11-19.
5. Шишкин А.М. Технологии иммунотерапии лимфоцитами с искусственными антигенными химерными рецепторами (CAR) в онкологии / А.М. Шишкин, А.В. Иванов, В.К. Боженко // Вестник РНЦРР. – 2016. – Т. 16, № 4.
6. Эффективная трансдукция Т-лимфоцитов лентивирусными частицами в онкоиммунологических исследованиях / Е.К. Зайкова, К.А. Левчук, Д.Ю. Поздняков [и др.]. – DOI 10.21320/2500-2139-2020-13-3-295-306 // Клиническая онкогематология. – 2020. – Т. 13, № 3. – С. 295-306.
7. A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system / T. Dull, R. Zufferey, M. Kelly [et al.] // J. Virol. – 1998. – N 72. – P. 8463-8471.
8. Comparative analysis of HIV-1-based lentiviral vectors bearing lyssavirus glycoproteins for neuronal gene transfer / T. Federici, R. Kutner, X.Y. Zhang [et al.]. – DOI 10.1186/1479-0556-7-1 // Genet Vaccines Ther. – 2009. – Vol. 7, N 1.

9. Fesnak A. Engineered T cells: the promise and challenges of cancer immunotherapy / A. Fesnak, C.H. June, B.L. Levine. – DOI 10.1038/nrc.2016.97 // *Nat Rev Cancer*. – 2016. – Vol. 16, N 9. – P. 566-581.
10. Insertional Transformation of Hematopoietic Cells by Self-inactivating Lentiviral and Gammaretroviral Vectors / U. Modlich, S. Navarro, D. Zychlinski [et al.]. – DOI 10.1038/mt.2009.179 // *Mol Ther*. – 2009. – Vol. 17, N 11. – P. 1919-1928.
11. Lim W. The Principles of Engineering Immune Cells to Treat Cancer / W. Lim, C. June. – DOI 10.1016/j.cell.2017.01.016 // *Cell*. – 2017. – Vol. 168, N 4. – P. 724-740.
12. Luskin M.R. Chimeric Antigen Receptor Therapy in Acute Lymphoblastic Leukemia Clinical Practice / M.R.Luskin, D.J. DeAngelo. – DOI 10.1007/s11899-017-0394-x // *Curr Hematol Malig Rep*. – 2017. – Vol. 12, N 4. – P. 370-379.
13. Sakuma T. Lentiviral vectors: basic to translational / T. Sakuma, M.A. Barry, Y. Ikeda // *Biochem. J*. – 2012. – N 443. – P. 603-618.
14. Verhoeven E. Surface-engineering of lentiviral vectors / E. Verhoeven, F.L. Cosset. – DOI 10.1002/jgm.494 // *J Gene Med*. – 2004. – Vol. 6, N S1. – P. 83-94.
15. Viral vectors: a look back and ahead on gene transfer technology / L. Vannucci, M. Lai, F. Chiappesi [et al.] // *New Microbiol*. – 2013. – Vol. 36, N 1. – P. 1-22.
16. Wanisch K. Integration-deficient lentiviral vectors: a slow coming of age / K. Wanisch, R.J. Yáñez-Muñoz. – DOI 10.1038/mt.2009.122 // *Mol Ther*. – 2009. – Vol. 17, N 8. – P. 1316-1332.
17. Zhang X.Y. Transduction of bonemarrow-derived mesenchymal stem cells by using lentivirus vectors pseudotyped with modified RD114 envelope glycoproteins / X.Y. Zhang, V.F. La Russa, J. Reiser. – DOI 10.1128/jvi.78.3.1219-1229.2004 // *J Virol*. – 2004. – Vol. 78, N 3. – P. 1219-1229.
18. Zhang X. Viral vectors for gene delivery in tissue engineering / X. Zhang, W. Godbey // *Adv. Drug Deliv. Rev*. – 2006. – N 58. – P. 515-534.

УДК: 616.419

ГРНТИ: 76.29.33

*М.В. Лагунова*

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», Киров  
врач-гематолог отделения химиотерапии и трансплантации костного мозга

*M.V. Lagunova*

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical and Biological Agency, Kirov  
Hematologist of the Department of Chemotherapy and Bone Marrow Transplantation  
E-mail: lagunovamv@niigpk.ru

*Н.А. Зорина*

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», Киров  
кандидат медицинских наук,  
заведующая отделением химиотерапии и трансплантации костного мозга

*N.A. Zorina*

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical and Biological Agency, Kirov  
Candidate of medical sciences  
Head of the Department of Chemotherapy and Bone Marrow Transplantation  
E-mail: zorina@niigpk.ru

*Н.В. Минаева*

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», Киров  
кандидат медицинских наук,  
заместитель директора по лечебной работе

*N.V. Minaeva*

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical and Biological Agency, Kirov

Candidate of medical sciences

Deputy Director for Medical Work

E-mail: mnvgm@gmail.com

*M.H. Khorobrykh*

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», Киров  
врач-гематолог отделения химиотерапии и трансплантации костного мозга

*M.N. Khorobrykh*

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical and Biological Agency, Kirov

Hematologist of the Department of Chemotherapy and Bone Marrow Transplantation

E-mail: horobryh@niigpk.ru

### **Сравнительный анализ токсичности режимов предтрансплантационной подготовки перед ауто-ТГСК при множественной миеломе**

### **Comparative analysis of the conditioning regimens before auto-HSCT in multiple myeloma. Own data**

*Аннотация:* в статье представлен сравнительный анализ режимов кондиционирования Mel200, Mel140 и BUMel на основании данных о 89 пациентах с множественной миеломой, получивших аутологичную трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток в ФБГУН КНИИГиПК ФМБА России с 2020 по 2022 гг. Установлено, что режим кондиционирования BUMel не ассоциирован увеличением частоты посттрансплантационных осложнений и может быть более эффективным у предлеченных, соматически сохранных пациентов с миеломой высокого риска, не достигших оптимального ответа на терапию перед трансплантацией.

*Abstract:* The article presents a comparative analysis of the conditioning regimens Mel200, Mel140 and BUMel based on data of 89 patients with multiple myeloma, who received autologous hematopoietic stem cell transplantation in our center from 2020 to 2022. It has been shown that

*the BUMel conditioning regimen is not associated with a higher frequency of posttransplantation complications and may be more effective in pretreated, high-risk somatically safe patients, who have not achieved an optimal response before transplantation.*

**Ключевые слова:** множественная миелома; режим кондиционирования; аутологичная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток; посттрансплантационные осложнения.

**Index terms:** multiple myeloma; conditioning regimen; autologous hematopoietic cells transplantation; post-transplant complications.

**Введение.** Высокодозная химиотерапия (ВДХТ) с последующей аутологичной трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток (ауто-ТГСК) – стандартная опция в алгоритме лечения пациентов множественной миеломой (ММ) [3]. Несмотря на внедрение в практику инновационных препаратов, проведение консолидации с использованием ауто-ТГСК связано с более высокой беспрогрессивной выживаемостью (БПВ) по сравнению с использованием новых агентов. Одним из важных вопросов предтрансплантационного периода является выбор режима кондиционирования (монотерапия мелфаланом или его комбинация с другими лекарственными препаратами). Проведение ВДХТ с последующей ауто-ТГСК может приводить к неблагоприятным последствиям: развитие инфекционных и неинфекционных осложнений, в т.ч., к летальному исходу.

Одним из самых масштабных исследований, посвященных этой теме, является CALM Study [7; 8; 9]. По данным этой работы, в ранний посттрансплантационный период у 79,9% пациентов выявлено хотя бы одно инфекционное осложнение, у 46,4% – неинфекционное, оба типа осложнений имели 26,3% пациентов. Трансплантационная летальность составила 0,7%. Обнаружена взаимосвязь между такими факторами, как Karnofsky Prognostic Score <80, недостижение ПР (полной ремиссии) после индукционной терапии, женский пол, и увеличением частоты развития осложнений. Корреляции с возрастом старше 65 лет и функцией почек не выявлено.

Непосредственное сравнение эффективности и токсичности мелфалан-содержащих режимов кондиционирования (бусульфан+мелфалан и мелфалан в монотерапии) провели Gao F. et al [6], изучив данные 10 многоцентровых исследований, включавших, в общей сложности, 2855 пациентов с ММ. Сравнительный анализ показал, что у пациентов, получавших кондиционирование по программе



BUMel (бусульфан+мелфалан), установлена корреляция с более длительной бес-прогрессивной выживаемостью (БПВ) (ОР 0,77; 95% ДИ 0,67~0,89, P = 0,0002), но сходной общей выживаемостью (ОВ) (ОР 1,08; 95% ДИ 0,92~1,26, P = 0,35), по сравнению с теми, кто получал HDMEl (высокодозный мелфалан). Различия в наилучшем достигнутом ответе после ауто-ТГСК и времени до приживания нейтрофилов или тромбоцитов не имели статистической значимости между двумя группами пациентов. Пациенты, получившие BUMel, реже демонстрировали желудочно-кишечную токсичность, в то время как в группе HDMEl отмечена меньшая подверженность мукозиту и инфекционным осложнениям. Существенной разницы в частоте развития печеночной токсичности не выявлено.

**Цель** — провести сравнительный анализ режимов кондиционирования с оценкой токсичности, ОВ и БПВ у больных с ММ.

**Материалы и методы.** Выполнен ретроспективный анализ данных 89 пациентов с ММ, находившихся на лечении в ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России с 2020 по 2022 гг., которым была проведена ВДХТ по программе Mel200 (мелфалан 200 мг/м<sup>2</sup>), Mel140 (мелфалан 140 мг/м<sup>2</sup>) и BUMel (бусульфан 12 мг/кг, Мелфалан 140 мг/м<sup>2</sup>) с последующей ауто-ТГСК.

Проведено сравнение групп пациентов, получивших разные режимы кондиционирования, по частоте развития инфекционных и неинфекционных осложнений, степени их тяжести, длительности ОВ и БПВ, в том числе, с использованием ответ-адаптированного подхода, основанного на дифференцировке пациентов внутри групп в соответствии со статусом заболевания до ТГСК. Оценка статуса заболевания в посттрансплантационном периоде не проводилась.

Пациенты были распределены на 3 группы в зависимости от режима кондиционирования. Основные демографические характеристики, статус заболевания до ТГСК представлены в Таблице 1: соотношение по полу во всех группах сопоставимое – 1:1, время до ТГСК – 14 месяцев. Высокий риск по заболеванию определялся при наличии по крайней мере одного из следующих критериев: экстремедулярное поражение, R-ISS III, высокий генетический риск по M-SMART 3.0. Стандартный риск — при отсутствии экстремедулярных поражений, R-ISS I и II, стандартном генетическом риске. У остальных пациентов категории риска не определялась, вследствие отсутствия данных на этапе первичной диагностики, проведенной в других медицинских учреждениях.

Таблица 1 - Характеристика пациентов с множественной миеломой в зависимости от режима кондиционирования

Характеристики пациентов/ количество пациентов	Режим кондиционирования			P-value
	Mel200	Mel140	BUMel	
Общее количество	46	24	19	-
Мужчины	21 (45,65%)	13 (54,17%)	10 (52,63%)	0,53
Женщины	25 (54,35%)	11 (45,83%)	9 (47,37%)	
Медиана возраста	56,5	59,5	49	
Пациенты 65 $\geq$	2 (4,35%)	6 (25,00%)	1 (5,26%)	0,018
Риск				
Высокий	4 (8,70%)	6 (25,00%)	5 (26,32%)	0,29
Стандартный	9 (19,57%)	5 (20,83%)	4 (21,05%)	
Неизвестный	33 (71,74%)	13 (54,17%)	10 (52,63%)	
Предлеченность (более 2 линий терапии до аутоТГСК)	9 (19,57%)	2 (8,33%)	9 (47,37%)	0,0077
Первичная резистентность	10 (21,74%)	5 (20,83%)	9 (47,37%)	0,077
Статус до аутоТГСК				
ОХЧР* и ПР	39 (84,78%)	23 (95,83%)	11 (57,89%)	0,0044
ЧР*	7 (15,22%)	1 (4,17%)	8 (42,11%)	
Среднее время от постановки диагноза до аутоТГСК (мес.)	14,5	15,03	16,96	
Среднее время от афереза до аутоТГСК (мес.)*	4,96	4,65	4,33	
Медиана CD34+ клеток	6,4	5,29	5,6	

\*ОХЧР — очень хорошая частичная ремиссия, ПР – полная ремиссия, ЧР — частичная ремиссия.

В группе пациентов, получавших кондиционирование по программе Mel200, медиана возраста составила 56,5 лет. Частота высокого риска – 8,7% (4), стандартного – 19,57% (9), неизвестного – 71,74% (33). Количество пациентов, получивших более 2 линий терапии до ауто-ТГСК, составило 9 (19,57%), пациентов с первичной резистентностью – 5 (20,83%). Статус заболевания перед проведением ауто-ТГСК очень хорошая частичная ремиссия (ОХЧР) и полная ремиссия (ПР) констатирован у 39 (84,78%) пациентов, ЧР — у 7 (15,22%).

Среди пациентов 2 группы, для которых был выбран режим кондиционирования Mel140, медиана возраста — 59,5 лет, количество пациентов 65 лет и старше — 6 (25%). Все пациенты в этой группе – с высокой коморбидностью, проме-

жуточного риска по шкале НСТ-СІ. К высокому риску по заболеванию отнесены 6 (25%) пациентов, стандартного – 5 (20,83%), неустановленного – 13 (54,17%). Предлеченность в этой группе наименьшая – 8,33% (2) случаев, первичная резистентность — 20,83% (5). Статус заболевания до ТГСК ОХЧР и ПР достигнут в 95,83% (23) случаев.

Пациенты, получившие режим кондиционирования BUMel, отнесены к третьей группе. Медиана возраста – 49 лет. Распределение рисков следующее: 26,32% (5) — 21,05% (4) — 52,63% (10) для высокого, стандартного и неустановленного, соответственно. У пациентов этой группы статистически значимо выше предлеченность 47,37% (9) ( $p=0,0077$ ). Ответ на терапию был значимо хуже, чем у пациентов других групп – уровень достижения ОХЧР и ПР 57,89% (11) против 84% и 95% в других группах ( $p=0,0044$ ).

Протокол Mel200 (мелфалан 200 мг/м<sup>2</sup>) использовался в качестве стандартного режима кондиционирования для пациентов с сохранным соматическим статусом (группа низкого риска по шкале НСТ-СІ), Mel140 (мелфалан 140 мг/м<sup>2</sup>) – для «хрупких» пациентов, BUMel (бусульфан 12 мг/кг + мелфалан 140 мг/м<sup>2</sup>) – для соматически сохранных пациентов молодого возраста (медиана 59,5 лет) высокого риска с более высокой предлеченностью и худшим ответом на терапию.

Статистическая значимость различий определялась по методу Хи-квадрат, уровень значимости  $p=0,017$  с учетом поправки Бонферрони. Для определения длительности ОВ и БПВ построены кривые Каплана-Мейера.

### **Результаты исследования**

Посттрансплантационные осложнения представлены в Таблице 2. Установлено, что степень тяжести мукозита и энтеропатии (2 и более степень) в группе BUMel выше ( $p=0,0003$  и  $p=0,007$ , соответственно), чем в других. Статистически значимой разницы в частоте встречаемости инфекционных осложнений, в том числе тяжелых, при выполнении разных режимов кондиционирования не получено ( $p=0,76$ ). Прослеживалась тенденция к увеличению числа катетер-ассоциированных инфекций и инфекций мягких тканей в группе BUMel.

Сроки восстановления показателей периферической крови, потребность в заместительной гемотрансфузионной терапии и применении Г-КСФ у пациентов разных групп не различались. Статистически значимой разницы в длительности

госпитализации не получено. Однако у пациентов из группы BUMel она составила, в среднем, 27 дней, что могло быть связано с большей продолжительностью режима кондиционирования (таблица 2).

Таблица 2 - Посттрансплантационные осложнения после ауто-ТГСК у больных множественной миеломой

Посттрансплантационные осложнения/ количество пациентов	Режим кондиционирования			P-value
	Mel200	Mel140	BUMel	
<b>Инфекционные осложнения</b>				
Фебрильная нейтропения	28 (60,87%)	14 (58,33%)	13 (68,42%)	0,78
Сепсис	5 (10,87%)	2 (8,33%)	1 (5,26%)	0,76
Синусит	3 (6,52%)	0	1 (5,26%)	0,45
Пневмония	3 (6,52%)	0	1 (5,26%)	0,45
Инфекция мягких тканей	0	0	2 (10,53%)	0,023
Катетер-ассоциированная инфекция	0	0	1 (5,26%)	0,15
Клостридиальный колит	4 (8,70%)	0	0	0,14
Использование системных антибиотиков	45 (97,83%)	20 (83,33%)	18 (94,74%)	0,07
Использование антибиотиков резерва	15 (33,33%)	2 (10,00%)	7 (38,89%)	0,05
Введение Г-КСФ	43 (93,48%)	24 (100,00%)	18 (94,74%)	0,45
<b>Неинфекционные осложнения</b>				
Мукозит	45 (97,83%)	24 (100%)	18 (94,74%)	0,51
>= 2 степени	5 (11,11%)	0	8 (44,44%)	0,0003
Токсический дерматит	0	0	0	
>= 2 степени	0	0	0	
Энтеропатия	25 (54,35%)	9 (37,50%)	8 (42,11%)	0,35
>= 2 степени	5 (20,00%)	1 (11,11%)	4 (50,00%)	0,0070
Токсический гепатит	7 (15,22%)	1 (4,17%)	1 (5,26%)	0,25
>= 2 степени	4 (57,14%)	0	0	0,14
Токсическая нефропатия	0	0	0	
>= 2 степени	0	0	0	
Токсический панкреатит	11 (23,91%)	4 (16,67%)	2 (10,53%)	0,43
>= 2 степени	100%	100%	100%	
Другие неинфекционные осложнения	3 (9,68%)	3 (12,50%)	3 (15,79%)	0,48
<b>Показатели восстановления</b>				
Медиана койко-дней	25	22,5	27	0,104

Медиана дней до восстановления лейкоцитов	13	13	13	
Медиана дней до восстановления тромбоцитов	12,5	13	12	
Потребность в трансфузиях ФЭВ	8 (17,39%)	2 (8,33%)	6 (31,58%)	0,14
Потребность в трансфузиях КТ	38 (82,61%)	17 (70,83%)	10 (52,63%)	0,045

Характеристика рецидивов представлена в Таблице 3. У больных из группы Mel200 частота развития рецидивов – 13%, медиана времени до рецидива – 18,4 мес. У пациентов группы Mel140 рецидив зафиксирован в 29% случаев; медиана времени до рецидива составила 15,2 мес. Частота рецидивирования в группе BUMel составила 26% и сопоставима с частотой рецидива в других группах ( $p=0,21$ ), а медиана времени до рецидива 9,5 мес.

Таблица 3 - Характеристики рецидивов после ауто-ТГСК с применением различных режимов кондиционирования.

Характеристики рецидивов / Количество пациентов	Режим кондиционирования			P-value
	Mel200	Mel140	BUMel	
Частота рецидива после ауто-ТГСК	6 (13%)	7 (29%)	5 (26%)	0,21
Медиана времени до рецидива (мес.)	18,4	15,2	9,5	
Смертность	2 (4,35%)	5 (20,83%)	4 (21,05%)	0,059

По предварительным данным, прослеживается тенденция к увеличению БПВ у пациентов с частичной ремиссией (ЧР) перед ауто-ТГСК по сравнению с пациентами группы Mel200/140.

## Выводы

Интенсификация режима кондиционирования с применением бусульфана в протоколе BUMel не влияет на тяжесть и частоту инфекционных осложнений в раннем посттрансплантационном периоде.

У пациентов группы BUMel чаще развивались более тяжелые гастроинтестинальные неинфекционные осложнения, такие, как мукозит ( $p=0,0003$ ) и энтеропатия ( $p=0,007$ ).

Режим кондиционирования BUMel может оказаться более эффективным и

не менее безопасным для предлеченных, соматически сохранных молодых пациентов, наилучший ответ которых до ТГСК – ЧР.

Риск-адаптированный подход к выбору режима предтрансплантационной подготовки с учетом молекулярно-генетических особенностей ММ, коморбидности пациента могут способствовать снижению связанной с трансплантацией летальности, уменьшению осложнений терапии и повышению показателей ОВ и БПВ, что в конечном итоге приведет к улучшению качества жизни пациентов.

### Список литературы

1. Волошин С.В., Гарифуллин А.Д., Кузьева А.А. [и др.] Эффективность и безопасность аутологичной трансплантации некриоконсервированных гемопоэтических стволовых клеток у больных множественной миеломой. Онкогематология 2022;17(2):82–94. DOI: 10.17650/1818-8346-2022-17-2-82-94.
2. Рубрикатор клинических рекомендаций: официальный сайт. – Множественная миелома, 2020. – URL: [https://cr.minzdrav.gov.ru/recommend/144\\_1](https://cr.minzdrav.gov.ru/recommend/144_1) (дата обращения 10.05.2023).
3. Amini S., Hadjibabaie M., Jahangard-Rafsanjani Z. [et al.] Evaluation of febrile neutropenia in patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation. Acta Med Iran. 2014;52:38-42.
4. Celebi H., Akan H., Akcaglayan E. [et al.] Febrile neutropenia in allogeneic and autologous peripheral blood stem cell transplantation and conventional chemotherapy for malignancies. Bone Marrow Transplant. 2000; 26:211-214.
5. Dhakal B, Szabo A, Chhabra S, Hamadani M, D'Souza A, Usmani SZ, Sieracki R, Gyawali B, Jackson JL, Asimakopoulos F, Hari PN. Autologous Transplantation for Newly Diagnosed Multiple Myeloma in the Era of Novel Agent Induction: A Systematic Review and Meta-analysis. JAMA Oncol. 2018 Mar 1;4(3):343-350.
6. Gao F., Lin M.S., You J.S. [et al.] Long-term outcomes of busulfan plus melphalan-based versus melphalan 200 mg/m<sup>2</sup> conditioning regimens for autologous hematopoietic stem cell transplantation in patients with multiple myeloma: a systematic review and meta-analysis. Cancer Cell Int. 2021 Nov 10;21(1):601.
7. Rahman S., Rybicki L., Ky Hamilton B. [et al.] Early infectious complications after autologous hematopoietic cell transplantation for multiple myeloma. Transpl Infect Dis. 2019 Aug;21(4):e13114. Epub 2019 Jun 1.
8. Waszczuk-Gajda A., Penack O., Sbianchi G. [et al.] Complications of Autologous Stem Cell Transplantation in Multiple Myeloma: Results from the CALM Study. J Clin Med. 2022 Jun 20;11(12):3541.

9. Waszczuk-Gajda A., Drozd-Sokołowska J., Basak G.W. [et al.]. Infectious Complications in Patients With Multiple Myeloma After High-Dose Chemotherapy Followed by Autologous Stem Cell Transplant: Nationwide Study of the Infectious Complications Study Group of the Polish Adult Leukemia Group. *Transplant Proc.* 2020 Sep;52(7):2178-2185.

УДК 616.411-006.441

ГРНТИ 76.29.33

*М.С. Минаев*

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», Киров  
младший научный сотрудник лаборатории патоморфологии

*M.S. Minaev*

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agency,  
Kirov

Junior Researcher of the Laboratory of Pathomorphology

E-mail: [minaev@niigpk.ru](mailto:minaev@niigpk.ru)

*Е.А. Перфилова*

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», Киров  
кандидат ветеринарных наук, научный сотрудник лаборатории патоморфологии

*E.A. Perfilova*

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agency,  
Kirov

Candidate of Veterinary Sciences, Researcher of the Laboratory of Pathomorphology

E-mail: [perfilova@niigpk.ru](mailto:perfilova@niigpk.ru)

*Е.В. Ванеева*

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови

Федерального медико-биологического агентства», Киров  
кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории патоморфологии

*E.V. Vaneeva*

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of  
Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agency,

Kirov

Candidate of Biological Sciences, Researcher of the Laboratory of Pathomorphology

E-mail: vaneeva@niigpk.ru

*Н.В. Глубоковских*

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский  
научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови

Федерального медико-биологического агентства», Киров  
лаборант-исследователь лаборатории патоморфологии

*N.V. Glubkovskikh*

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of  
Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agency,

Kirov

Laboratory Research Assistant of the Laboratory of Pathomorphology

E-mail: mazda\_n@mail.ru

*Д.А. Дьяконов*

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский  
научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови

Федерального медико-биологического агентства», Киров  
кандидат медицинских наук, заведующий лабораторией патоморфологии

*D.A. Dyakonov*

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of  
Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agency,

Kirov

Candidate of Medical Sciences, Head of the Laboratory of Pathomorphology

E-mail: dyakonov@niigpk.ru



## Гистопатологические особенности и прогностическое значение Т- и В-клеток опухолевого микроокружения при нодулярном склерозе классической лимфомы Ходжкина

### Histopathological features and prognostic value of T- and B-cells of the tumor microenvironment in nodular sclerosis of classical Hodgkin lymphoma

*Аннотация.* Классическая лимфома Ходжкина – клональное В-клеточное онкогематологическое заболевание, развивающееся преимущественно в молодом возрасте. Одной из актуальных проблем является поиск новых факторов прогноза течения данной патологии. К их числу относят опухоль-ассоциированное микроокружение, в частности В- и Т-клетки. Однако их роль в прогнозе течения заболевания остается неопределенной. В работе представлены данные о гистопатологических характеристиках и прогностическом значении В- и Т-клеток опухолевого микроокружения при нодулярном склерозе классической лимфомы Ходжкина.

*Abstract.* Classical Hodgkin lymphoma is a clonal B-cell oncohematological disease that develops predominantly at a young age. The most urgent issue is the search for new factors for predicting the course of this pathology. These factors include the tumor-associated microenvironment, like B- and T-cells. However, their role in the prognosis of the disease remains uncertain. This research presents data on the histopathological characteristics and prognostic value of B- and T-cells of the tumor microenvironment in nodular sclerosis of classical Hodgkin lymphoma.

*Ключевые слова:* классическая лимфома Ходжкина; нодулярный склероз; прогноз; В-лимфоциты Т-клетки.

*Index terms:* classical Hodgkin lymphoma; nodular sclerosis; prognosis; B-lymphocytes; T-cells.

**Введение.** Лимфома Ходжкина (ЛХ) – В-клеточное лимфопролиферативное заболевание с уникальными гистологическими, иммунофенотипическими и клиническими особенностями [7,16,17]. Заболевание считается потенциально излечимым при применении передовых схем лечения, однако в 10-30% случаев развиваются резистентные/рецидивирующие формы. Как следствие – необходимость выполнения аутологичной или аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ауто-/аллоТГСК). Это связано с биологическим поведением ЛХ, которое отличается в каждом индивидуальном случае. Для оценки характера течения заболевания и поиска новых терапевтических мишеней ведутся исследования по изучению роли опухолевого микроокружения [19]. Нодулярный склероз

– наиболее часто встречающийся гистологический вариант кЛХ, который характеризуется уникальной гистоархитектоникой с образованием фиброзных тяжей, формирующих так называемые «нодули». Морфологический субстрат в подавляющем большинстве представлен полиморфным клеточным микроокружением, а относительное содержание опухолевых клеток Ходжкина и Березовского-Рид-Штернберга составляет не более 10% от всей клеточной массы [6,7,16,17]. Наиболее распространенными клеточными популяциями в опухолевом микроокружении нодулярного склероза кЛХ являются В- и Т-клетки. Основными их представителями являются CD20<sup>+</sup> В-лимфоциты, регуляторные CD4-позитивные Т-хелперы и CD8-позитивные цитотоксические Т-клетки.

Принципиально новые решения проблемы дает изучение роли В-лимфоцитов в микроокружении ЛХ [5]. Согласно источникам, на долю «внутриопухолевых» В-клеток приходится около 16% от всех клеток микроокружения кЛХ, но их относительное содержание варьируется от случая к случаю [4]. Современные исследователи сходятся во мнении, что высокое относительное содержание В-клеток является важным предиктивным фактором при онкогематологических заболеваниях [14, 18]. В ряде исследований установлена связь высокого относительного количества CD20<sup>+</sup> клеток опухолевого микроокружения с благоприятным течением кЛХ и лучшей выживаемостью больных после первой линии по протоколу BEACOPP [8, 11]. Однако имеются результаты работ, противоречащие отмеченным выше. Опухоль-ассоциированные лимфоциты в отдельных случаях могут приобретать проонкогенные свойства [12, 18]. Благодаря способности опухолевых клеток «рекрутировать» клеточные элементы микроокружения при кЛХ, формируется один из наиболее грозных механизмов резистентности – эвазия иммунологического надзора и апоптоза [5]. Так, P.Greaves с соавт. продемонстрировали, что высокая плотность нефолликулярных CD20<sup>+</sup> клеток у больных кЛХ связана со снижением показателей выживаемости и неудачами лечения [10].

Роль Т-клеточной популяции в патогенезе кЛХ четко определена, однако предметом многочисленных дискуссий является оценка прогностического значения относительного содержания их субпопуляций в лимфатических узлах при кЛХ [2, 9, 15]. CD4<sup>+</sup> Т-хелперы обнаруживают пептидные антигены в молекулах МНС класса II (МНС-II) и управляют адаптивным звеном иммунного ответа, продуцируя цитокины и хемокины, которые играют провоспалительную либо регуляторную роль [1, 13]. CD8<sup>+</sup> участвуют в обнаружении антигена, представ-

ленного комплексом МНС класса I (МНС-I), и вызывают литические реакции, которые непосредственно уничтожают опухолевые или инфицированные вирусом клетки [3].

Прогностическое значение Т- и В-клеток реактивного микроокружения при кЛХ изучено недостаточно. Количественная оценка указанных клеточных популяций позволит расширить представление об ассоциации опухолеассоциированных клеток микроокружения с характером течения данной нозологии.

**Цель.** Оценить гистопатологические особенности и прогностическое значение CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток, а также CD20<sup>+</sup> лимфоцитов опухолевого микроокружения в лимфатических узлах при нодулярном склерозе кЛХ.

**Материалы и методы.** В ретроспективном исследовании использованы архивные образцы (парафиновые блоки) лимфатических узлов 70 пациентов с впервые установленным диагнозом кЛХ, нодулярный склероз (NSCHL). Больные, включенные в исследование, наблюдались в клинике ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России в период с 2006 по 2020 гг. Медиана возраста – 35 лет (Q1-Q3; 28-44 лет) (таблица 1).

Таблица 1 – Характеристика пациентов с нодулярным склерозом классической лимфомы Ходжкина

<b>Клинические характеристики</b>	<b>Количество пациентов, абс. (%)</b>
<b>Пол:</b>	
мужчины	34 (48,6%)
женщины	36 (51,4%)
<b>Стадия заболевания:</b>	
I	2 (2,9%)
II	31 (44,3%)
III	19 (27,1%)
IV	18 (25,7%)
<b>В-симптомы:</b>	
нет	38 (54,3%)
есть	32 (45,7%)
<b>Стадия (в зависимости от общей опухолевой массы и наличия В-симптомов):</b>	
Локализованная (I-IIA)	24 (34,3%)
Распространенная (IIB-IV)	46 (65,7%)

<b>Протокол химиотерапии I линии:</b>	
ABVD	10 (14,3%)
BEACOPP (в т.ч. его модификации)	60 (85,7%)
<b>Ответ на I линию терапии:</b>	
достигнут	39 (55,7%)
не достигнут	31 (44,3%)

Для идентификации исследуемых популяций клеток использован иммуногистохимический метод окрашивания по стандартной методике. Иммуноспецифичность моноклональных антител CD4 (клон 4B12, «Dako»), CD8 (клон C8/144B, «Dako»), CD20 (клон L26, «Dako») выявлялась с помощью вторичного антитела, конъюгированного с пероксидазой хрена, входящей в набор реактивов EnVISION+ («Dako»). Морфологическая оценка и подсчет относительного числа CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> и CD20<sup>+</sup> клеток проводился при помощи светового микроскопа «Leica DM 1000» (Германия) со встроенной фотовидеокамерой и программы анализа изображений ImageScore Color, версии M, с окулярами x10, при объективе x100.

Морфометрическую оценку относительного содержания клеток микроокружения, экспрессирующих CD4, CD8 и CD20, выполняли на световом микроскопе «AxioScore.A1» со встроенной фотовидеокамерой и программным обеспечением анализа изображений (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Германия). Оценивали 10/20 полей зрения в каждом образце с применением окуляров x10 и объектива x100. Исходя из полученных результатов, вычисляли среднее относительное содержание CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> и CD20<sup>+</sup> клеток микроокружения в исследуемом материале.

Полученные данные оценивались с применением аналитической программной платформы для статистического анализа IBM SPSS Statistics 26 (разработчик - «SPSS: An IBM Company», США) и программы автоматизированного статистического анализа StatTech v3.1 (разработчик - ООО «СТАТТЕХ», Россия).

Алгоритм разведочного анализа включал в себя определение общепринятых среднеарифметических величин, медианы (Me) с интерквартильным размахом [Q<sub>1</sub> - Q<sub>3</sub>]. Каждая из сравниваемых совокупностей оценивалась на предмет ее соответствия закону нормального распределения, для этого использовался критерий Колмогорова-Смирнова, рекомендуемый при числе исследуемых более 60. Оптимальный порог уровня экспрессии маркеров CD4, CD8, CD20 в клетках опухолевого микроокружения вычислялся с помощью метода ROC-анализа, используемого для представления результатов бинарной классификации, который

позволяет оценить качество (диагностическую эффективность) прогностической модели, а также найти оптимальное значение порога классификации (точка «cut-off»). Группирующей переменной являлся ответ на лечение (полная ремиссия после I линии терапии или отсутствие таковой). Оценку частоты встречаемости дифференцированной экспрессии маркера с клиническими характеристиками больных осуществляли с помощью критерия хи-квадрат ( $\chi^2$ ) Пирсона с расчетом значений отношения шансов (OR) и 95% доверительного интервала (CI 95%). В случае числа ожидаемых частот менее 5 применяли точный двусторонний критерий Фишера (F). Пятилетнюю общую (ОВ) и бессобытийную (БСВ) выживаемость рассчитывали по методу Каплана-Мейера с графическим построением соответствующих кривых (log-rank test). Показатели считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

**Результаты исследования.** Экспрессия маркера CD4 в Т-клетках опухолевого микроокружения выявлена в 63 из 70 исследуемых образцов (90%). В исследуемой популяции клеток наблюдался мембранный характер окрашивания. В результате изучения в гистологических срезах лимфатических узлов CD4<sup>+</sup> клеток определены незначительные различия их относительного количества. Так, доля CD4<sup>+</sup> клеток варьировала в пределах от 0% до 21,6%. Медиана экспрессии при этом соответствовала 9,9% [Q1-Q3: 8,3-12,3] (рисунок 1).

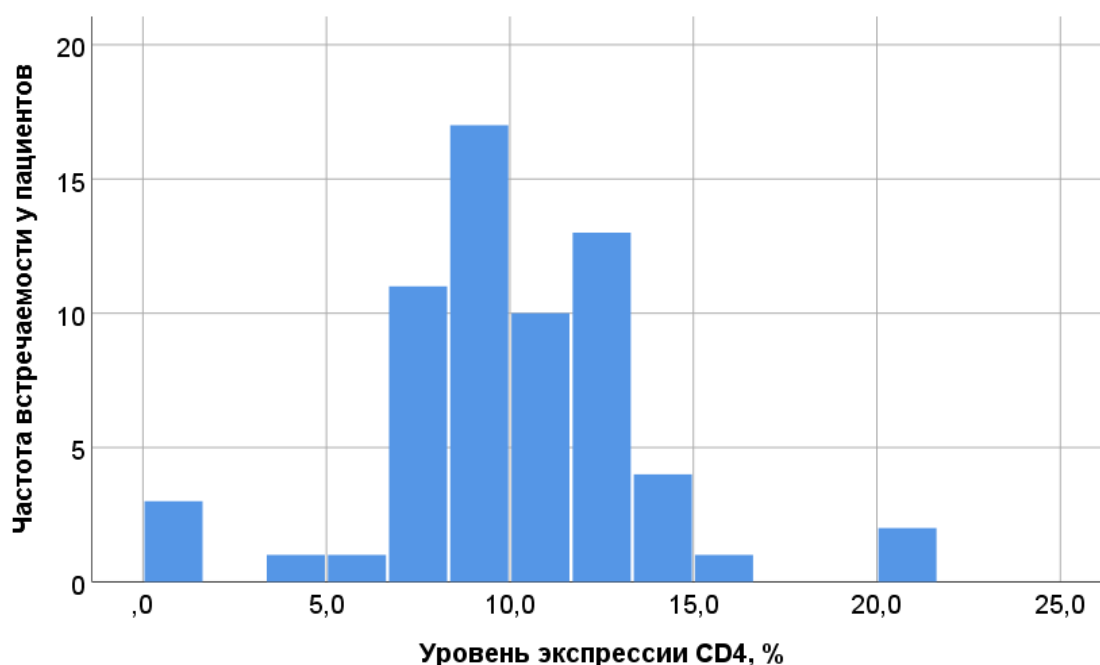


Рисунок 1 – Распределение пациентов по относительному содержанию CD4<sup>+</sup> клеток

Гистотопографических особенностей CD4<sup>+</sup> клеток в срезе не выявлено.

Изученная популяция Т-лимфоцитов встречалась в виде скоплений разной величины и формы либо в виде дискретно лежащих по всему срезу клеток. В отдельных случаях обнаруживались гистологические паттерны по типу розеткообразных структур вокруг опухолевых клеток (рисунок 2).

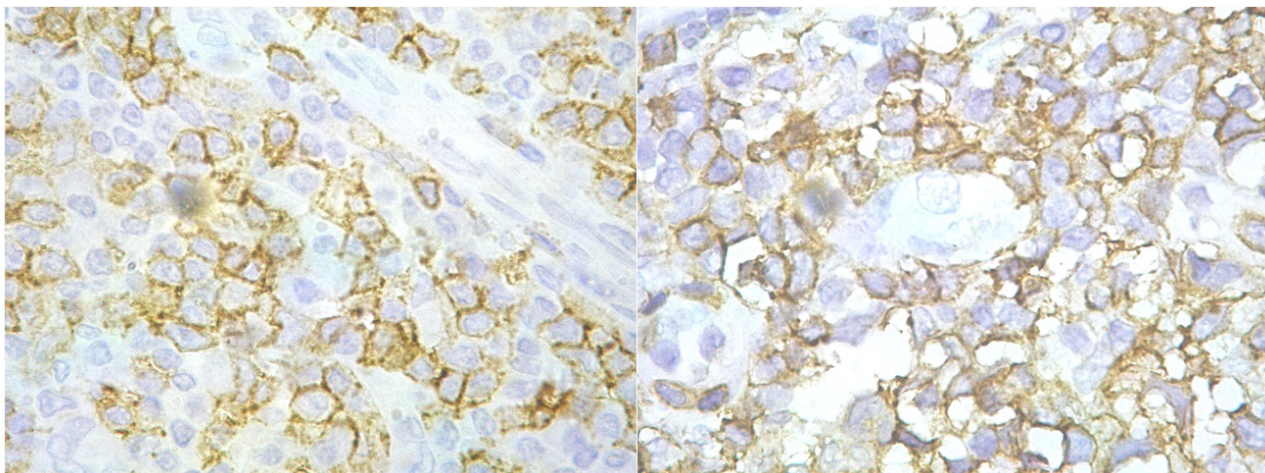


Рисунок 2 – Гистологический препарат лимфатического узла. Розеткообразное расположение  $CD4^+$  в лимфатических узлах. Окраска: иммуногистохимическая реакция с антителом к маркеру CD4 (клон 4B12, «Дако»),  $\times 1000$

Для определения оптимального порогового уровня относительного содержания  $CD4^+$  клеток опухолевого микроокружения, позволяющего наиболее точно стратифицировать больных в прогностические группы, провели ROC-анализ (рисунок 3).

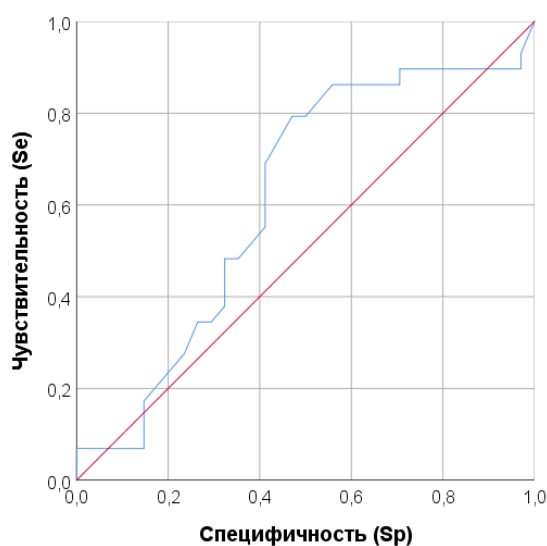


Рисунок 3 – ROC-кривая для  $CD4^+$  клеток

Из рисунка 3 следует, что точкой «cut-off» относительного количества исследованного маркера допустимо считать показатель, равный 8,9%. При чувствительности - 0,862 (86,2%) и специфичности - 0,559 (44,1%), AUC под ROC-кривой составила  $0,613 \pm 0,073$ , (95% CI: 0,470-0,756), однако модель не подтверждает свою значимость в данной когорте больных ( $p=0,123$ ). С учетом полученных данных взаимосвязи относительного содержания CD4<sup>+</sup> клеток с ответом на I линию терапии не установлено.

Экспрессия маркера CD8 в Т-клетках опухолевого микроокружения выявлена в 90% исследуемых образцов ( $n=63$ ). В исследуемой популяции клеток окрашивалась клеточная мембрана. В результате изучения в гистологических срезах лимфатических узлов CD8<sup>+</sup> клеток определены различия их относительного количества. Так, доля CD8<sup>+</sup> клеток варьировала в пределах от 3,4% до 26,7%. Ме экспрессии при этом соответствовала 10,6% [Q1-Q3: 7,8-14,3] (рисунок 4).

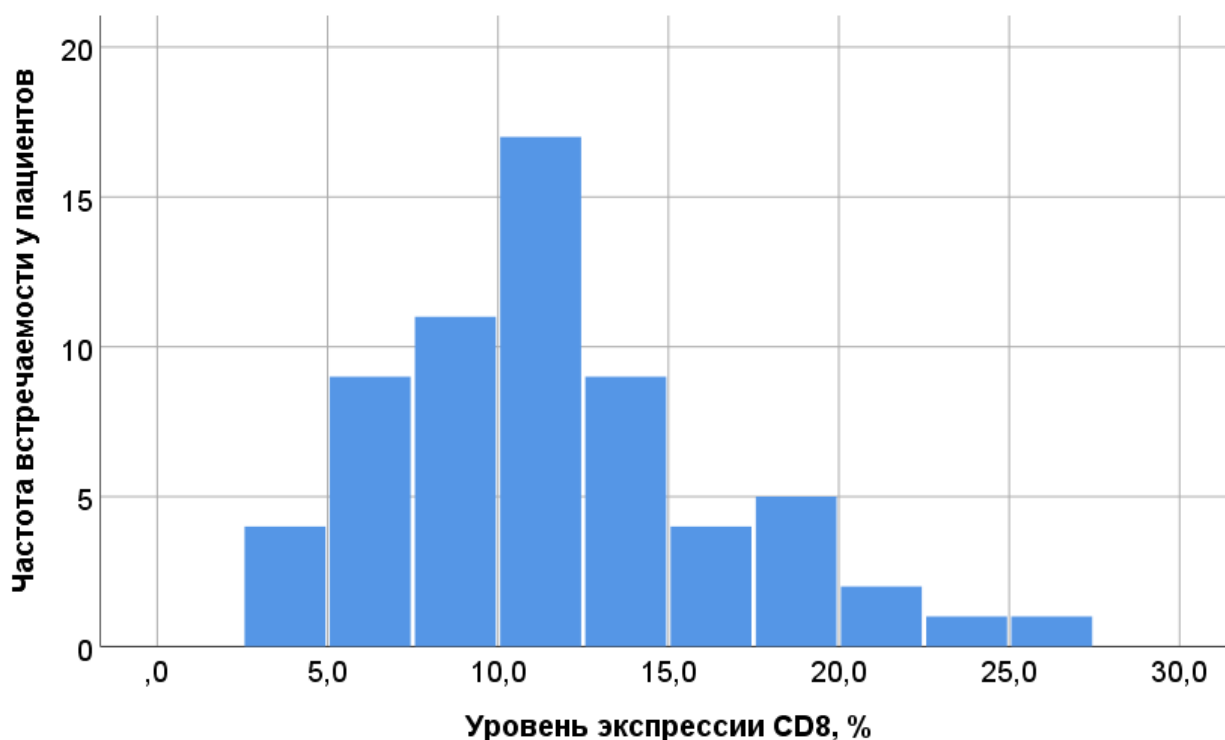


Рисунок 4 – Распределение пациентов по относительному содержанию CD8<sup>+</sup> клеток

Гистотопографических особенностей CD8<sup>+</sup> клеток в срезе не выявлено. Изученная популяция Т-лимфоцитов встречалась в виде скоплений разной величины и формы, либо в виде отдельно лежащих по всему срезу клеток (рисунок 5).

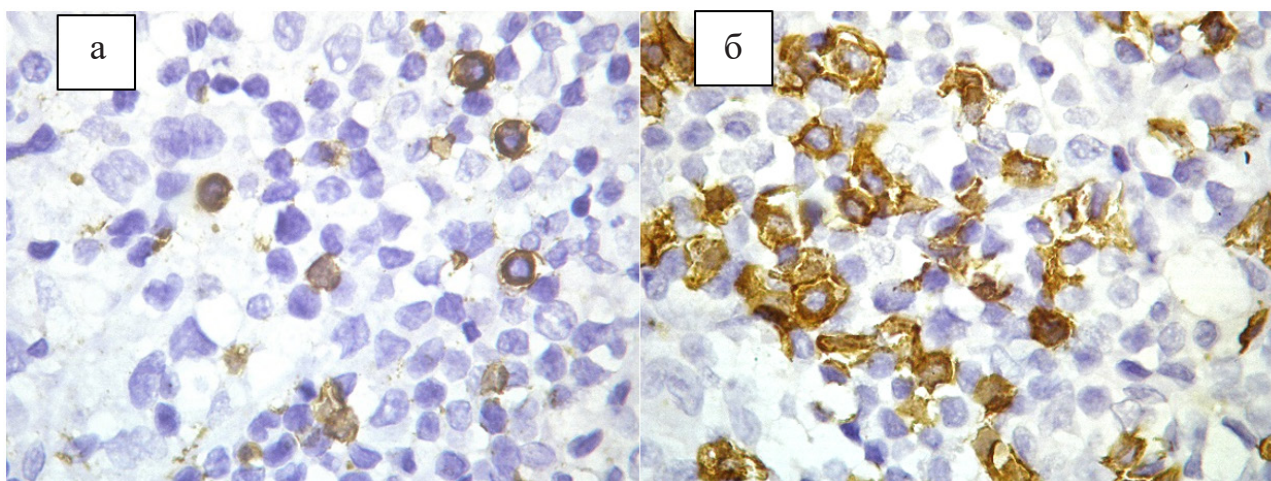


Рисунок 5 – Гистологический препарат лимфатического узла. Распределение  $CD8^+$  в лимфатических узлах с высокой (а) и низкой (б) экспрессией маркера. Окраска: иммуногистохимическая реакция с антителом к антигену CD8 (клон C8/144В, «Dako»),  $\times 1000$

Для определения оптимального порогового уровня относительного содержания  $CD8^+$  клеток опухолевого микроокружения провели ROC-анализ (рисунок 6).

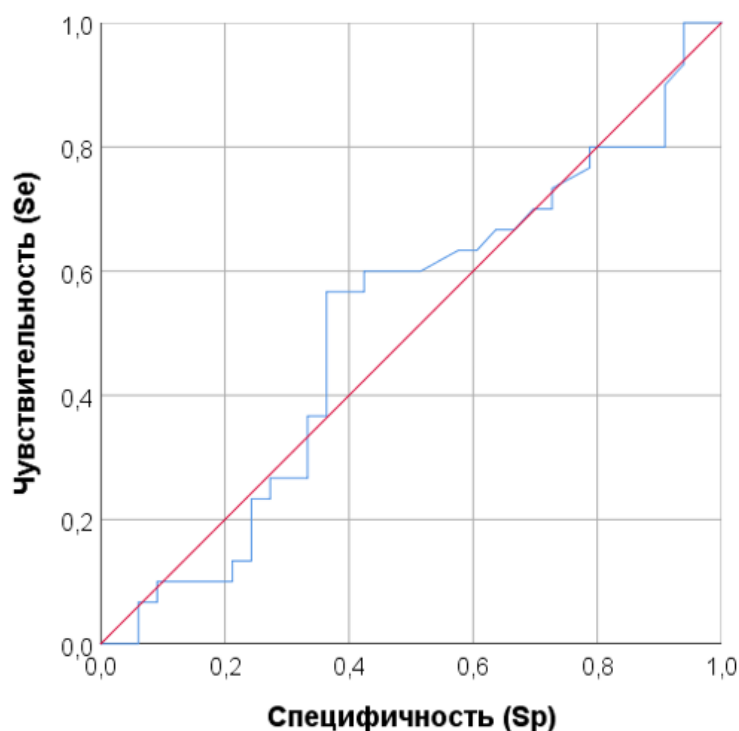


Рисунок 6 – ROC-кривая для  $CD8^+$  клеток



Из рисунка 6 следует, что точкой «cut-off» относительного количества исследованного маркера можно рассматривать показатель равный 10,5%. При чувствительности - 0,6 (60,0%) и специфичности - 0,445 (54,5%) AUC под ROC-кривой составила  $0,511 \pm 0,074$ , (95% CI: 0,470-0,756), однако модель не подтверждает свою значимость в данной когорте больных ( $p=0,885$ ). С учетом полученных данных, взаимосвязи относительного содержания CD8<sup>+</sup> клеток с ответом на I линию терапии не установлено.

Экспрессия биомаркера CD20 выявлена в 100% случаев ( $n=70$ ). Во всех образцах наблюдалась мембранно-цитоплазматическая экспрессия белка. Относительное количество CD20<sup>+</sup> клеток в биоптатах было неодинаковым и варьировало в пределах от 1,0% до 28,4%, медиана экспрессии соответствовала 17,1% [ $Q_1$ - $Q_3$ : 13,2-24,0] (рисунок 7).

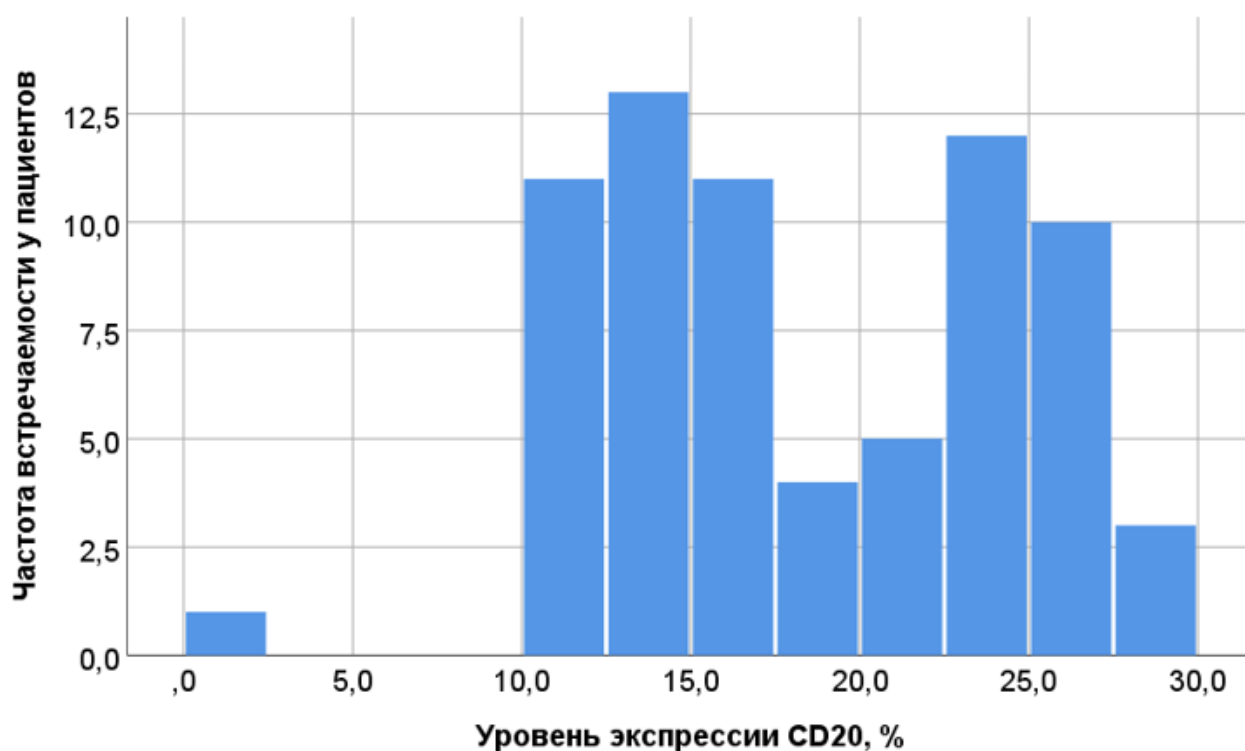


Рисунок 7 – Распределение пациентов по относительному содержанию CD20<sup>+</sup> лимфоцитов

Особенностей в характере распределения CD20<sup>+</sup> лимфоцитов не выявлено. В-лимфоциты обнаруживаются преимущественно в виде скоплений разной величины и формы (от мелких до крупных), либо локализуются дискретно по всему срезу и вокруг опухолевых клеток (рисунок 8).

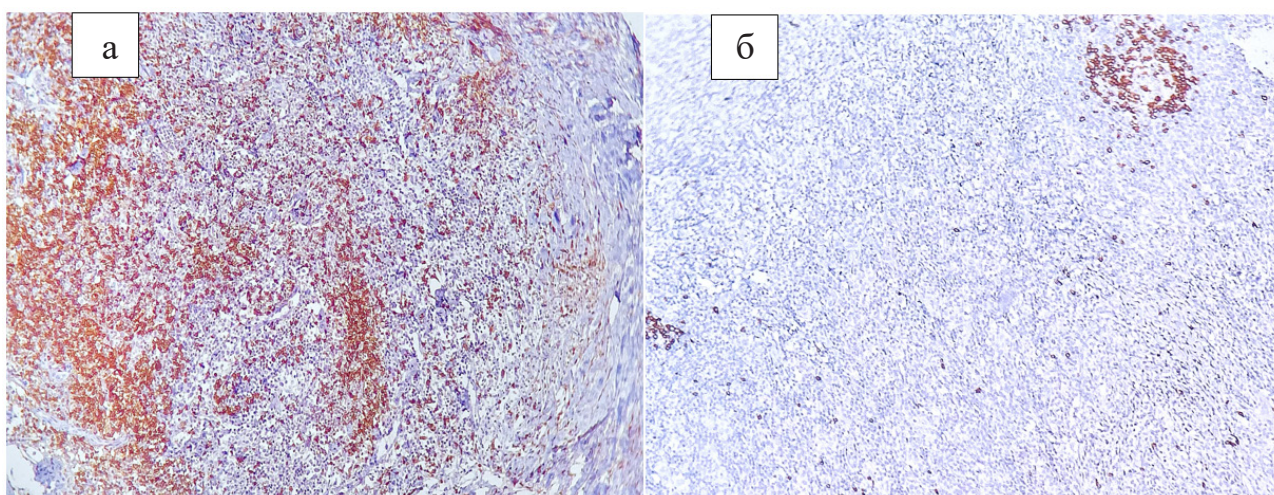


Рисунок 8 – Гистологический препарат лимфатического узла. Распределение CD20<sup>+</sup> лимфоцитов в лимфатических узлах с высокой (а) и низкой (б) экспрессией маркера. Окраска: иммуногистохимическая реакция с антителом к маркеру CD20 (клон b26, «Дак»), x100

С помощью ROC-анализа установлено оптимальное пороговое значение CD20-положительных лимфоцитов. Из рисунка 8 следует, что точкой «cut-off» относительного количества исследуемого маркера допустимо установить показатель чувствительности равный 0,839 (83,9%) и специфичности - 0,231 (23,1%) (рисунок 9). AUC под ROC-кривой составила  $0,873 \pm 0,043$ ; (95% CI: 0,790-0,957);  $p < 0,001$ . При таком сочетании характеристик в таблице координат ROC-кривой пороговый уровень относительного содержания CD20<sup>+</sup> лимфоцитов составил 17,2%.

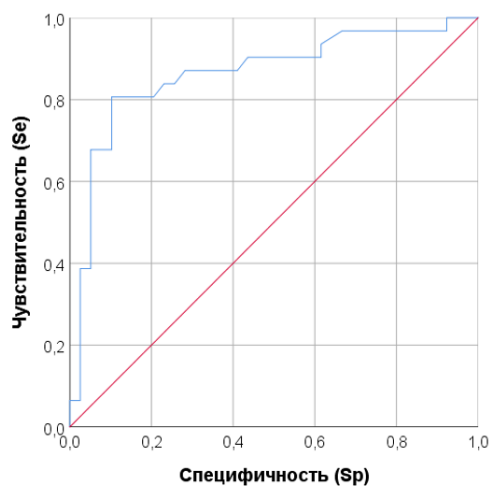


Рисунок 9 – ROC-кривая для CD20<sup>+</sup> лимфоцитов

На основании полученных данных всех обследованных разделили на две группы: с высоким (надпороговым;  $\geq 17,2\%$ ;  $n=35$ ) и низким (подпороговым;  $< 17,2\%$ ;  $n=35$ ) относительным содержанием CD20<sup>+</sup> лимфоцитов. Проанализирован характер распределения дифференцированной экспрессии CD20 в группах пациентов с разными клиническими характеристиками нодулярного склероза кЛХ, в результате которого установлены межгрупповые статистически значимые различия (таблица 2).

Таблица 2 – Взаимосвязь относительного содержания CD20<sup>+</sup> клеток с клиническими характеристиками больных нодулярным склерозом классической лимфомы Ходжкина

Показатель	Относительное содержание CD20 <sup>+</sup> лимфоцитов, %		p ( $\chi^2$ ) OR (95% CI)
	Надпороговое n=35 абс. (%)	Подпороговое n=35 абс. (%)	
Пол:			
мужчины (n=34)	18 (52,9%)	16 (47,1%)	0,6
женщины (n=36)	17 (47,2%)	19 (52,8%)	1,3 (0,5-3,2)
В-симптомы:			
нет (n=38)	23 (60,5%)	15 (39,5%)	<b>0,05*</b>
есть (n=32)	12 (37,5%)	20 (62,5%)	0,4 (0,2-1,0)
Стадия по Ann Arbor:			
локализованная (n=24)	17 (70,8%)	7 (29,2%)	<b>0,02*</b>
распространенная (n=46)	18 (39,1%)	28 (60,9%)	0,3 (0,1-0,8)
Полный ответ на терапию I линии:			
достигнут (n=39)	30 (76,9%)	9 (23,1%)	<b>&lt;0,001*</b>
не достигнут (n=31)	5 (16,1%)	26 (83,9%)	0,1 (0,02-0,2)

\*- различия показателей статистически значимы ( $p < 0,05$ )

Согласно полученным данным, подпороговое относительное содержание CD20<sup>+</sup> клеток преобладало среди больных с наличием В-симптомов ( $p=0,05$ ; OR=0,4; 95% CI=0,2–1,0). Низкая экспрессия белка более чем в 3 раза чаще встречалась у пациентов с распространенными стадиями нодулярного склероза кЛХ по отношению к обследуемым с локализованными стадиями заболевания

( $p=0,02$ ;  $OR=0,3$ ;  $95\% CI=0,1-0,8$ ). Установлено статистически значимое снижение частоты достижения полного ответа на терапию I линии у больных с подпороговой экспрессией маркера ( $p=0,001$ ;  $OR=0,1$ ;  $95\% CI=0,02-0,2$ ).

При анализе 5-летней ОВ выявлена тенденция к преобладанию подпороговой экспрессии CD20<sup>+</sup> у пациентов с низкой выживаемостью ( $p=0,078$ ). При оценке БСВ межгрупповые различия достигли статистической значимости (рисунок 10).

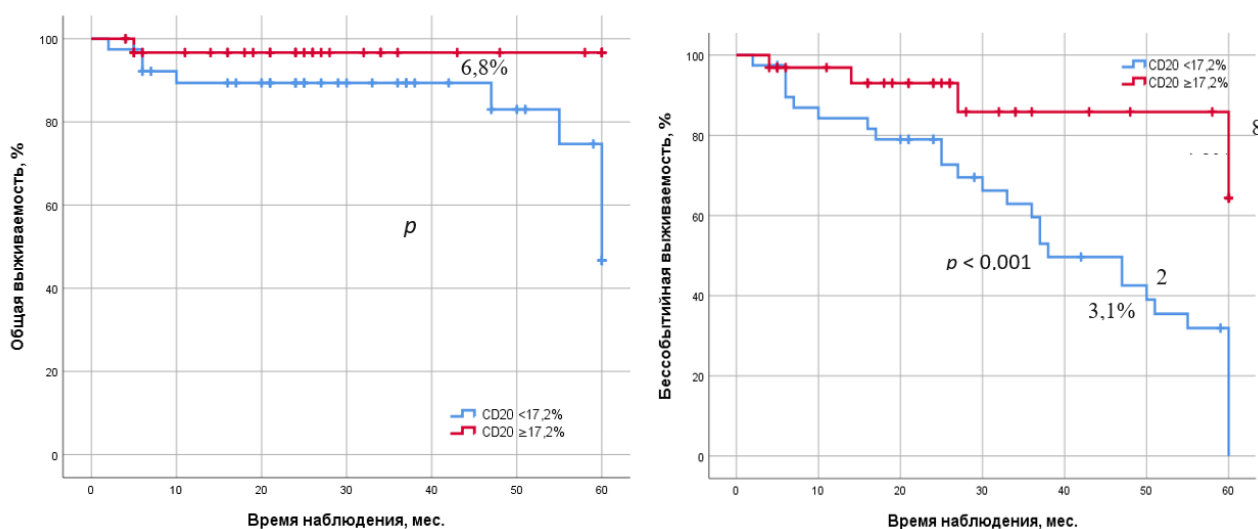


Рисунок 10 – ОВ (а) и БСВ (б) больных нодулярным склерозом кЛХ в зависимости от степени экспрессии CD20<sup>+</sup> лимфоцитов

Установлено, что при низкой экспрессии маркера медиана выживаемости соответствовала 38 мес.; при высокой – не достигнута. Неблагоприятные события возникали в 4 раза чаще у пациентов с подпороговым уровнем CD20<sup>+</sup> клеток по сравнению с больными, имевшими экспрессию ниже порогового значения (84,3% и 23,1% соответственно;  $p<0,001$ ;  $HR=0,24$ ;  $95\% CI: 0,09 - 0,62$ ).

**Выводы.** Определен прогностически значимый пороговый уровень относительного содержания CD20<sup>+</sup> клеток микроокружения у пациентов с различными клиническими характеристиками нодулярного склероза кЛХ (17,2%). Подпороговые значения экспрессии CD20<sup>+</sup> коррелируют с неблагоприятными клиническими характеристиками кЛХ: наличием В-симптомов, распространенной стадией заболевания и недостижением ответа на I линию терапии и ассоциированы с

низкой бессобытийной выживаемостью. Взаимосвязи относительного содержания CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> клеток микроокружения с ответом на I линию терапии не установлено. Прогностическая значимость T-клеточной популяции микроокружения при нодулярном склерозе КЛХ в исследованной выборке не выявлена.

#### Список литературы

1. Aruga A., Aruga E., Cameron M.J., Chang A.E. Different cytokine profiles released by CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> tumor-draining lymph node cells involved in mediating tumor regression. *J Leukoc Biol.* 1997 Apr;61(4):507-16. doi: 10.1002/jlb.61.4.507. PMID: 9103238
2. Cader F.Z, Schackmann R.C.J., Hu X., Wienand K., Redd R., Chapuy B., et al. Mass cytometry of Hodgkin lymphoma reveals a CD4(+) regulatory T-cell-rich and exhausted T-effector microenvironment. *Blood.* 2018;132(8):825–36. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-04-843714> -
3. Fang, P.; Li, X.; Dai, J.; Cole, L.; Camacho, J.A.; Zhang, Y.; Ji, Y.; Wang, J.; Yang, X.F.; Wang, H. Immune cell subset differentiation and tissue inflammation. *J. Hematol. Oncol.* 2018, 11, 97.
4. Grund, J, Iben, K, Reinke, S, Buhnen, I, Plutschow, A, Muller-Meinhard, B, et al. Low B-cell content is associated with a CD73-low tumour microenvironment and unfavourable prognosis in classic Hodgkin lymphoma. *Br J Haematol.* 2023; 00: 1– 6. <https://doi.org/10.1111/bjh.18762>
5. J. Shang. Phenotypes, Functions, and Clinical Relevance of Regulatory B Cells in Cancer. / J. Shang, H. Zha, Y. Sun // *Frontiers in Immunology.* – 2020. – № 11. – P. 582657. DOI: 10.3389/fimmu.2020.582657
6. J.M. Connors. Hodgkin Lymphoma / J.M. Connors, W. Cozen, C. Steidl [et al.] // *Nature Reviews Disease Primers.* – 2020. – № 6. – P. 61.
7. Kaseb H, Babiker HM. Hodgkin Lymphoma. [Updated 2022 Jul 10]. In: StatPearls [Internet]. / Kaseb H, Babiker HM. [Электронный ресурс] // Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; [сайт]. — URL: Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK499969/2023> (дата обращения: 30.06.2023).
8. L. Panico. High CD20<sup>+</sup> background cells predict a favorable outcome in classical Hodgkin lymphoma and antagonize CD68<sup>+</sup> macrophages / L. Panico, V. Tenneriello, F. Ronconi [et al.] // *Leukemia & Lymphoma.* – 2015. – Т. 6, № 56. – P. 1636-1642. DOI: 10.3109/10428194.2014.951849
9. Opinto G, Agostinelli C, Ciavarella S, Guarini A, Maiorano E, Ingravallo G. Hodgkin Lymphoma: A Special Microenvironment. *J Clin Med.* 2021 Oct 12;10(20):4665. doi:

- 10.3390/jcm10204665. PMID: 34682791; PMCID: PMC8541076.
10. Expression of FOXP3, CD68, and CD20 at diagnosis in the microenvironment of classical Hodgkin lymphoma is predictive of outcome / P. Greaves, A. Clear, R. Coutinho [et al.] // *Journal of Clinical Oncology (JCO)*. – 2017. – T. 35, № 10. – P. 1140. DOI: 10.1200/JCO.2011.39.9881
  11. Whole-slide image analysis of the tumor microenvironment identifies low B-cell content as a predictor of adverse outcome in patients with advanced-stage classical Hodgkin lymphoma treated with BEACOPP / R.D. Jachimowicz, L. Pieper, S. Reinke [et al.] // *Haematologica*. – 2021. – № 106 (6). – P. 1684-1692. DOI:
  12. Circulating clonotypic B cells in classic Hodgkin lymphoma / R.J. Jones, C.D. Gocke, Y.L. Kasamon [et al.] // *Blood*. – 2009. – № 113(23). – P. 5920. DOI: 10.1182/blood-2008-11-189688
  13. Vardhana S. The immune microenvironment in Hodgkin lymphoma: T cells, B cells, and immune checkpoints / S. Vardhana, A. Younes // *Haematologica*. – 2016. – № 101 (7). – P. 794-802. DOI: 10.3324/haematol.2015.132761.
  14. Cell Function in the Tumor Microenvironment / S.M. Downs-Canner, J. Meier, B.G. Vincent [et al.] // *Annual Review of Immunology*. – 2022. – № 40. – P. 169-193. DOI: 10.1146/annurev-immunol-101220-015603
  15. Single-cell transcriptome analysis reveals disease-defining T-cell subsets in the tumor microenvironment of classic Hodgkin lymphoma / T. Aoki, L.C. Chong, K. Takata [et al.] // *Cancer Discov*. – 2020. – T. 3, № 10. – C. 406–21. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-19-0680>
  16. Hodgkin Lymphoma: Biology and Differential Diagnostic Problem [Текст] / T. Takahara [et al.] // *Diagnostics*. — 2022. — № 6 T.12. — C. C. 1507.
  17. Advances in the treatment of Hodgkin lymphoma: Current and future approaches. [Текст] / F. Ullah, D.Dima, N.Omar, O.Ogbue, S.Ahmed // *Front Oncol.*. — 2023 . — № 3. — C. 1067289.
  18. CD20 role in pathophysiology of Hodgkin's disease / V. Santos, M. Marinus, L. Marinus [et al.] // *Revista da Associação Médica Brasileira (Published by Elsevier)*. – 2017. – № 63(9). – P. 810-813. DOI: 10.1590/1806-9282.63.09.810.
  19. Novel Agents For Relapsed and Refractory Classical Hodgkin Lymphoma: A Review [Текст] / Zhang, Yujie & Xing, Zhichao & Li, Zhihui & Zhu, Jingqiang & Wei, Tao & Wu, Wenshuang. // *Frontiers in Oncology*. — 2022. — № 6 T.12. — C. 12. 929012. 10.3389/fonc.2022.929012.

УДК 616-006.448-031.13-08

ГРНТИ 76.29.33

*М.Л. Морозова*

ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», Киров  
младший научный сотрудник лаборатории клеточной и молекулярной  
иммунологии

*M.L. Morozova*

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of  
Hematology and Blood Transfusion under  
the Federal Medical and Biological Agency, Kirov  
Junior Researcher of the Laboratory of Cellular and Molecular Immunology  
E-mail: morozova@niigpk.ru

*Н.В.Исаева*

ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», Киров  
кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории  
клеточной и молекулярной иммунологии

*N.V. Isaeva*

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of  
Hematology and Blood Transfusion under  
the Federal Medical and Biological Agency, Kirov  
candidate of biological sciences,  
Senior Researcher of the Laboratory of Cellular and Molecular Immunology  
E-mail: isaeva@niigpk.ru

*М.Н. Хоробрых*

ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», Киров  
врач-гематолог отделения химиотерапии и трансплантации костного мозга

*M.N. Khorobrykh*

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of  
Hematology and Blood Transfusion under  
the Federal Medical and Biological Agency, Kirov  
Hematologist of the Chemotherapy and Bone Marrow Transplantation Department  
E-mail: marje81@mail.ru

## Влияние минимальной остаточной болезни в предтрансплантационном периоде у больных множественной миеломой на восстановление гемопоэза

### The effect of the minimal residual disease in the pre-transplant period in patients with multiple myeloma on the hematopoietic repair

*Аннотация.* Позднее восстановление гемопоэза после трансплантации аутологичных гемопоэтических стволовых клеток повышает риск возникновения инфекционных осложнений, требует регулярной трансфузионной заместительной терапии, снижает качество жизни и увеличивает стоимость лечения пациентов с множественной миеломой. Выявление факторов, влияющих на реконституцию костномозгового кроветворения, позволит прогнозировать сроки восстановления гемопоэза.

*Abstract.* Late hematopoietic reconstitution after transplantation of autologous hematopoietic stem cells increases the risk of infectious complications, requires regular transfusion replacement therapy, reduces the quality of life and increases the cost of treating patients with multiple myeloma. Identification of factors affecting bone marrow hematopoiesis recovery will allow predicting the timing of hematopoiesis recovery.

**Ключевые слова:** минимальная остаточная болезнь; множественная миелома; трансплантация аутологичных гемопоэтических стволовых клеток; проточная цитометрия.

**Index terms:** minimal residual disease; multiple myeloma; autologous hematopoietic stem cell transplantation; flow cytometry.

**Введение.** Высокодозная химиотерапия (ВХТ) с последующей трансплантацией аутологичных гемопоэтических стволовых клеток (аутоТГСК) в настоящее время являются терапевтической опцией у больных множественной миеломой (ММ). В течение 30 лет применение аутоТГСК — стандарт лечения молодых и сохраненных пациентов с ММ [3]. АутоТГСК позволяет существенно уменьшить объем остаточных опухолевых клеток, повысить глубину ответа на предшествующее лечение, снизить вероятность рецидива, улучшить показатели беспрогрессивной и общей выживаемости [1].

Наиболее распространенным режимом мобилизации гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) является применение гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (Г-КСФ) в сочетании с ВХТ [6,7,11]. Минимальная трансплантируемая доза CD34<sup>+</sup> клеток, достаточная для успешного приживания —  $2 \times 10^6$



ГСК/кг массы тела больного, оптимально —  $5 \times 10^6$  CD34+ клеток/кг.

Для оценки восстановления гемопоэза в раннем посттрансплантационном периоде используют уровни нейтрофилов ( $>0,5 \times 10^9/\text{л}$ ) и тромбоцитов ( $>30 \times 10^9/\text{л}$ ) на 21 - 28 день. У некоторых пациентов развивается длительная цитопения после трансплантации, что способствует возникновению жизнеугрожающих инфекционных и геморрагических осложнений.

Проточная цитофлуорометрия — один из основных методов диагностики минимальной остаточной болезни (МОБ), который включен с 2014 г. в рекомендации международной группы по изучению ММ (IMWG 2014) в качестве необходимого метода оценки строгой полной ремиссии [9]. Оценка МОБ перед аутоТГСК является важным инструментом контроля предшествующей терапии и определения ее эффективности. В статье Qian Sun и соавт. приведены результаты исследования, в которое были включены 186 пациентов с ММ. Установлено, что больные, достигшие МОБ-отрицательного статуса после индукционной терапии, имеют более благоприятный прогноз, по сравнению с теми, у кого этот статус достигнут после поддерживающей терапии [10].

Влияние МОБ на восстановление гемопоэза в посттрансплантационном периоде недостаточно изучено. Важную роль при этом играет количество клеток CD34+ в трансплантате [2, 5]. Необходимо проведение исследований влияния МОБ на сроки реконституции грануло- и тромбоцитопоэза.

**Цель** – оценить влияние минимальной остаточной болезни у больных множественной миеломой в предтрансплантационном периоде на сроки восстановления гемопоэза.

### **Материалы и методы**

Объект исследования – 36 пациентов (17 мужчин и 19 женщин) в возрасте от 37 до 67 (медиана 58) лет с ММ, получивших в 2021-2022 гг. аутоТГСК в ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России. Диагноз установлен в соответствии с критериями международной рабочей группы по изучению ММ (IMWG, 2014 г.) [8]. Перед инициацией режима мобилизации констатированы следующие варианты ремиссии заболевания: у 14 (38,9%) – полная (ПР), у 18 (50%) – очень хорошая частичная (ОХЧР), у 4 (11,1%) больных – частичная (ЧР). Мобилизация ГСК проводилась с использованием винорелбина в дозе  $35 \text{ мг}/\text{м}^2$  с последующей стиму-

ляцией Г-КСФ - филграстимом в дозе 5 мкг/кг 2 раза в сутки путем подкожных инъекций. Аферезы ГСК продолжали до получения минимального достаточного уровня CD34+ клеток:  $2,0 \times 10^6$ /кг веса реципиента. Дальнейшим этапом являлась заготовка ГСК у больных с последующей однократной аутоТГСК с применением режима кондиционирования мелфаланом (140—200 мг/м<sup>2</sup>).

Материалом для исследования МОБ служили образцы костного мозга больных ММ. Пациентам перед проведением трансплантации ГСК выполнено иммунофенотипирование плазматических клеток методом проточной цитофлуориметрии. Образцы окрашивали мечеными флуорохромом моноклональными антителами к CD38, CD138, CD45, CD19, CD56, CD117, CD27, CD81 (таблица 1). Исследования проводили на проточном цитофлуориметре BD FACSCanto™ II (BD Biosciences, США) с использованием программного обеспечения “BD FACS Diva” версии 7.0 (BD Biosciences, США). При оценке МОБ принимали во внимание aberrantный иммунофенотип, который выявляли при первичной диагностике ММ. МОБ-негативный статус констатировали в случае отсутствия ( $<0,01\%$  или  $<10^{-4}$ ) фенотипически aberrantных клональных плазматических клеток в аспирате костного мозга [4, 7, 8].

Таблица 1 - Панель антител для оценки минимальной остаточной болезни

Номер пробирки	Флуорохромы					
	FITC	PE	PerCP-Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC
1	CD81	CD56	CD19	CD38	CD138	CD45
2	CD27	CD117	CD19	CD38	CD138	CD45

Для оценки восстановления гемопоэза после аутоТГСК пациентам ежедневно выполняли общий анализ крови. За день восстановления лейкоцитарного роста принимался первый из трех последовательных дней с абсолютным числом нейтрофилов в гемограмме более  $0,5 \times 10^9$ /л. Восстановление тромбоцитопоэза – первый из трех последовательных дней с уровнем тромбоцитов более  $30 \times 10^9$ /л, без наличия потребности пациента в гемотрансфузиях.

Статистическую значимость показателей оценивали при помощи t-критерия Стьюдента и критерия Манна-Уитни для выборок с нормальным и ненормальным распределениями соответственно. Различия считали достоверными при  $p < 0,05$ .

## Результаты и их обсуждение

Пациентов разделили на 2 группы. В 1 группу вошли 19 (52,8%) больных, имевших МОБ-положительный статус перед аутоТГСК. Вторую группу составили 17 (47,2%) обследуемых с МОБ-негативным статусом перед трансплантацией. В 1 группе медиана значения МОБ равнялась 0,0400 (0,0145 - 0,0870) %, а во 2 группе – 0,0037 (0,0009 - 0,0053) %. По полу, возрасту, числу курсов терапии до аутоТГСК и дозе трансплантированных CD34+ клеток не выявлено значимых статистических различий между группами (таблица 2).

Таблица 2 – Характеристика пациентов с множественной миеломой

Показатели		1 группа	2 группа	p
Соотношение женщин и мужчин, %		73,6:26,4	41:59	0,328
Возраст больных (Ме), годы		57 (49-63)	59 (50-61)	0,310
Предшествовавшая терапия, %	одна линия	68,5	53	0,453
	две линии	21	23,5	
	три линии и более	10,5	23,5	
Число курсов терапии до аутоТГСК (Ме)		4 (4-8)	5 (3,5-7)	0,667
Количество трансплантированных CD34+ клеток (Ме), $\times 10^6$ /кг		4 (4-8,55)	5,21 (3,7-8,9)	0,401

В 1-й группе пациентов, прошедших аутоТГСК, оценка кумулятивной частоты восстановления гемопоэза на 21-й день показала, что 100% обследованных достигли нормализации числа лейкоцитов ( $>0,5 \times 10^9$ /л), тромбоцитов ( $>30 \times 10^9$ /л) – 95,5% (рисунок 1).

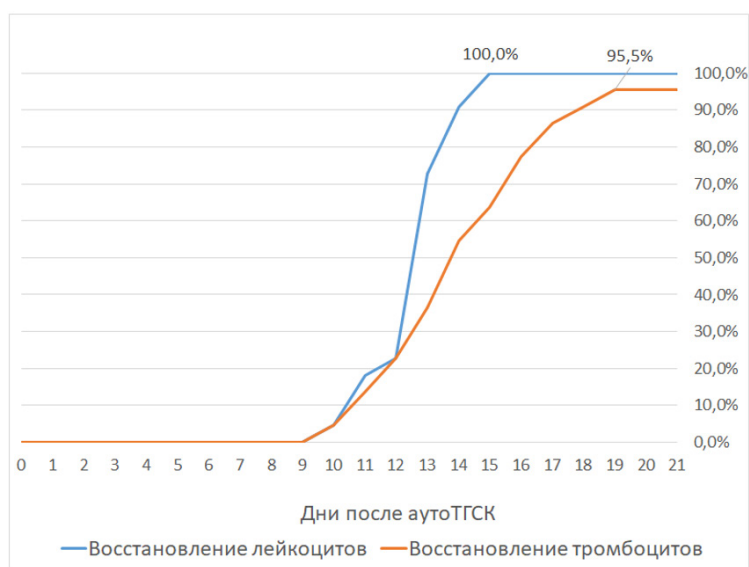


Рисунок 1 – Восстановление числа гранулоцитов и тромбоцитов на 21 день после аутоТГСК у больных множественной миеломой с МОБ-позитивным статусом до трансплантации

У 1 пациента нормализация количества тромбоцитов наблюдалась на 22 день. Медиана восстановления числа лейкоцитов – 13 (12,7-14) дней, тромбоцитов – 14 (13,1-16,3) дней.

Во 2 группе кумулятивная частота реконституции грануло- и тромбоцитопоза на 21 день составила 100% (рисунок 2).

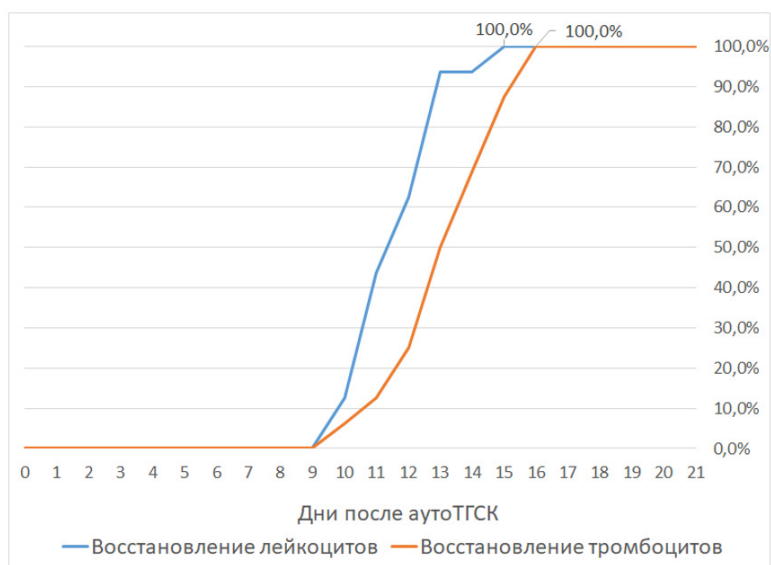


Рисунок 2 – Восстановление числа гранулоцитов и тромбоцитов на 21 день после аутоТГСК у больных множественной миеломой с МОБ-негативным статусом до трансплантации

Медиана восстановления количества лейкоцитов – 12 (10-13) дней, тромбоцитов – 13,5 (12,3-15) дней. В целом время нормализации кроветворения сопоставимо со временем нормализации гемопоэза у пациентов, лечившихся в других трансплантационных центрах, и укладывается в период от 21 до 28 дней [5].

При сравнении продолжительности реконституции грануло- и тромбоцитопоеза у больных выявлены статистически значимые различия в сроках восстановления числа лейкоцитов ( $p=0,043$ ) (рисунок 3).

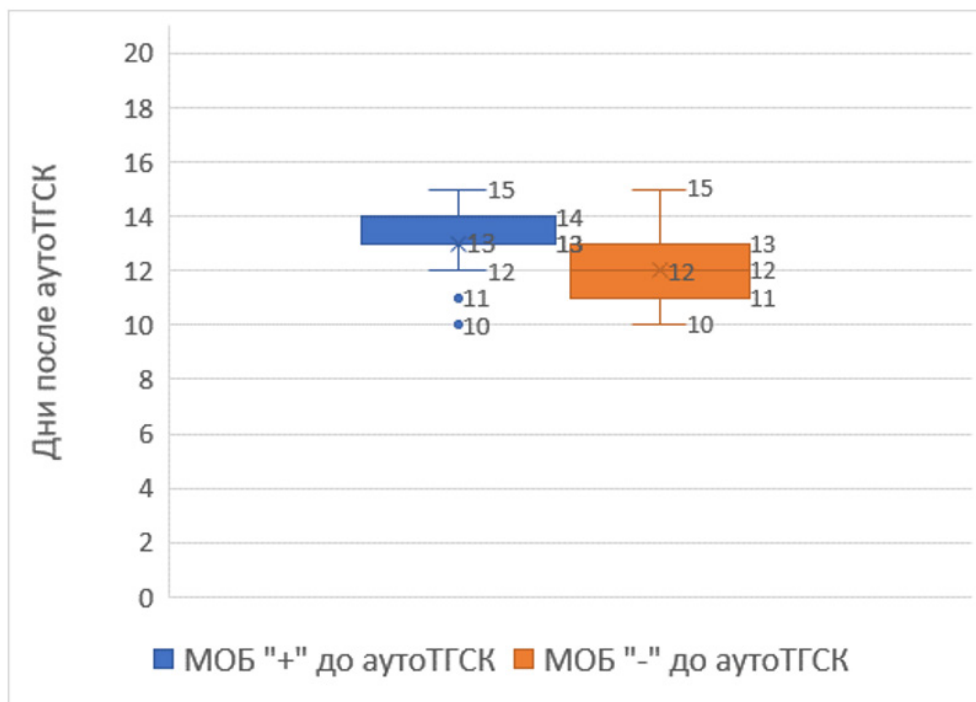


Рисунок 3 – Восстановление числа лейкоцитов у больных множественной миеломой в зависимости от МОБ-статуса до трансплантации

У пациентов с МОБ-негативным статусом восстановление уровня лейкоцитов  $>0,5 \times 10^9/\text{л}$  происходило в более ранние сроки, чем у таковых с сохраняющимся МОБ-позитивным статусом перед аутоТГСК.

### Вывод

У больных ММ с МОБ-позитивным статусом перед аутоТГСК возможно увеличение длительности нейтропении в раннем посттрансплантационном периоде.

## Список литературы

1. Грицаев С.В. Отдельные аспекты аутологичной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток при множественной миеломе / С.В. Грицаев, А.А. Кузьева, С.С. Бессмельцев // Клиническая онкогематология — 2017. — №10(1) — С.7–12.
2. Гривцова Л.Ю. Проточная цитометрия при диагностике плазмноклеточных опухолей и оценке минимальной остаточной болезни / Л.Ю. Гривцова, Т.Ю. Мушкарина, В.В. Лунин, П.А. Зейналова // Онкогематология – 2021. - №16(3). – С.16–25.
3. Эффективность и безопасность аутологичной трансплантации некриоконсервированных гемопоэтических стволовых клеток у больных множественной миеломой / С.В. Волошин, А.Д. Гарифуллин, А.А. Кузьева [и др.] // Онкогематология — 2022. — №17(2) — С.82–94.
4. Толстых Е.Э. Ключевые маркеры диагностики минимальной остаточной болезни при множественной миеломе / Е.Э. Толстых, Н.Н. Тупицын // Российский биотерапевтический журнал — 2022. — № 21. — С.42-49.
5. Al. Hamed, R. Current status of autologous stem cell transplantation for multiple myeloma / R. Al. Hamed, A.H. Bazarbachi, F. Malard, // Blood Cancer J. — 2019. — №9(4) — P.44-48. doi: 10.1038/s41408-019-0205-9.
6. CD34+ hematopoietic progenitor cell dose as a predictor of engraftment and survival in multiple myeloma patients undergoing autologous stem cell transplantation / A. Karakulak, H. Demiroğlu, Y. Büyükaşık [et al.] // Turk J Med Sci. — 2020. — №50(8) — P.1851-1856. doi: 10.3906/sag-2001-173.
7. Godder, K.T. Colony-stimulating factors in stem cell transplantation: effect on quality of life / K.T. Godder, P.J. Henslee-Downey // Hematother Stem Cell Res. — 2001. — №10(2) — P. 215-228. doi: 10.1089/15258160151134881.
8. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma / S.V. Rajkumar, M.A. Dimopoulos, A. Palumbo [et al.] // Lancet Oncol. — 2014. — №15(12) — P. 538–548. doi: 10.1016/S1470-2045(14)70442-5.
9. Paiva, B. New criteria for response assessment: role of minimal residual disease in multiple myeloma / B Paiva, JJ. van Dongen, A. Orfao // Blood. — 2015. — №125(20)—P.3059-3068. doi:10.1182/blood-2014-11-568907.
10. Prognostic Significance of the Stage at Which an MRD-Negative Status Is Achieved for Patients With Multiple Myeloma Who Received ASCT / Q. Sun, X. Li, J. Gu [et al.] // Front Oncol. — 2022. — №12 — P.776-820. doi:10.3389/fonc.2022.776920.
11. Utilization of hematopoietic stem cell transplantation for the treatment of multiple myeloma: a Mayo Stratification of Myeloma and Risk-Adapted Therapy (mSMART) consensus statement / W.I. Gonsalves, F.K. Buadi, S. Ailawadhi [et al.] // Bone Marrow Transplant. — 2019. — №54(3) — P.353-367. doi: 10.1038/s41409-018-0264-8.

УДК 616.419: 576.53:616-08-07

ГРНТИ 75.03.39

*И.П. Обухов*

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
«Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания  
крови Федерального медико-биологического агентства», Киров  
лаборант-исследователь научно-исследовательской лаборатории прикладной  
иммуногенетики

*I.P. Obukhov*

The Federal State-Financed Scientific Institution  
Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion  
under the Federal Medical Biological Agency, Kirov  
Research technician of the research laboratory of applied immunogenetics  
e-mail: obukhov@niigpk.ru

*М.А. Логинова*

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
«Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания  
крови Федерального медико-биологического агентства», Киров  
доктор биологических наук, заведующий научно-исследовательской  
лабораторией прикладной иммуногенетики

*M.A. Loginova*

The Federal State-Financed Scientific Institution  
Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion  
under the Federal Medical Biological Agency, Kirov  
Doctor of Sciences in Biology, Head of the research laboratory of applied  
immunogenetics  
e-mail: loginova@niigpk.ru

*Д.Н. Смирнова*

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
«Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания  
крови Федерального медико-биологического агентства», Киров  
кандидат биологических наук, научный сотрудник научно-исследовательской  
лаборатории прикладной иммуногенетики

*D.N. Smirnova,*

The Federal State-Financed Scientific Institution  
Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion  
under the Federal Medical Biological Agency, Kirov  
PhD, researcher of the research laboratory of applied immunogenetics  
e-mail: smirnovadn@niigpk.ru

*C.C. Дружинина*

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
«Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания  
крови Федерального медико-биологического агентства», Киров  
младший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории  
прикладной иммуногенетики

*S.S. Druzhinina*

The Federal State-Financed Scientific Institution  
Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion  
under the Federal Medical Biological Agency, Kirov  
Research assistant of the research laboratory of applied immunogenetics  
e-mail: druzhinina@niigpk.ru

*K.O. Репницына*

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
«Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания  
крови Федерального медико-биологического агентства», Киров  
лаборант-исследователь научно-исследовательской лаборатории прикладной  
иммуногенетики

*K.O. Repnitsyna*

The Federal State-Financed Scientific Institution  
Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion  
under the Federal Medical Biological Agency, Kirov  
Research technician of the research laboratory of applied immunogenetics  
e-mail: repnitsina@niigpk.ru

*И.В. Пармонов*

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
«Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания



крови Федерального медико-биологического агентства», Киров  
доктор медицинских наук, директор института

*I.V. Paramonov*

The Federal State-Financed Scientific Institution  
Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion  
under the Federal Medical Biological Agency, Kirov  
Doctor of Sciences in Medicine, Head of the Institute  
e-mail: paramonov@niigpk.ru

**Оценка поиска информативных маркеров у пар пациент/донор для  
мониторинга химеризма методом InDel-ПЦР**

**Evaluation of the search for informative markers in patient/donor pairs for  
monitoring chimerism by InDel-PCR**

*Аннотация.* Проведен анализ результатов поиска информативных маркеров методом InDel-ПЦР у 85 пар пациент/донор ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России с целью определения эффективности использования метода в рутинной практике. В ходе проведенного исследования установлено количество найденных информативных маркеров, а также выявлена необходимость наличия дополнительного метода мониторинга химеризма.

*Abstract.* The results of the search for informative markers by the InDel-PCR method were analyzed in 85 patient/donor pairs of the FSBSI KNIIGiPK FMBA of Russia, in order to determine the effectiveness of using the method in routine practice. In the course of the study, the number of informative markers found was established, and the need for an additional method of monitoring chimerism was identified.

*Ключевые слова:* аллогенная трансплантация; посттрансплантационный химеризм; InDel-ПЦР; мультиплексная STR-ПЦР; информативный маркер.

*Index terms:* allogeneic transplantation; posttransplantation chimerism; InDel-PCR; multiplex STR-PCR; informative marker.

**Введение.** Трансплантация аллогенных гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК) является современным методом лечения пациентов с онкогематологическими заболеваниями, позволяющая достичь как ремиссии основного заболевания, так и полного излечения. Возникновение отторжения трансплантата, острой реакции «трансплантат против хозяина» (ОРТПХ), а также рецидива ос-

новного заболевания, является ведущей проблемой после алло-ТГСК, приводящей к инвалидизации и смерти. По данным исследователей, развитие оРТПХ после алло-ТГСК у пациентов возникает почти в 50% случаев, а рецидив основного заболевания при остром лейкозе в 30 - 40% случаев и остается одной из главных причин гибели пациентов [2, 3, 4].

Алло-ТГСК неразрывно связана с посттрансплантационным химеризмом. На протяжении нескольких десятилетий ведутся активные разработки в области методов мониторинга химеризма, направленные на повышение чувствительности и стабильности отдельных методик, выявление значений на разных временных промежутках после алло-ТГСК и связанных с ними посттрансплантационных осложнений.

В настоящее время известно большое количество методов детекции химеризма. Среди них выделяют традиционные (исследование антигенов эритроцитов с помощью реакции гемагглютинации, цитофлуориметрический анализ с использованием моноклональных антител и др.) и молекулярно-генетические (FISH, VNTR, мультиплексная STR-ПЦР, количественная ПЦР с праймерами к InDel и SNP маркерам, цифровая капельная ПЦР - digital ПЦР или dПЦР) [5-7].

**Цель исследования** – поиск информативных маркеров у пар пациент/донор для мониторинга посттрансплантационного химеризма методом InDel-ПЦР в реальном времени.

### **Материалы и методы**

Объектом исследования являлись 85 пар пациент/донор клиники ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства» после алло-ТГСК за период с 2018 по май 2023 гг. В качестве рутинного метода исследования количественного химеризма в лаборатории применяли метод InDel-ПЦР в реальном времени с использованием панели праймеров и зондов, включающий в себя 26 информативных маркеров [6,8,9]. Название и их локализация приведены в таблице 1. Амплификацию InDel маркеров с дальнейшей детекцией в режиме реального времени осуществляли на амплификаторе нуклеиновых кислот Quant Studio 5 (Applied Biosystems, Сингапур). Метод InDel-ПЦР выбран в качестве основного, так как характеризуется высокой чувствительностью (0,1%), точностью и большой скоростью выполнения анализа [1].

Таблица 1 — Информативные InDel маркеры и их локализация

№	Информативный маркер	Локализация в хромосоме
1	S 01a	17q
2	S 01b	
3	S 02	Y
4	S 03	6q
5	S 04a	9
6	S 04b	
7	S 05a	20
8	S 05b	
9	S 06	1p
10	S 07a	X
11	S 07b	
12	S 08a	1q
13	S 08b	
14	S 09a	17q
15	S 09b	
16	S 10a	18
17	S 10b	
18	S 11a	11
19	S 11b	
20	ACE1721	11q
21	GST194	11q
22	MID402	6
23	MID668a	2
24	MID668b	
25	MID836a	12q
26	MID836b	
27	MID847	13
28	GAPDH	12

Альтернативным методом мониторинга химеризма в лаборатории является мультиплексная STR-ПЦР с применением набора реагентов GOrDIS Plus (GOrDIS, Россия), содержащего праймеры к 19 STR-локусам и локусу амелогенина человека. Название и хромосомная локализация маркеров приведены в таблице 2. Разделение ПЦР продуктов осуществляли с помощью капиллярного электрофореза на генетическом анализаторе 3500XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США). Анализ результатов электрофореграмм проводили с использованием программного обеспечения GeneMapper (Applied Biosystems, США) [11].

Таблица 2 - STR маркеры и их локализация

№	STR маркер	Локализация в хромосоме
1	Amelogenin X Amelogenin Y	Xp22.1-22.3 Yp11.2
2	D3S1358	3p21.31
3	TH01	11p15.5
4	D12S391	12p13.2
5	D1S1656	1q42
6	D10S1248	10q26.3
7	D22S1045	22q12.3
8	D2S441	2p14
9	D7S820	7q21.11
10	D13S317	13q31.1
11	FGA	4q31.3
12	TPOX	2p25.3
13	D18S51	18q21.33
14	D16S539	16q24.1
15	D8S1179	8q24.13
16	CSF1PO	5q33.1
17	D5S818	5q23.2
18	VWA	12p13.31
19	D21S11	21q21.1
20	SE33	6q14

Статистическая обработка данных проводилась с использованием программного обеспечения Microsoft Excel. Оценка достоверности данных проводилась с использованием критерия Стьюдента.

### Результаты и обсуждение

Поскольку основным методом мониторинга химеризма в лаборатории является InDel-ПЦР в реальном времени, поиск информативных InDel маркеров провели для всех 85 пар пациент/донор. Маркер считался информативным, если его наличие подтверждалось у пациента, а у донора - его отсутствие и наоборот. Всего обнаружили и подтвердили 595 информативных маркеров для 84 пар пациент/донор, для одной пары таковых обнаружить не удалось. Поиск и дальнейшее исследование химеризма в данной паре провели с помощью альтернативной методики - мультиплексной STR-ПЦР.

По типу трансплантации все пары пациент/донор разделены на три группы:

- родственные гаплосовместимые
- родственные полностью совместимые
- неродственные полностью совместимые

Распределение пар пациент/донор по группам представлено на Рисунке 1.

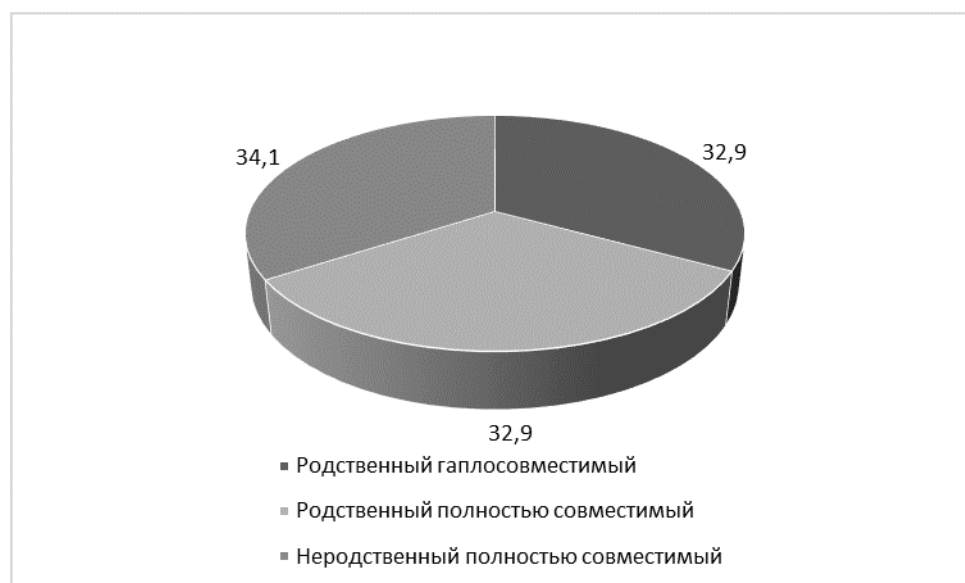


Рисунок 1 — Распределение пар пациент/донор

Для каждой группы рассчитали количество найденных информативных маркеров и медиану. Полученные данные представлены в таблице 3.

Таблица 3 — Характеристика информативных маркеров

Группа \ Показатель	Количество найденных информативных маркеров, абс.	Медиана, абс. (Q1-Q2)
Родственные гаплосовместимые	194	6 (3-11)
Родственные полностью совместимые	147	5 (3-10)
Неродственные полностью совместимые	254	9 (4-15)

Наибольшее число маркеров найдено в группе неродственных полностью совместимых пар, а наименьшее - в группе родственных полностью совместимых ( $p < 0,05$ ). При этом пара, для которой не обнаружили информативных маркеров, относилась к группе неродственных.

В ходе исследования установлено, что маркеры характеризовались различной информативностью. Наиболее показательными из них явились S03 и S09b, а наименее значимыми - S09a и ACE1721 ( $p < 0,05$ ).

**Выводы.** Для мониторинга химеризма у пациентов после ТГСК необходимо поддерживать в лаборатории не менее двух технологий, даже при наличии потенциальных информативных маркеров с локализацией на разных хромосомах. Число информативных маркеров у пар донор/реципиент, не имеющих родственной связи, значительно выше, чем у пар, имеющих родственную связь.

#### Список литературы

1. Черанев В.В., Логинова М.А., Кутявина С.С., Смирнова Д.Н., Зорина Н.А., Минаева Н.В., Парамонов И.В. Опыт внедрения метода InDel ПЦР в реальном времени для мониторинга количественного химеризма после аллогенной трансплантации костного мозга. Клиническая лабораторная диагностика. 2019; 64(12): 762-768.
2. Gooley T.A. Reduced Mortality after Allogeneic Hematopoietic-Cell Transplantation / Gooley T.A., Chien J.W., Pergam S.A., Hingorani S., Sorror M.L., Boeckh M., Martin P.J., Sandmaier B.M., Marr K.A., Appelbaum F.R., Storb R., McDonald G.B. // New England Journal of Medicine – 2010. – Т. 363 – № 22 – С.2091–2101.
3. Barrett A.J. Relapse after allogeneic stem cell transplantation / Barrett A.J., Battiwalla M. // Expert Review of Hematology – 2010. – Т. 3 – № 4 – С.429–441.
4. Thol F. Treatment of Relapsed Acute Myeloid Leukemia / Thol F., Ganser A. // Current Treatment Options in Oncology – 2020. – Т. 21 – № 8 – С.1–11.
5. Buño I., Nava P., Simón A., GonzalezRivera M., Jiménez J.L., Balsalobre P., et al. A comparison of fluorescent in situ hybridization and multiplex short tandem repeat polymerase chain reaction for quantifying chimerism after stem cell transplantation. Haematologica. 2005;90(10):1373–1379.
6. Alizadeh M., Bernard M., Danic B., Dauriac C., Birebent B., Lapart C., et al. Quantitative assessment of hematopoietic chimerism after bone marrow transplantation by real-time quantitative polymerase chain reaction. Blood. 2002;99(12):4618–4625
7. Basu A.S. Digital assays part I: partitioning statistics and digital PCR. SLAS Technology. 2017;22(4):369– 386.
8. Koldehoff M., Steckel N.K., Hlinka M., Beelen D.W., Elmaagacli A.H.. Quantitative analysis of chimerism after allogeneic stem cell transplantation by real-time polymerase chain reaction with single nucleotide polymorphisms, standard tandem repeats, and Y-chromosome-specific sequences. Am J Hematol. 2006; 81(10): 735–746.
9. Stahl T. Digital PCR to assess hematopoietic chimerism after allogeneic stem cell transplantation / Stahl T., Böhme M.U., Kröger N., Fehse B. // Experimental Hematology –

2015. – Т. 43 – № 6 – С.462- 468.e1

10. Lavrinenko V.A., Savitskaya T.V., Volochnik E.V., Mareyko Yu.E., Aleynikova O.V. Kolichestvennyy analiz khimerizma posle allogennoy transplantatsii gemopoeticheskikh stvolovykh kletok molekulyarno-geneticheskimi metodami. *Onkogematologiya*. 2014; 9 (2): 29-36. (In Russian).

УДК 57.084.1

ГРНТИ 34.15.27

*A.O. Pestrikova*

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», Киров  
лаборант-исследователь лаборатории клеточных технологий

*A.O. Pestrikova*

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical and Biological Agency, Kirov  
Laboratory Assistant Researcher of the Laboratory of Cellular Technologies  
E-mail: pestrikova@niigpk.ru

*E.A. Poponina*

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», Киров  
кандидат медицинских наук, заведующий лабораторией клеточных технологий

*E.A. Poponina*

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical and Biological Agency, Kirov  
Candidate of Medical Sciences, Head of the Laboratory of Cellular Technologies  
E-mail: poponinaea@niigpk.ru

*С.В. Попова*

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», Киров  
кандидат биологических наук, младший научный сотрудник лаборатории клеточных технологий

*S.V. Popova*

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical and Biological Agency, Kirov  
Candidate of Biological Sciences, Junior Researcher of the Laboratory of Cellular Technologies  
E-mail: popova@niigpk.ru

*Т.Л. Кудрявцева*

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», Киров  
лаборант-исследователь лаборатории клеточных технологий

*T.L. Kudryavtseva*

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical and Biological Agency, Kirov  
Laboratory Assistant Researcher of the Laboratory of Cellular Technologies  
E-mail: tlkudryavtseva@gmail.com

*Н.В. Исаева*

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», Киров  
кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории клеточной и молекулярной иммунологии

*N. V. Isaeva*

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical and Biological Agency, Kirov  
Candidate of Biological Sciences, Senior Researcher Laboratory of Cellular and Molecular Immunology  
E-mail: isaeva@niigpk.ru



*К.А. Воробьев*

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», Киров  
доктор биологических наук, заместитель директора по научной работе

*К.А. Vorobiev*

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical and Biological Agency, Kirov

Doctor of Biological Sciences, Deputy Director for research

E-mail: vorobiev@niigpk.ru

**Трансдукция лимфоцитов лентивирусными частицами, несущими универсальный химерный антигенный рецептор**

**Transduction of lymphocytes by lentiviral particles carrying a universal chimeric antigen receptor**

*Аннотация.* В настоящее время CAR-T клетки успешно используются для терапии онкогематологических новообразований. Одним из этапов получения CAR-T является трансдукция лимфоцитов *in vitro* с использованием различных вирусов. Лентивирусные векторы способны интегрировать целевые гены в хромосомы клеток, что нашло активное применение в разработке подходов адоптивной клеточной терапии. Несмотря на успехи генной инженерии в создании химерных рецепторов, методы первичной обработки T-клеток и переноса в них целевых генов достаточно сложны и представляют трудности для внедрения в рутинный процесс.

*Abstract.* Currently, CAR-T cells are successfully used for the treatment of oncohematological neoplasms. One of the steps in obtaining CAR-T is the transduction of lymphocytes *in vitro* using various viruses. Lentiviral vectors can integrate a target genes into chromosomes, and their ability has been actively used in the development of approaches to adoptive cell therapy. Despite advances in genetic engineering in creating chimeric receptors, T-cell pretreatment and transfer of target genes into them are quite difficult and difficult to implement routinely.

**Ключевые слова:** трансдукция; лентивирусы; химерный антигенный рецептор.

**Index terms:** transduction; lentiviruses; chimeric antigen receptor.

**Введение.** Для инновационной терапии В-клеточных злокачественных заболеваний в последние годы активно исследуются различные варианты применения Т-лимфоцитов с химерными Т-клеточными рецепторами, CAR-T-клетки (chimeric antigen receptor) [2, 3]. В настоящее время 6 таких препаратов одобрены FDA, на российском рынке также существует один из них. Химерный рецептор позволяет им распознавать опухоль-ассоциированные антигены независимо от главного комплекса гистосовместимости I класса. После связывания с антигенами на клетках-мишенях Т-лимфоциты получают дополнительную стимуляцию сигнальными доменами, что приводит к развитию цитотоксической реакции. Лечение CAR-T-клетками значительно расширило возможности клеточной терапии с использованием технологии генной инженерии [4].

Одним из этапов получения CAR-T-клеток является трансдукция, то есть процесс переноса генетического материала в клетки при помощи вируса. В качестве средства доставки ДНК используются системы на основе аденовирусов, аденоассоциативного вируса, вируса простого герпеса, ретровирусов и лентивирусов (LV) [5]. К преимуществам лентивирусной трансдукции относятся ее эффективность, высокая жизнеспособность Т-клеток после доставки ДНК, стабильная экспрессия и низкий риск трансформации [6]. LV векторы позволяют устойчиво интегрировать в геном Т-клеток последовательность, кодирующую CAR. При этом исключается образование новых вирусных частиц за счет генно-инженерной инактивации репликативной способности LV векторов.

Сборка вирусного вектора сопровождается определенными сложностями в определении его качественных характеристик. Так, некоторые частицы не включают в себя ДНК-последовательности, кодирующие CAR, и являются «пустыми». При этом концентрация LV, определяемая методом иммуноферментного анализа (ИФА) по количеству оболочечных белков, может быть высокой. Таким образом, ИФА демонстрирует только количество оболочек LV вектора, не характеризуя его трансдуцирующую способность. Для этого проводится титрование LV на модельной клеточной линии в стандартных условиях.

**Цель** — оценить трансдуцирующую способность лентивирусного вектора, несущего универсальный химерный антигенный рецептор.

**Материалы и методы.** Для проведения трансдукции использовали ленти-

вирусный вектор третьего поколения, с клонированной последовательностью универсального химерного антигенного рецептора — LvCAR-Bs-IgG4. Концентрация LV частиц при оценке иммуноферментным анализом (набор Lenti-X p24 Rapid Titer Kit, Takara-bio) составила 108,9 нг/мл.

*Трансдукция Jurkat NFAT.* Для оценки качества полученных вирусных частиц и определения рабочей дозы вирусной нагрузки проводили предварительный этап титрования лентивируса на модельной клеточной линии Jurkat NFAT (коллекция лаборатории молекулярной иммунологии ИБХ РАН), представляющей собой иммортализованную линию Т-лимфоцитов человека. Трансдукцию проводили методом спинфекции с использованием полибрена (Sigma, США). Клетки Jurkat NFAT предварительно культивировали в питательной среде RPMI-1640 с глутамином (Биолот, Россия), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Биолот, Россия), 10 ЕД/мл пенициллина, 10 мкг/мл стрептомицина, в условиях 5% CO<sub>2</sub> и температуре 37°C.

Затем в 4 центрифужные пробирки с питательной средой помещали по  $1,25 \times 10^6$  клеток. К ним добавляли вирусные частицы и полибрен (5 мкг/мл). Суспензию лентивирусного вектора вносили в разных объемах: 50 мкл, 100 мкл, 200 мкл, 500 мкл. Конечный объем подготовленной смеси составлял 3 мл. Пробирки центрифугировали при 32°C в течение 90 минут при 1200g. После проведения спинфекции осадок аккуратно ресуспендировали и весь объем смеси переносили на чашки Петри диаметром 35 мм. Далее клетки инкубировали в течение 12 часов при 5% CO<sub>2</sub>, 37°C, после чего среду заменяли свежей культуральной средой RPMI-1640 без дополнительных добавок.

*Трансдукция Т-лимфоцитов.* После выбора оптимального количества лентивирусного вектора проводили процесс трансдукции культуры донорских Т-лимфоцитов.

Для этого выделяли фракцию мононуклеаров из периферической крови, смешанной с антикоагулянтом ЭДТА, с использованием градиента плотности Lympholyte - H (Cedarlane, Канада) в соответствии с методикой производителя. Из полученной взвеси фракционировали Т-лимфоциты методом негативной селекции на магнитных частицах с использованием набора EasySep Human T Cell Isolation Kit (StemCell, Канада). Изолированные Т-клетки переносили в среду ImmunoCult-XF T Cell Expansion Medium (StemCell, Канада), ИЛ-2 (0,6 нг/мл) (Scistore, Россия), ципрофлоксацин (10 нг/мл) (Синтез, Россия). Затем прово-

дили активацию Т-лимфоцитов путем контактного костимулирования рецепторов CD3/CD28 с использованием набора ImmunoCult Human CD3/CD28 T Cell Activator. Культуру Т-клеток инкубировали при 37°C и 5% концентрации CO<sub>2</sub>. Через 24 часа выполняли замену питательной среды и трансдукцию Т-клеток методом спинфекции с добавлением полибрена. Протокол трансдукции не отличался от описанного выше для культуры Jurkat NFAT. В процессе культивирования Т-лимфоцитам при каждой замене питательной среды вносили ИЛ-2 (0,6 нг/мл).

Эффективность трансдукции Jurkat NFAT и донорских Т-лимфоцитов оценивали через 72 часа методом проточной цитометрии (BD FACS Canto II, США) по связыванию конъюгированных с красителем антител на шарнирную внеклеточную область IgG4, входящую в состав универсального химерного Т-клеточного рецептора. Также регистрировали процент нежизнеспособных клеток, позитивных на содержание ДНК-тропного красителя 7-актиномино-мицина D.

## Результаты

Результаты, полученные при трансдукции модельной линии Jurkat NFAT, представлены в таблице.

Таблица – Результаты трансдукции клеток Jurkat NFAT лентивирусными частицами LvCAR-Bs-IgG4 с универсальным химерным антигенным рецептором

Имунофенотипические характеристики культуры клеток	Объем вносимой суспензии LV, мкл			
	50	100	200	500
Количество клеток, несущих маркеры 3+/IgG4+, %	6,9	2,5	25,5	53,5
Количество клеток, несущих маркеры IgG+/7AAD+, %	0,4	0,4	0,6	0,9

Проведение процесса титрования лентивирусного вектора на модельной клеточной линии позволяет определить функциональную способность псевдовиральных частиц, так как фиксируется результат трансдукции, а именно экспрессия химерного рецептора на поверхности Jurkat NFAT. Наибольшая эффективность трансдукции - 53,5% получена при объеме вирусной суспензии (500 мкл), что считается удовлетворительным показателем [1, 7]. Это указывает на необходимость высокой вирусной нагрузки для повышения эффективности трансдукции. Жизнеспособность трансдуцированных клеток при данной дозе LV существенно не уменьшалась.

На рисунке представлены результаты проточной цитометрии клеточной линии Jurkat NFAT после трансдукции LvCAR-Bs-IgG4. Первый пик гистограммы представляет клетки, негативные по IgG4, входящему в состав универсального химерного Т-клеточного рецептора. Второй пик демонстрирует популяцию, несущую встроенный CAR.

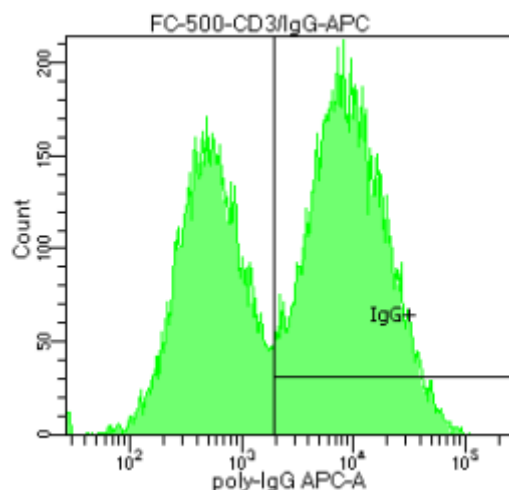


Рисунок - Взаимодействие антител, специфичных к шарнирному участку Т-рецептора, с клетками Jurkat NFAT, трансдуцированными лентивирусами LvCAR-Bs-IgG4

Для проведения трансдукции лимфоцитов было взято  $1,0 \times 10^6$  донорских клеток, из них 99,4% Т-лимфоциты (CD3+), CD8+ - 27,1%. При использовании максимального количества оттитрованных ранее лентивирусных частиц LvCAR-Bs-IgG4 (500 мкл) число трансдуцированных CD3+ Т-клеток составило 29,7%, из них CD8+ - 32,7%, количество погибших 7AAD+ - 1,8%.

**Заключение.** Внедрена методика лентивирусной трансдукции клеток Jurkat NFAT и донорских Т-лимфоцитов. Получены клетки, несущие универсальные химерные рецепторы CAR, детектируемые методом проточной цитометрии по наличию встроенного внеклеточного фрагмента IgG4. Дальнейшие исследования будут направлены на повышение эффективности трансдукции Т-лимфоцитов, а также отработку условий их экспансии и оценку функциональной активности на модельных клеточных культурах *in vitro*.

### Список литературы

1. Зайкова Е.К., Левчук К.А., Поздняков Д.Ю. и др. Эффективная трансдукция Т-лимфоцитов лентивирусными частицами в онкоиммунологических исследованиях. Клиническая онкогематология. 2020.13(3):295–306.
2. June C.H., O'Connor R.S., Kawalekar O.U. et al. CAR T cell immunotherapy for human cancer. Science. 2018.359:1361–1365.
3. Grupp S.A., Kalos M., Barrett D. et al. Chimeric antigen receptor–modified T cells for acute lymphoid leukemia. N Engl J Med. 2013. 368:1509–1518.
4. Okuma A. Generation of CAR-T Cells by Lentiviral Transduction. Methods Mol Biol. 2021;2312:3-14. doi: 10.1007/978-1-0716-1441-9\_1. PMID: 34228281.
5. Luo D., Saltzman M.W. Synthetic DNA Delivery systems. Nature Biotechnology. 2000. 18:33-37.
6. He X., He Q., Yu W. et al. Optimized protocol for high-titer lentivirus production and transduction of primary fibroblasts. J Basic Microbiol. 2021. 61(5):430-442. doi: 10.1002/jobm.202100008.
7. Gutierrez-Guerrero A., Cosset F.L., Verhoeyen E. Lentiviral Vector Pseudotypes: Precious Tools to Improve Gene Modification of Hematopoietic Cells for Research and Gene Therapy. Viruses. 2020. 12(9):1016. doi: 10.3390/v12091016. PMID: 32933033; PMCID: PMC7551254.

УДК 57.084.1

ГРНТИ 76.03.33

*М.С. Пинегина*

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», Киров  
врач клинической лабораторной диагностики клинической лаборатории

*M.S. Pinegina*

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical and Biological Agency, Kirov

Doctor of clinical laboratory diagnostics of the clinical laboratory

E-mail: m.s.pinegina2209@gmail.com

*Т.В. Кривокорытова*

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», Киров  
заведующий клинической лабораторией

*T.V. Krivokorytova*

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical and Biological Agency, Kirov

Head of the clinical laboratory

E-mail: krivokorytova@niigpk.ru

*Ф.С. Шерстнев*

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», Киров  
кандидат медицинских наук, заведующий отделением трансфузиологии и процессинга гемопоэтических стволовых клеток

*F.S. Sherstnev*

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical and Biological Agency, Kirov

Candidate of Medical Sciences, Head of the Department of Transfusiology and

Hematopoietic Stem Cell Processing

E-mail: sherstnyov\_phil@mail.ru

*С.Л. Калинина*

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», Киров  
заведующий отделением анестезиологии и реанимации

*S.L. Kalinina*

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical and Biological Agency, Kirov

Head of the Department of Anesthesiology and Intensive Care

E-mail: kalininasl@niigpk.ru

*О.Э. Вязникова*

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», Киров  
врач- гематолог взрослого отделения гематологии и химиотерапии

*О.Е. Vyaznikova*

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical and Biological Agency, Kirov

hematologist of the adult Department of Hematology and Chemotherapy

E-mail: vyaznikova@niigpk.ru

*Н.Р. Паныхина*

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», Киров  
врач клинической лабораторной диагностики клинической лаборатории

*N.R. Panikhina*

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical and Biological Agency, Kirov

Doctor of clinical laboratory diagnostics of the clinical laboratory

E-mail: panikhina@niigpk.ru



## Тромботическая тромбоцитопеническая пурпура — проблемы диагностики и терапии (Клинический случай)

### Thrombotic thrombocytopenic purpura — problems of diagnosis and therapy (Clinical case)

*Аннотация.* Одна из разновидностей тромботической микроангиопатии - тромботическая тромбоцитопеническая пурпура (болезнь Мошковица), характеризуется системной агрегацией тромбоцитов, ишемией различных органов, выраженной тромбоцитопенией потребления и микроангиопатической гемолитической анемией с фрагментацией эритроцитов. Описание случая диагностики и течения тромботической ангиопатии у женщины 36 лет.

*Abstract.* Thrombotic thrombocytopenic purpura (Moshkovitz disease) is a severe occlusive thrombotic microangiopathy characterized by systemic platelet aggregation, ischemia of various organs, pronounced consumption thrombocytopenia and microangiopathic hemolytic anemia with fragmentation of erythrocytes. Description of the case of diagnosis and course of thrombotic angiopathy in a 36-year-old woman.

*Ключевые слова:* тромботическая тромбоцитопеническая пурпура; болезнь Мошковица; тромботическая микроангиопатия; шизоциты.

*Index terms:* thrombotic thrombocytopenic purpura; Scrotal disease; thrombotic microangiopathy; schizocytos.

**Введение.** Тромботическая тромбоцитопеническая пурпура (болезнь Мошковица, ТТП) — одна из разновидностей тромботической микроангиопатии (ТМА), характеризующаяся тромбоцитопенией, микроангиопатической гемолитической анемией (неиммунная гемолитическая анемия с шизоцитами в мазке крови), микроваскулярным тромбозом концевых артериол и капилляров с множественной дисфункцией органов.

В основе ТТП лежит отсутствие или недостаточная активность металлопротеиназы ADAMTS-13 (A Disintegrin And Metalloprotease with Thrombospondin type 1 motif 13) — плазменного белка, регулирующего взаимодействие тромбоцитов с фактором фон Виллебранда (ФВБ). В результате низкой активности ADAMTS-13 мультимеры ФВБ, секретируемые эндотелиальными клетками, связываются с тромбоцитами, формируя агрегаты, которые окклюдзируют артериолы. Процесс агрегации тромбоцитов приводит к тромбоцитопении [1]. Эритроциты, переме-

щаяся по окклюзированным сосудам, подвергаются разрушению, что приводит к механическому гемолизу и появлению шизоцитов [2]. Шизоциты представляют собой фрагменты эритроцитов, выявляемые в мазке крови в виде полумесяца, с двумя-тремя острыми выступами, шлема (каска), треугольника, маленького фрагмента неправильной формы, имеющего линию разлома [3]. Нормальное количество шизоцитов в мазке крови при подсчете традиционным способом - 0-0,27%. При ТТП они составляют в среднем 8,35%.

Для постановки диагноза ТТП необходимо наличие клинического и лабораторного симптомокомплекса: тромбоцитопенический геморрагический диатез, микроангиопатическая гемолитическая анемия (МАГА), симптомы ишемии ЦНС примерно у 65% пациентов (головная боль, судороги, инсульт, кома), лихорадка, почечная недостаточность, боли в животе, реже боли в грудной клетке. Лабораторными диагностическими признаками являются неиммунная гемолитическая анемия с шизоцитами в мазке крови [4], тромбоцитопения, увеличенное количество ретикулоцитов, повышенный уровень свободного билирубина, повышенная активность ЛДГ, снижение концентрации гаптоглобина. При анализе мочи обнаруживается свободный гемоглобин, протеинурия, гематурия и цилиндрурия. При исследовании системы свертывания крови — признаки ДВС-синдрома (у 15% больных, особенно в период гемолиза или сепсиса). Обычно значительно снижены уровень и активность фермента ADAMTS-13 (менее 10%), определяются антитела к ADAMTS-13.

Сложность диагностики болезни Мошковица объясняется отсутствием у пациентов специфических клинических симптомов, вследствие чего большая роль в дифференциальной диагностике отводится подсчету количества шизоцитов в мазке крови.

Заболевание развивается, как правило, внезапно на фоне полного здоровья.

### **Клинический случай**

Женщина А., возраст 36 лет, считает себя больной с 26 февраля 2023 г., когда резко появились одышка, тошнота, боли в грудной клетке, выраженная слабость, повышение АД до 120/80 (рабочее 90-100/60-70), геморрагии на нижних конечностях, желтушность склер, носовое кровотечение сгустками.

При обследовании в КОГБУЗ Кирово-Чепецкой ЦРБ 28.02.2023 г. выявле-

ны изменения в анализах периферической крови: уровень гемоглобина - 71 г/л, количество тромбоцитов - 26 тыс, уровень лактатдегидрогеназы (ЛДГ) - 674 Ед/л; мочевины - 6,3 ммоль/л; креатинина - 72,2 мкмоль/л; АЛТ - 11,6 Ед/л; АСТ - 25,7 Ед/л; общего билирубина - 34 мкмоль/л; прямая проба Кумбса - отрицательная. Проводилась заместительная терапия, включавшая в себя трансфузии эритроцитной взвеси 5 доз, концентрата тромбоцитов 8 доз, получала препараты железа. Пациентка переведена в клинику ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России 06.03.2023 г. Объективно: кожные покровы бледные, желтушные, на нижних конечностях гематомы различной давности, слизистая оболочка ротовой полости бледная, иктеричность склер, тоны сердца приглушенные, АД 120/80 мм.рт.ст., ЧСС 76 ударов в минуту. Общий анализ крови: уровень гемоглобина – 85 г/л, количество эритроцитов –  $2,67 \times 10^{12}$ /л, лейкоцитов –  $4,01 \times 10^9$ /л, тромбоцитов –  $8 \times 10^9$ /л, сегментоядерных нейтрофилов – 53,1% лимфоцитов – 34,7%, моноцитов – 11%. СОЭ – 44 мм/ч. Лейкоцитарная формула: промиелоциты - 2%; миелоциты - 6%; палочкоядерные нейтрофилы - 3%; сегментоядерные нейтрофилы - 42%; эозинофилы - 1%; лимфоциты - 33%; моноциты - 13%; нормоциты - 3/100; анизоцитоз - ++; макроцитоз - +; микроцитоз - ++; шизоцитоз - +. Количество шизоцитов в мазке периферической крови 12,7%. Ретикулоциты - 96,9%. Биохимические показатели: уровень АСТ - 39 Ед/л; АЛТ - 41,3 Ед/л; ЛДГ - 1404 Ед/л; общего билирубина - 56,9 мкмоль/л (прямого билирубина — 14,1 мкмоль/л, непрямого билирубина — 42,8 мкмоль/л); креатинина - 62 мкмоль/л; гаптоглобина — 0 г/л. Коагулогические показатели: уровень фибриногена - 4,85 г/л; протромбина - 71%; активированное частичное тромбопластиновое время - 41,4с; тромбиновое время - 16,2с; МНО (расчетная величина) 1,2. Активность фермента ADAMS-13 составляла 0%. Определение свободного гемоглобина в моче - реакция резко положительная. При цитологическом исследовании мазка костного мозга выявлен полиморфный нормоклеточный препарат костного мозга, расширение эритрона (анемический синдром), снижение тромбоцитобразования.

На основании лабораторных и клинико-anamнестических данных поставлен диагноз ТТП.

С 08.03.2023 г. диагностированы неврологические расстройства (клонико-тонические судороги, психомоторное возбуждение), угнетение сознания, с развитием дыхательной и сердечно-сосудистой недостаточности, что явилось показанием к переводу на ИВЛ (с 08.03.23 г. по 13.03.23 г.). С 09.03.23 г. зарегистри-

стрирована фебрильная лихорадка, явления почечной, печеночной недостаточности. По данным КТ головного мозга (09.03.23 г.) отмечалось подозрение на ишемический инсульт в бассейне левой средней мозговой артерии, не исключался очаг ишемии в правой височной области, с признаками отека головного мозга. После консультации невролога поставлен диагноз энцефалопатия. По контрольной КТ головного мозга (14.03.2023 г.) диагностирован ишемический инсульт в бассейне левой средней мозговой артерии с формированием инфаркта в левой височной доле и в области базальных ядер слева. При повторной консультации невролога поставлен диагноз ишемический неуточненный (по классификации TOAST) инсульт в бассейне левой средней мозговой артерии.

Лечение включало в себя глюкокортикостероиды (ГКС) (метилпреднизолон с 06.03.23 г. по 16.03.23 г., с постепенным снижением дозы с 1000 мг до 125 мг, преднизолон 60 мг/сутки с 17.03.23 г. ежедневно, метилпреднизолон 250 мг/сутки в/в с 22.03.2023 г. по 23.03.23 г., аппаратный плазмообмен ежедневно с 7.03.2023 г. по 17.03.2023 г., трансфузии 2500-3000 мл СЗП, заместительные трансфузии эритроцитной взвеси 300 мл в/в №4, ритуксимаб 375 мг/м<sup>2</sup> в/в 09.03.23 г. и 16.03.23 г., антибактериальную, противогрибковую, симптоматическую, гепатотропную, противосудорожную терапию. Купированы симптомы сердечно-сосудистой, печеночной, почечной, дыхательной недостаточности, аппаратная респираторная поддержка была отменена на 6 сутки. Клонико-тонические судороги не повторялись.

Уровень шизоцитов в мазке периферической крови снизился с 12,7% до 0,8%, количество тромбоцитов повысилось с 12 тыс. до 250 тыс, уровень ЛДГ снизился с 1404 Ед/л до 220 Ед/л, показатель ретикулоцитов снизился с 96,9% до 9,3% ; непрямой билирубин нормализовался с 42,8 мкмоль/л до 5,2 мкмоль/л; повысился уровень гаптоглобина с 0 до 1,46 г/л; билирубин в моче не обнаружен.

После нормализации соматического и лабораторного статуса пациентка направлена в ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России с целью дифференциальной диагностики других тромботических микроангиопатий и определения дальнейшей тактики терапии.

**Заключение.** Клиническая картина ТТП не имеет специфических черт, поэтому пациенты могут быть госпитализированы в хирургическое отделение по поводу абдоминальных болей с подозрением на «острый живот», в инфекцион-

ное отделение – в связи с желтухой и лихорадкой, а также в реанимационное, неврологическое и терапевтическое отделения. При обнаружении тромбоцитопении необходимо обратить внимание на наличие гемолиза, а при выявлении неиммунного гемолиза следует произвести подсчёт шизоцитов. При подозрении на ТТП рекомендуется провести лабораторные исследования, включающие в себя полный анализ периферической крови (форменных элементов, количества тромбоцитов, исследование мазка крови, подсчёт ретикулоцитов); анализ коагулограммы (фибриноген и тесты паракоагуляции); биохимические показатели: печёночные пробы, определение уровня ЛДГ, уровень гаптоглобина, антифосфолипидные антитела, антинуклеарные антитела, сердечные тропонины; пробу Кумбса; анализ мочи. Врачам-лаборантам следует обращать особое внимание на мазки крови с повышенным количеством шизоцитов. При обнаружении фрагментированных эритроцитов при анализе мазка периферической крови необходим их подсчёт. Условием постановки клинического диагноза ТТП (при отсутствии других причин) является наличие как минимум двух симптомов — тромбоцитопении, микроангиопатической гемолитической анемии. При подозрении на ТТП следует немедленно начать терапию, в частности, обменный плазмаферез (40–60 мл/кг массы в сутки), инфузию свежезамороженной плазмы (до 30 мл/кг массы в сутки), прием ГКС — преднизолон 1 мг/кг/сут., не менее 5 дней, в комбинации с плазмаферезом (более 150000 мкл). При недостаточной эффективности терапии необходимо назначить ритуксимаб 375 мг/м<sup>2</sup> в/в 1 раз/неделю до 4 недель. Лечение продолжается до наступления ремиссии неврологической симптоматики, нормализации количества тромбоцитов и активности ЛДГ. Для профилактики рецидива у больных после перенесенной ТТП в анамнезе и с сохраняющейся низкой активностью ADAMTS-13 применяется ритуксимаб, спленэктомия; при развитии анемии — трансфузии эритроцитной взвеси. Летальность у нелеченных больных составляет до 90%.

Активное информирование врачей об особенностях диагностики и принципах лечения этого опасного для жизни пациентов заболевания должно способствовать ранней диагностике ТТП и проведению необходимых терапевтических мероприятий.

Представленный клинический случай ТТП отражает успешный результат клинико-лабораторной диагностики и лечения, предотвративший неблагоприятный исход заболевания.

### Список литературы

1. Sadler JE. Pathophysiology of Thrombotic Thrombocytopenic Purpura. *Blood*. 2017; 130(10):1181-8. doi: 10.1181. blood. 2017-04-636431
2. Zheng Y, Chen J, Lopez JA Flow-driven assembly of VWF fibres and webs in in vitro microvessels. *Nat Commun*. 2015;6:7858. doi:10.1038/ncomms8858
3. Lesesve J.-F., Salignac S., Bordigoni P., Lecompte T., Troussard X. et le Groupe français d'hématologie cellulaire Rôle du biologiste confronté à une recherche de schizocytes. *Hématologie* 2007; 13(3): 193–204.
4. Л.Б. Филатов, А.Ф. Томилов, Т.А. Алексеева Гемолитическая анемия, вызванная фрагментацией эритроцитов. *Клиническая онкогематология* 2011; 4: 346-355.

УДК 616-022.7

ГРНТИ 76.29.33

*Д.В. Прозоров*

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
«Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания  
крови Федерального медико-биологического агентства», Киров  
младший научный сотрудник  
лаборатории клеточной и молекулярной иммунологии

*D.V. Prozorov*

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of  
Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agency,  
Kirov

Junior Researcher of the Laboratory of Cellular and Molecular Immunology

E-mail: prozorov@niigpk.ru

*Е.Л. Назарова*

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
«Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания  
крови Федерального медико-биологического агентства», Киров  
кандидат медицинских наук,  
заведующий лабораторией клеточной и молекулярной иммунологии

*E.L. Nazarova*

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agency,  
Kirov

Candidate of Medical Sciences,  
Head of the Laboratory of Cellular and Molecular Immunology  
E-mail: nazarova@niigpk.ru

*T.H. Рыболовлева*

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
«Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания  
крови Федерального медико-биологического агентства», Киров  
младший научный сотрудник  
лаборатории клеточной и молекулярной иммунологии

*T. N. Rybolovleva*

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agency,  
Kirov

Junior Researcher of the Laboratory of Cellular and Molecular Immunology  
E-mail: rybolovleva@niigpk.ru

*C.O. Коробов*

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
«Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания  
крови Федерального медико-биологического агентства», Киров  
младший научный сотрудник  
лаборатории клеточной и молекулярной иммунологии

*S.O. Korobov*

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agency,  
Kirov

Junior Researcher of the Laboratory of Cellular and Molecular Immunology  
E-mail: korobov@niigpk.ru

*М.Н. Хоробрых*

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
«Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания  
крови Федерального медико-биологического агентства», Киров  
врач-гематолог отделения химиотерапии и трансплантации костного мозга

*M.N. Horobryh*

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of  
Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agency,  
Kirov

Hematologist of Department of Chemotherapy and Hematopoietic Stem Cell  
Transplantation

E-mail: horobryh@niigpk.ru

## **Реактивация ВК-вируса после трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток**

### **BKV-virus reactivation after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation**

*Аннотация.* Проведена оценка клинических осложнений, вызванных реактивацией полиомавируса ВКВ, у больных после трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток (аллоТГСК). Показана клиническая значимость ВКВ-инфекции в возникновении цистита ( $F$  value = 0,0011, ОШ = 20,0), периодов гематурии ( $F$  value = 0,00048, ОШ = 14,0) и возможной вторичной гипофункции трансплантата при обнаружении вируса в крови ( $F$  value = 0,005, ОШ = 17,8).

*Absrtact.* The clinical manifestations of complications caused by BKV polyomavirus reactivation in patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (alloHSCT) were assessed. The clinical significance of BKV infection in the occurrence of cystitis ( $F$  value = 0,0011, OR = 20,0), periods of hematuria ( $F$  value = 0,00048, OR = 14,0), and possible secondary graft hypofunction when a virus is detected in the blood ( $F$  value = 0,005, OR = 17,8) has been shown.

**Ключевые слова:** реактивация ВКВ; трансплантация аллогенных гемопоэтических стволовых клеток (аллоТГСК); цистит; гематурия; вторичная недостаточность трансплантата.

**Index terms:** BKV reactivation; allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (alloHSCT); cystitis; hematuria; secondary graft failure.



**Введение.** ВК-вирус (ВКV) – это повсеместно распространенный возбудитель инфекций рода *Betapoliomavirus* из семейства *Polyomaviridae*, выделенный впервые в 1971 г. от реципиента почки. Это безоболочечный вирус, содержащий двухцепочечную ДНК. Первичное заражение, как правило, происходит в детском возрасте и обычно протекает бессимптомно. По данным ВОЗ, у 90 % населения выявляют антитела к полиомавирусам [1]. У иммунокомпрометированных лиц, в том числе страдающих онкогематологическими заболеваниями, возможна реактивация вируса. Её причиной может послужить прием препаратов, используемых на этапах индукции и консолидации ремиссии, а также применение иммуносупрессивной терапии, необходимой для снижения риска возникновения реакции трансплантат против хозяина (РТПХ) после трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток (аллоТГСК) [3]. По литературным данным, до 54% пациентов, перенесших аллоТГСК, сталкиваются с реактивацией полиомавируса и осложнениями, вызванными им [3].

Известно, что ВКV тропен к различным клеткам и тканям организма, в частности, к эпителию урогенитального тракта, эпителию канальцев почек и лимфоцитам периферической крови, поэтому в большинстве случаев инфекция проявляется у реципиентов ГСК дизурией, учащенным мочеиспусканием, болью в надлобковой области, примесью крови в моче [3]. ВКV может являться одной из причин развития тубулоинтерстициального нефрита [6]. Другие менее распространенные клинические проявления, связанные с реактивацией полиомавируса, заключаются в возникновении интерстициального пневмонита и менингита. Имеются данные о том, что полиомавирусы способны оказывать негативное воздействие на кроветворную функцию трансплантата костного мозга [9].

**Цель.** Оценить частоту встречаемости и клиническую значимость реактивации ВК-вируса у пациентов онкогематологического профиля после трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток.

**Материалы и методы.** Обследованы 38 пациентов: 21 (55,3%) женщина и 17 (44,7%) мужчин с медианой возраста 37 лет (Q1-Q3: 25 - 43,5), получивших высокодозную химиотерапию с аллоТГСК в 2020 - 2022 гг. в ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России. Распределение больных по нозологическим группам: острый миелоидный лейкоз - 15 (39,5%), острый лимфобластный лейкоз - 9 (23,7%), лимфома Ходжкина - 4 (10,5%), миелодиспластический синдром - 4 (10,5%), идиопатическая апластическая анемия - 3 (7,9 %), хронический миелоидный лейкоз

- 1 (2,6 %), анапластическая крупноклеточная Т-клеточная лимфома -1 (2,6 %), первичный остеомиелофиброз - 1 (2,6 %). Данные представлены на Рисунке 1.

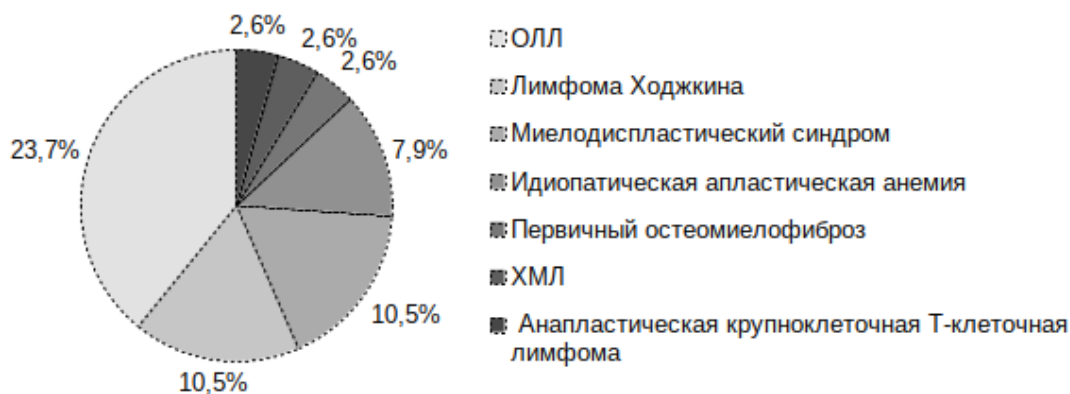


Рисунок 1 - Распределение онкогематологических больных, получивших аллоТГСК

Неродственная HLA-совместимая (10/10) аллоТГСК выполнена 18 (47,4%) пациентам, неродственная частично совместимая - 4 (10,5%), родственная гаплогидентичная - 12 (31,6%), родственная HLA-совместимая (10/10) – 4 (10,5%). У 13 (34,2%) обследованных применен миелоаблативный режим кондиционирования, у 25 (65,8%) – режим со сниженной интенсивностью.

В посттрансплантационном периоде все пациенты получили профилактику РТПХ по двух- или трехкомпонентной схеме: такролимус, микофенолата мофетил при родственной полностью совместимой и с добавлением циклофосфамида при гаплогидентичной, полностью или частично совместимой неродственной аллоТГСК.

Критерием вторичной гипофункции (ВГТ) трансплантата являлось угнетение как минимум 2 из 3 ростков кроветворения после периода первичного приживления трансплантата: снижение количества нейтрофилов  $<0,5 \times 10^9/\text{л}$ , или лейкоцитов  $<1 \times 10^9/\text{л}$ , и/или тромбоцитов менее  $20 \times 10^9/\text{л}$ , и/или уровня гемоглобина  $<70 \text{ г/л}$ .

Материалом для исследования ДНК ВКV служили образцы периферической крови и мочи пациентов с клиническими проявлениями цистита и эпизодами гематурии. Выявление ДНК ВКV осуществляли методом полимеразной цепной реакции в режиме «реального времени» с применением набора реагентов «ВКV-РВ» («Синтол», Россия).

Статистическая обработка данных выполнялась с помощью среды программирования R (v3.2.3). Для сравнения групп по категориальным признакам использовали точный критерий Фишера. Количественные характеристики представлены в виде медианы со значениями 1 и 3 квартиля (Me (Q1 - Q3)). Порог статистической значимости выявленных различий установлен на уровне  $p < 0,05$ .

**Результаты и обсуждение.** Реактивация ВКV установлена у 19 (50,0%) больных с медианой сроков обнаружения инфекции – 16 дней (Q1- Q3: 33,5- 64,5) после аллоТГСК, с длительностью выделения ДНК у инфицированных от 4 до 46 дней (медиана - 15). Первичное выявление ДНК ВКV в моче выявлено в 13 (68,4%) случаях, в крови - в 6 (31,6%). На различных этапах исследования вирус обнаружен у 9 (47,4%) пациентов с реактивацией ВК.

Наиболее часто вирус детектировался при миелоаблативном режиме кондиционирования: в 10 (76,9%) случаях (F value = 0,02, ОШ = 5,9), независимо от совместимости трансплантата по HLA (F value = 0,53).

В течение периода наблюдения у больных диагностированы следующие клинические проявления: дискомфорт и болезненность при мочеиспускании у 10 (26,3%) обследованных с присутствием ДНК вируса против 1 (2,6%) без обнаружения ВК (F value = 0,0011, ОШ = 20,0), гематурия у 15 (39,5%) против 5 (13,2%) пациентов (F value = 0,00048, ОШ = 14,0).

Известно, что назначение высоких доз циклофосфамида может являться причиной развития геморрагического цистита [3]. В нашем исследовании высокие дозы циклофосфамида назначены 19 (50,0 %) пациентам, из них у 5 (26,3%) были зафиксированы симптомы геморрагического цистита (F value = 0,075).

Повторная реактивация ВКV выявлена у 6 (31,6%) пациентов в сроки с 63 по 207 день (медиана - 157,5) после первого эпизода реактивации вируса. При этом установлены: болезненность в надлобковой области и жжение во время мочеиспускания у 2 (33,3%) пациентов, гематурия - в 3 (50,0%) случаях. У 1 (16,7%)

наблюдаемого обнаружено бессимптомное вирусовыделение.

Среди всех обследованных, которым выполнена аллотГСК, вторичная гипофункция трансплантата отмечена у 17 (44,7%), пациентов. Наиболее часто встречалась двухростковая недостаточность со снижением уровня гемоглобина и количества тромбоцитов у 11 (29,0%) больных. У пациентов с реактивацией ВКВ (вирурией и/или виремией) ВГТ выявлена в 12 (63,5%) против 5 (26,3%) случаев у пациентов без реактивации вируса ( $F$  value = 0,0285, ОШ = 4,8). У 8 из 9 (88,9%) больных с виремией ВКВ диагностировались проявления вторичной недостаточности трансплантата против 9 из 29 (31,0%) без обнаружения вируса в крови ( $F$  value = 0,005, ОШ = 17,8). Полученные нами данные соотносятся с описанием ситуации в других трансплантационных центрах [9].

Можно предположить, что ВГТ вызвана не прямым влиянием полиомавируса на гемопоэтические стволовые клетки, а опосредованно, вследствие угнетения эндогенной и нарушения выделительной функций почек (снижения выработки эритропоэтина и потери форменных элементов крови при мочеиспускании).

**Выводы.** Реактивация ВКВ у пациентов, перенесших аллотГСК, проявляется клинически, в виде дизурических расстройств и, возможно, выступает фактором, предрасполагающим к формированию вторичной гипофункции трансплантата костного мозга. Наиболее часто ДНК вируса обнаруживалась при миелоаблативном режиме кондиционирования ( $F$  value = 0,02, ОШ = 5,9), что ассоциировано с более глубоким иммуносупрессивным эффектом.

В группе больных с ВК-инфекцией цистит встречался в 20 раз, а периоды гематурии в 14 раз чаще, по сравнению с группой без присутствия ДНК вируса. При выявлении вируса в крови гипофункция трансплантата наблюдалась в 17,8 раз чаще.

Необходимы дальнейшие исследования для более детального изучения реактивации ВК-полиомавируса, а также внедрение активного мониторинга для детекции ДНК вируса не только при наличии клинических симптомов в виде цистита и гематурии, но и у пациентов без клинических проявлений, характерных для ВКВ, после проведенной аллотГСК.

## Список литературы

1. Клинико-морфологические признаки вирусного поражения почечного трансплантата. / С.Е. Соловьева, Е.М. Пальцева, М.М. Морозова, М.М. Каабак, Н.А. Крайник, А.В. Матвеев // Архив патологии. 2017; 79 (2): 22-28. - DOI:10.17116/patol201779222-28.
2. BK Virus Infection and BK-Virus-Associated Nephropathy in Renal Transplant Recipients. /M. Borriello, D. Ingrosso, A. Perna, A. Lombardi, P. Maggi, L. Altucci, M. Caraglia // Genes (Basel). 2022 Jul 21; 13 (7): 1290. - DOI: 10.3390/genes13071290.
3. ECIL guidelines for the prevention, diagnosis and treatment of BK polyomavirus-associated haemorrhagic cystitis in haematopoietic stem cell transplant recipients / S. Cesaro, T. Dalianis, C.Hanssen, M. Koskenvuo, A. Pegoraro, H. Einsele, C. Cordonnier, H. Hirsch; ECIL-6 Group. // J Antimicrob Chemother. 2018 Jan 1; 73 (1): 12-21. - DOI: 10.1093/jac/dkx324.
4. Graft failure in the modern era of allogeneic hematopoietic SCT. / R. Olsson, M. Remberger, M. Schaffer [et al.] // Bone Marrow Transplant. 2013; 48: 537–543. - DOI:10.1038/leu.2015.75.
5. Herrera Hernandez BK Polyomavirus Tubulointerstitial Nephritis With Urothelial Hyperplasia in a Kidney Transplant Am J Kidney Dis. / M. Sekulic, G. Cray, L. Hernandez // 2016 Aug; 68 (2): 307-311. - DOI: 10.1053/j.ajkd.2016.01.029.
6. Primary graft failure after myeloablative allogeneic hematopoietic cell transplantation for hematologic malignancies. / R. Olsson, B. Logan, S. Chaudhury [et al.] // Leukemia. 2015; 29: 1754–1762. - DOI:10.1038/bmt.2012.239.
7. Risk factors and outcome of graft failure after HLA matched and mismatched unrelated donor hematopoietic stem cell transplantation: a study on behalf of SFGM-TC and SFHI. / T. Cluzeau, J. Lambert, N. Raus [et al.]. // Bone Marrow Transplant. 2016; 51: 687–691.
8. Risk factors for hemorrhagic cystitis in pediatric allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. / R. Hayden, Z. Gu, W. Liu [et al.] // Transpl Infect Dis 2015; 17: 234–241. - DOI:10.1111/tid.12364.
9. Role of polyomavirus in emerging secondary hypofunction of marrow graft following allogeneic bone marrow transplantation in adults Cellular Therapy and Transplantation (CTT). / T.A. Rudakova, Y.A. Eismont, I.S. Moiseev, L.S. Zubarovskaya, A.D. Kulagin, B.V. Afanasyev. // Vol.5, No.3 (16), 2016. - DOI: 10.18620/ctt-1866-8836-2016-5-3-79-82.
10. Salvage allogeneic hematopoietic SCT for primary graft failure in children. Bone Marrow Transplant. / M. Kato, K. Matsumoto, R. Suzuki [et al] // 2013; 48: 1173. - DOI:10.1038/bmt.2013.36.

УДК 616.419: 576.53:616-08-07

ГРНТИ 75.03.39

*К.О. Репницына*

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
«Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания  
крови Федерального медико-биологического агентства», Киров  
лаборант-исследователь научно-исследовательской  
лаборатории прикладной иммуногенетики

*К.О. Repnitsyna*

The Federal State-Financed Scientific Institution  
Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion  
under the Federal Medical Biological Agency, Kirov  
Research technician of the research laboratory of applied immunogenetics  
e-mail: repnitsina@niigpk.ru

*М.А. Логинова*

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
«Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания  
крови Федерального медико-биологического агентства», Киров  
доктор биологических наук, заведующий научно-исследовательской  
лабораторией прикладной иммуногенетики

*М.А. Loginova*

The Federal State-Financed Scientific Institution  
Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion  
under the Federal Medical Biological Agency, Kirov  
Doctor of Sciences in Biology, Head of the research laboratory of applied  
immunogenetics  
e-mail: loginova@niigpk.ru

*Д.Н. Смирнова*

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
«Кировский научно-исследовательский институт гематологии и перелива-  
ния крови Федерального медико-биологического агентства», Киров  
кандидат биологических наук, научный сотрудник научно-исследователь-  
ской лаборатории прикладной иммуногенетики

*D.N. Smirnova,*

The Federal State-Financed Scientific Institution  
Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion  
under the Federal Medical Biological Agency, Kirov  
PhD, researcher of the research laboratory of applied immunogenetics  
e-mail: smirnovadn@niigpk.ru

*C.C. Дружинина*

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
«Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания  
крови Федерального медико-биологического агентства», Киров  
младший научный сотрудник научно-исследовательской  
лаборатории прикладной иммуногенетики

*S.S. Druzhinina*

The Federal State-Financed Scientific Institution  
Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion  
under the Federal Medical Biological Agency, Kirov  
Research assistant of the research laboratory of applied immunogenetics  
e-mail: druzhinina@niigpk.ru

*I.P. Обухов,*

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
«Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания  
крови Федерального медико-биологического агентства», Киров  
лаборант-исследователь научно-исследовательской  
лаборатории прикладной иммуногенетики

*I.P. Obukhov*

The Federal State-Financed Scientific Institution  
Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion  
under the Federal Medical Biological Agency, Kirov  
Research technician of the research laboratory of applied immunogenetics  
e-mail: obuhov@niigpk.ru

**Оценка результатов поиска совместимых доноров для пациентов,  
нуждающихся в трансплантации гемопоэтических стволовых клеток**  
**Evaluation of the results of the search for compatible donors for patients, in  
need of hematopoietic stem cell transplantation**

*Аннотация.* Проведено HLA-типирование пациентов молекулярно-генетическими методами в высоком разрешении, собраны данные о наличии потенциальных родственных доноров с последующим установлением совместимости путем определения их HLA-генотипов, а также эффективности поиска потенциально совместимых неродственных доноров в Федеральном регистре доноров костного мозга и гемопоэтических стволовых клеток.

*Abstract.* High-resolution HLA typing of patients by molecular genetic methods was carried out, data were collected on the presence of potential related donors with the subsequent determination of compatibility by determining their HLA genotypes, as well as the effectiveness of the search for potentially compatible unrelated donors in the Federal Register of bone marrow and Hematopoietic Stem Cell Donors.

*Ключевые слова:* HLA-типирование; трансплантация гемопоэтических стволовых клеток; совместимость пар донор/реципиент.

*Index terms:* HLA typing; hematopoietic stem cell transplantation; donor/recipient pair compatibility.

**Введение.** Трансплантация костного мозга и гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) является одним из наиболее эффективных методов лечения многих гематологических, онкологических, аутоиммунных и наследственных заболеваний у детей и взрослых [3]. Ежегодно в мире выполняется примерно 60 тысяч трансплантаций ГСК [4].

Успешное приживление и функционирование ГСК возможно только при высокой степени точности подбора пар донор-реципиент по генам системы HLA (Human Leukocyte Antigens – человеческие лейкоцитарные антигены). В качестве донора может выступать близкий родственник, чаще всего брат или сестра, однако родственник полностью совместимый донор обнаруживается лишь у 10-20% российских пациентов [2]. При отсутствии у больного HLA-идентичного родственного донора применяется трансплантация гемопоэтических стволовых клеток от неродственного донора, совместимого по HLA-системе. Поскольку полиморфизм генетической системы HLA исключительно высок, поиск двух инди-



видуумов, обладающих идентичными генетическими характеристиками, связан со значительными трудностями [1].

### **Цель исследования**

Оценка эффективности подбора совместимых родственных и неродственных доноров для пациентов клиники ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России, нуждавшихся в трансплантации ГСК.

### **Материалы и методы**

Объект исследования – 55 пациентов клиники ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России, нуждавшихся в трансплантации ГСК: 28 – женщин и 27 – мужчин, поступивших на лечение за период с 2021 по 2022 гг. Медиана возраста пациентов составила 33 года (диапазон от 4 до 64 лет).

Распределение пациентов по возрасту и нозологиям представлены на рисунках 1 и 2 соответственно.

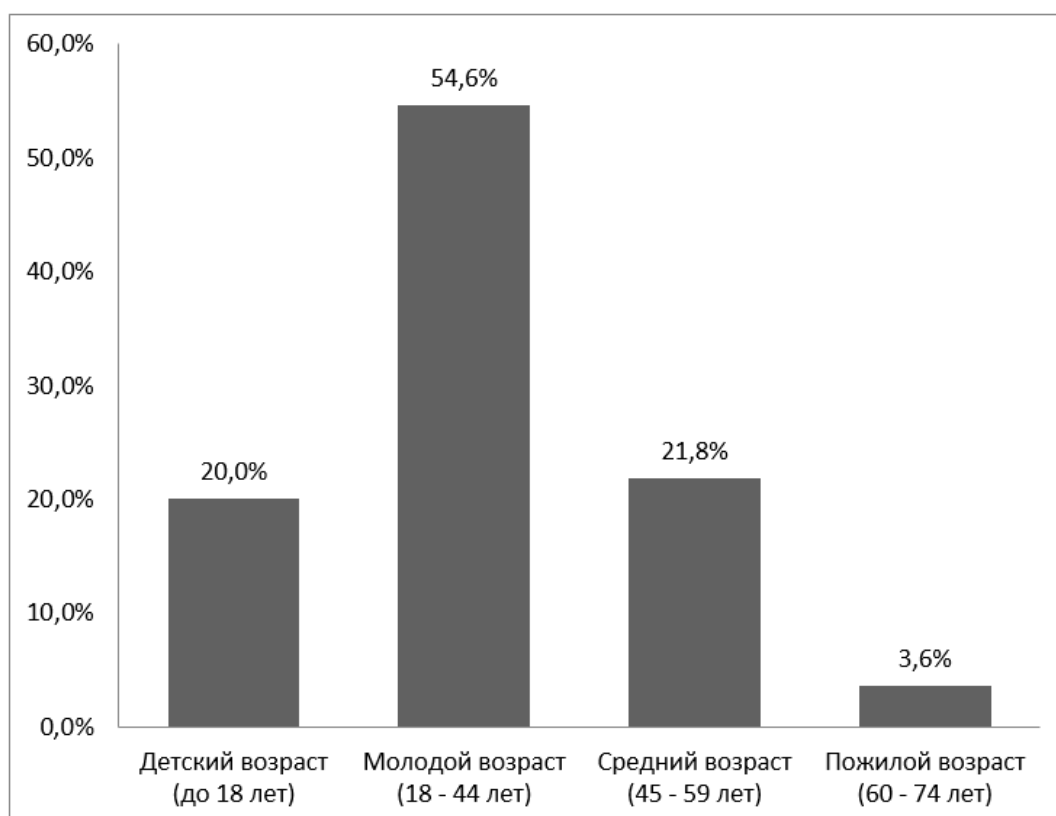


Рисунок 1 – Распределение пациентов, нуждавшихся в трансплантации ГСК, по возрастным категориям

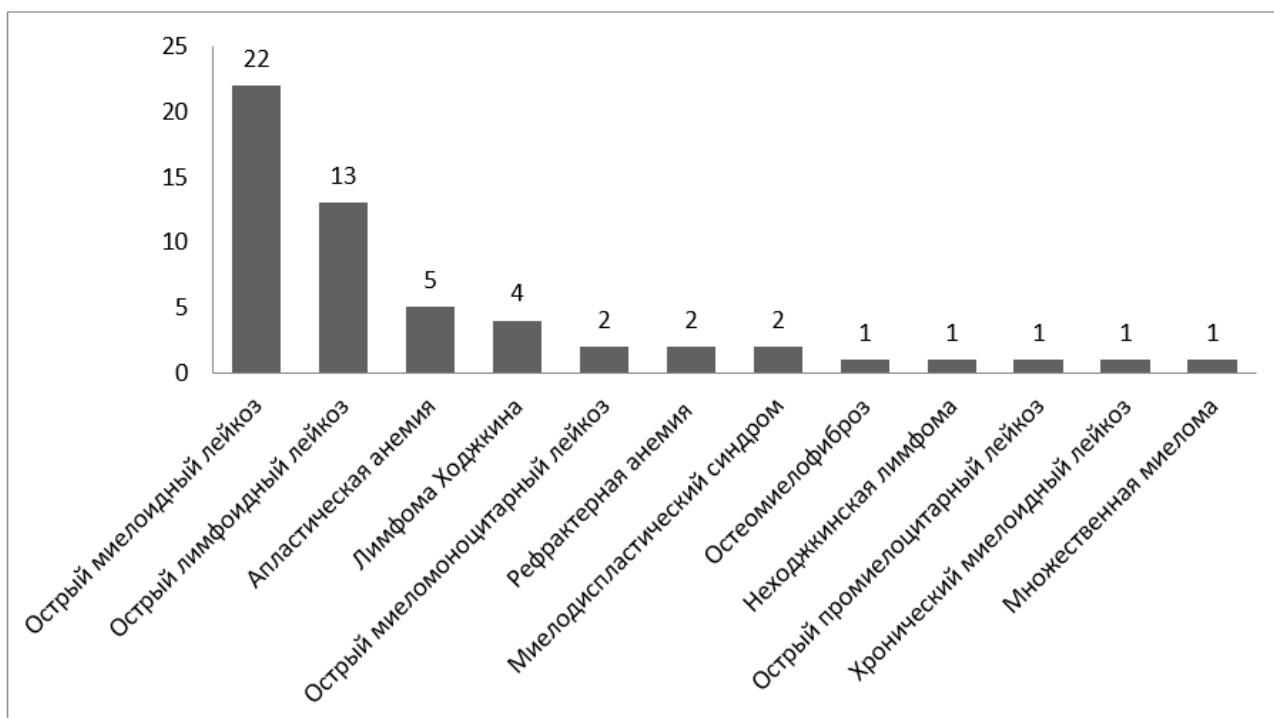


Рисунок 2 – Распределение пациентов, нуждавшихся в трансплантации ГСК, по нозологиям

Подбор HLA-совместимых доноров осуществляли по 5 локусам – HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1. В соответствии со стандартами Европейской Федерации Иммуногенетики (EFI), совпадение HLA-аллелей донора и реципиента на уровне высокого разрешения констатировалось при наличии идентичной нуклеотидной последовательности экзонов 2 и 3 локусов HLA I класса, и 2 экзона локусов HLA II класса [5].

Стратегия подбора доноров для пациентов клиники представлена на рисунке 3.

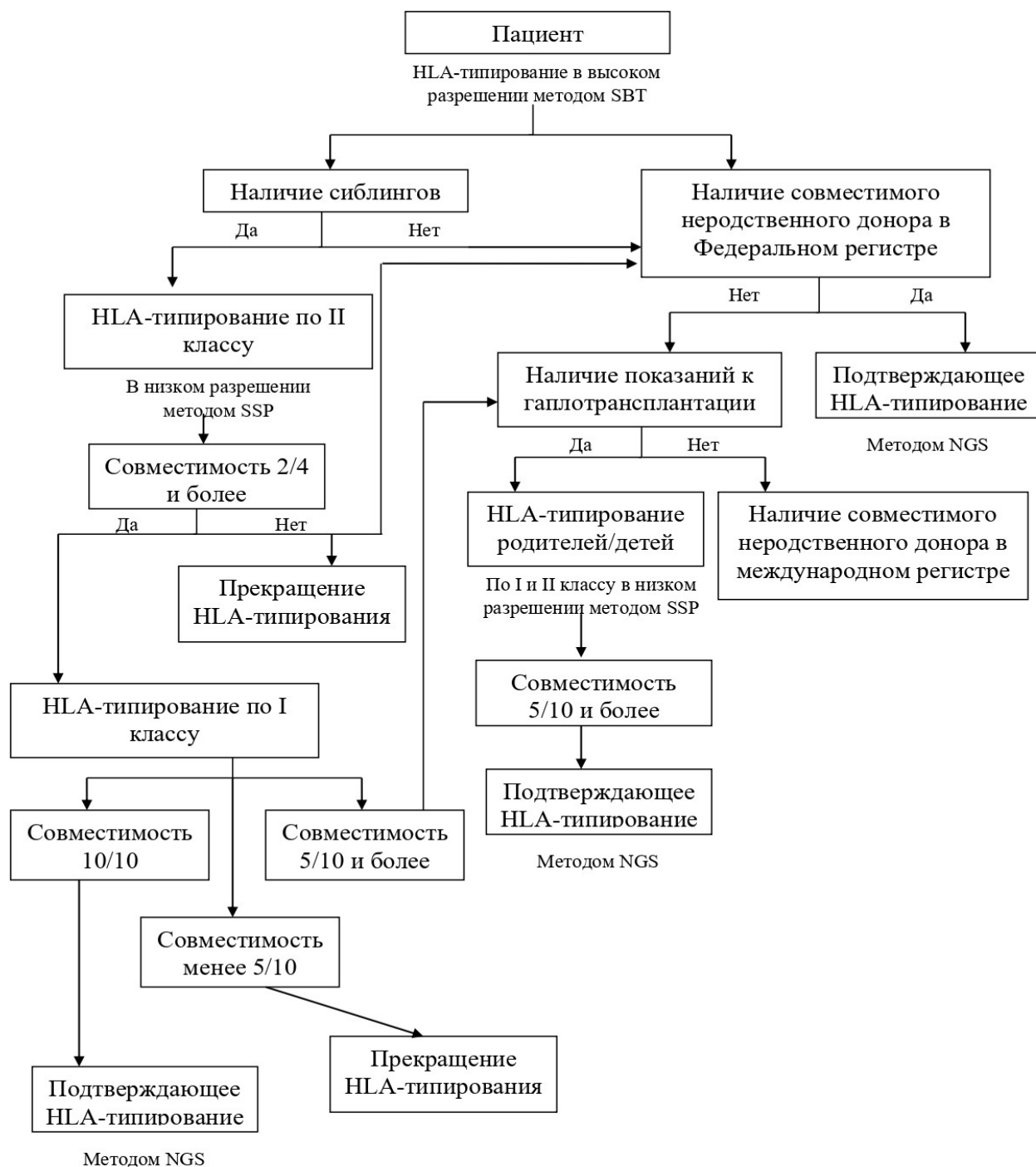


Рисунок 3 – Стратегия подбора доноров для пациентов, нуждавшихся в трансплантации ГСК

HLA-типирование пациентов проводили в высоком разрешении по технологии SBT (Sequence Based Typing) с использованием набора реагентов «PROTRANS S4, S3» («Protrans», Германия), результаты анализировали с помощью программного обеспечения «SeqPilot».

Родственных доноров типировали в низком разрешении по технологии SSP (Sequence Specific Primers) с использованием набора реагентов «HISTO TYPE SSP Kits» (BAG HEALTH CARE, Германия), анализ результатов осуществляли с помощью программного обеспечения «HISTO MATCH».

Подтверждающее HLA-типирование проводили по технологии NGS (Next Generation Sequencing) с использованием реагентов «PARAllele™ HLA solution v3» (ООО «ПАРСЕК ЛАБ», Россия). Анализ результатов осуществляли с помощью программного обеспечения «PARAllele HLA software» в автоматическом режиме.

Статистическая обработка данных проводилась с использованием программного обеспечения Microsoft Excel.

### **Результаты и обсуждения**

Донорами первого выбора для пациентов, нуждавшихся в трансплантации ГСК, являлся полностью совместимый (10/10 HLA-аллелей) сиблинг – родной брат или сестра. В ходе исследования установлено, что 36 пациентов (65,5%) имели по одному или более сиблингов. При подборе потенциального родственного донора протипировано 47 человек: для 21 донора (38,2%) исследование прекращалось на этапе изучения локусов II класса, 11 доноров были полностью совместимы с пациентами (10/10). Таким образом, 10 пациентов клиники (18,2%) имели полностью совместимых сиблингов (10/10), один из которых имел двух совместимых сиблингов.

Для всех пациентов проводился поиск неродственных доноров в Федеральном регистре доноров костного мозга и гемопоэтических стволовых клеток, по результатам которого 10/10 совместимые доноры найдены для 24 пациентов (43,6%), 21 из которых не имел полностью совместимых родственных доноров. Также найдены доноры для 28 (50,9%) пациентов с совместимостью 9/10, из которых 11 пациентов не имели полностью совместимых доноров и показаний к гаплотрансплантации. Поиск неродственных доноров в Федеральном регистре доноров костного мозга и гемопоэтических стволовых клеток не принес результатов для 3 пациентов.

При отсутствии полностью совместимого родственного/неродственного донора гаплотрансплантация ГСК показана 17 пациентам клиники

(30,9%), для которых протипированы 20 родственных доноров, являвшихся родителями или детьми, все оказались гаплоидентичны. Как правило, гаплотрансплантация назначается при отсутствии полностью совместимых доноров пациентам детского и молодого возраста с острыми лейкозами (15 пациентов) и лимфомами (2 пациента), при которых необходимо максимально сократить время подбора донора.

## **Выводы**

1. Установлено, что 18,2% пациентов обследованной когорты имели полностью совместимых (10/10) сиблингов.
2. Для 43,6% пациентов удалось найти полностью совместимых неродственных доноров в Федеральном регистре доноров костного мозга и гемопоэтических стволовых клеток.

## **Список литературы**

1. Абдрахимова, А.Р. HLA-гены и гаплотипы у башкир – доноров гемопоэтических стволовых клеток регистра ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, типированных методом NGS [Текст] / А.Р. Абдрахимова, Е.А. Леонов, Е.Г. Хамаганова // Вестник гематологии. - 2019. - Том 15. - №4. - С.28.
2. Афанасьев, Б.В. Выбор донора при аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток [Текст] / Б.В. Афанасьев, Л.С. Зубаровская, А.Л. Алянский [и др.] // Российский журнал детской гематологии и онкологии. - 2016. - Том 3. - № 3. - С. 30-36.
3. Кокорев О.В., Чердынцева Н.В., Зайцев К.В., Волгушев С.В. Теоретические и практические аспекты трансплантации стволовых клеток в онкологии // Сибирский онкологический журнал. – 2005. – № 4 (16). – С. 53–61.
4. Hollingsworth CL, Frush DP, Kurtzburg J, Prasad VK. Pediatric hematopoietic stem cell trans-plantation and the role of imaging // Radiology. – 2008 Aug. – 248(2). – С.348-65.
5. URL: <https://efi-web.org/committees/standards-committee> [Электронный ресурс] (дата обращения 01.06.2023).

УДК 616-006.441

ГРНТИ 76.29.33

*Т.Н. Рыболовлева*

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», Киров  
младший научный сотрудник лаборатории клеточной и молекулярной иммунологии

*T.N. Rybolovleva*

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical and Biological Agency, Kirov  
Junior Researcher of the Laboratory of Cellular and Molecular Immunology  
E-mail: rybolovleva@niigpk.ru

*Е.В. Трезубова*

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», Киров  
младший научный сотрудник лаборатории клеточной и молекулярной иммунологии

*E.V. Tregubova*

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical and Biological Agency, Kirov  
Junior Researcher of the Laboratory of Cellular and Molecular Immunology  
E-mail: tregubova@niigpk.ru

*Е.Л. Назарова*

Федеральное государственное учреждение науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», Киров  
к.м.н., заведующий лабораторией клеточной и молекулярной иммунологии

*E.L. Nazarova*

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of

Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical and  
Biological Agency, Kirov  
candidate of Medical Sciences, Head of the Laboratory of Cellular and Molecular  
Immunology  
E-mail: nazarova@niigpk.ru

*Е.С. Фокина*

Федеральное государственное учреждение науки «Кировский  
научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови  
Федерального медико-биологического агентства», Киров  
к.м.н., врач-гематолог взрослого отделения гематологии и химиотерапии,  
заместитель начальника отдела организации и сопровождения научных  
исследований

*E.S. Fokina*

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of  
Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical and  
Biological Agency, Kirov  
candidate of Medical Sciences, Hematologist of Adult Department of Hematology  
and Chemotherapy, Deputy Head of Organization and  
Support of Scientific Research Department  
E-mail: fokina@niigpk.ru

*И.А. Докшина*

Федеральное государственное учреждение науки «Кировский  
научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови  
Федерального медико-биологического агентства», Киров  
к.м.н., врач-гематолог взрослого отделения гематологии и химиотерапии

*I.A. Dokshina*

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of  
Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical and  
Biological Agency, Kirov  
candidate of Medical Sciences, Hematologist of Adult Department of Hematology  
and Chemotherapy  
E-mail: dokshina@niigpk.ru

## Оценка уровня свободно циркулирующей ДНК у онкогематологических больных

### Assessment of the circulating cell free DNA in oncohematological patients

*Аннотация.* Количественный анализ свободно циркулирующей ДНК (сцДНК) может быть дополнительным маркером в дебюте заболевания для дальнейшей оценки прогноза течения злокачественных новообразований системы крови. Проанализировано изменение уровня сцДНК плазмы крови у онкогематологических больных. Показано, что у пациентов с гемобластомами на различных этапах терапии концентрация данного показателя значительно выше, чем у здоровых лиц, что может служить маркером наличия и прогрессирования опухолевого процесса.

*Abstract.* Quantitative analysis of circulating cell free DNA (cfDNA) can be the additional marker in the disease onset or to assess the prognosis of the leukemia and lymphoma. Dynamics in the cfDNA blood plasma levels in patients with oncohematological diseases were analyzed. It has been shown that in patients with hematological malignancies in different types of disease, the cfDNA concentration is significantly higher than in healthy individuals, which can serve as a marker for the presence and progression of a tumor growth.

*Ключевые слова.* Жидкостная биопсия; свободно циркулирующая ДНК; лейкоз; лимфома.

*Index terms.* Liquid biopsy; circulating cell free DNA; leukemia; lymphoma.

**Введение.** Онкогематологические заболевания – это обширная группа новообразований кроветворной и лимфоидной тканей, которая включает в себя гетерогенные по морфологическим, морфометрическим, иммунофенотипическим, клиническим проявлениям и генетическим событиям процессы. На долю лимфо-пролиферативных заболеваний (ЛПЗ) приходится около 6% ежегодно регистрируемых злокачественных заболеваний. Этот показатель варьирует в зависимости от возраста, пола, географических регионов, этнической и расовой принадлежности. Одной из проблем в лечении ЛПЗ остается оценка глубины ремиссии по окончании противоопухолевой терапии. Для этих целей рекомендуется использование позитронно-эмиссионной томографии, совмещенной с компьютерной томографией (ПЭТ/КТ) [1]. Метод имеет свои недостатки, включая высокую стоимость и возможное наличие ложноположительных результатов, обусловленных инфекционными осложнениями или ранним выполнением ПЭТ/КТ после проведения химиотерапии [2].



При анализе характеристик опухолевого клона и терапевтическом мониторинге гемобластозов с преимущественной локализацией опухолевых клеток в костном мозге (например, острые лейкозы, множественная миелома) эффективность лечения оценивается на основании морфологических, иммунофенотипических и молекулярно-генетических данных, полученных при исследовании аспиратов костного мозга [3, 4].

В связи с этим большое значение имеет разработка малоинвазивных методов отслеживания динамики опухолевого роста в реальном времени. Жидкостная биопсия, основанная на определении свободно циркулирующих нуклеиновых кислот в плазме или сыворотке крови, может стать дополнительным информативным прогностическим маркером прогрессирования или достижения ремиссии у больных со злокачественными заболеваниями системы крови.

Свободная циркулирующая ДНК (сцДНК) представляет собой фрагменты двойных цепей ДНК, которые могут быть обнаружены в любых биологических жидкостях организма. Размер этих фрагментов составляет около 50-200 пар оснований (в редких случаях до нескольких тысяч пар). Концентрация свободно циркулирующих нуклеиновых кислот в плазме крови человека обычно низкая и варьирует от 0 до 100 нг/мл [5]. Основными механизмами, приводящими к появлению сцДНК, являются апоптоз клеток, некроз тканей или активная секреция экзосомальной ДНК ядерными клетками в кровоток. На примере солидных опухолей показано, что концентрация сцДНК значительно выше у онкологических больных по сравнению с группой условно здоровых лиц [6-8]. Большинство исследований посвящено изучению прогностической значимости сцДНК у пациентов с солидными опухолями [7, 8]. Сообщений о роли внеклеточных нуклеиновых кислот при гемобластозах не так много [9-11]. Рядом зарубежных авторов установлено, что количественный анализ свободно циркулирующих нуклеиновых кислот может быть дополнительным маркером неблагоприятного течения и ранним предиктором рецидива заболевания [12, 13].

**Цель.** Проанализировать изменение уровня сцДНК плазмы крови у онкогематологических больных на разных этапах течения заболевания и определить значение мониторинга данного показателя.

**Материалы и методы.** Материалом для исследований служили 32 образца плазмы крови пациентов с гемобластозами. Обследовано 15 (46,9%) мужчин и 17

(53,1%) женщин с медианой возраста 44 ( $Q_1$ - $Q_3$ : 36-62) года. Из них 3 (9,4%) пациента с лимфомой Ходжкина (ЛХ), 13 (40,6%) – с диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомой (ДВКЛ), 7 (21,8%) – с множественной миеломой (ММ), 2 (6,3%) – с экстранодальной лимфомой маргинальной зоны, ассоциированной с лимфоидной тканью слизистых оболочек (MALT-лимфома), 3 (9,4%) — с фолликулярной лимфомой (ФЛ), 4 (12,5%) — с острыми лейкозами (ОЛ). Диагнозы устанавливали врачи-гематологи на основании общепринятых критериев [1, 3, 4]. Забор образцов крови у пациентов в дебюте заболевания (n=11) осуществляли до проведения специфического лечения. В случаях, когда больным проводили химиотерапию (n=21), забор крови выполняли не ранее, чем на 10 сутки после терапии с одновременным сбором информации об оценке ответа на лечение.

Для сравнения использовали образцы периферической крови 24 лиц, не имевших гематологических заболеваний, с медианой возраста 35,5 ( $Q_1$ - $Q_3$ : 31,5 - 40) лет. Группу сравнения составили 19 (79,2%) мужчин и 5 (20,8%) женщин.

Выделение сцДНК проводили из плазмы периферической крови с помощью набора реагентов «SileksMagNA-Direct» (ООО «Силекс», Россия). Концентрацию сцДНК (комплекс фрагментов длиной 91 п.н. и 211 п.н.) определяли с использованием набора «Quantum DNA» (ЗАО Евроген, Россия).

Статистическую обработку результатов исследования осуществляли с использованием программы STADIA. Полученные данные представлены в виде медиан (Me) с интерквартильным размахом ( $Q_1$ - $Q_3$ ). Индекс деградации образцов сцДНК оценивали как соотношение концентраций коротких (91 п.н.) и длинных (211 п.н.) ампликонов. При поиске различий количественных показателей использовали непараметрический критерий Манна-Уитни, при сравнении данных в 3 и более группах — критерий Краскела-Уоллиса. Связь уровня сцДНК и индекса деградации оценивали с помощью коэффициента ранговой корреляции Спирмена. Различия считали достоверными при  $p < 0,05$ .

### **Результаты исследований**

У больных гемобластозами (n=32) концентрация фрагментов сцДНК длиной 91 п.н. составила 81 (37,5-469) нг/мл, тогда как у условно здоровых лиц значительно меньше - 13 (5-24,5) нг/мл ( $p < 0,001$ ). При сравнении содержания более крупных фрагментов сцДНК (211 п.н.) также выявлены значимые отличия: у онкогематологических больных этот показатель составил 48,5 (16,5-148,5) нг/мл, в

группе сравнения — 5,0 (2,0-9,5) нг/мл ( $p < 0,001$ ).

Больные гемобластозами разделены на 3 группы: в первую вошли 11 (34,4%) пациентов в дебюте заболевания, во вторую — 17 (53,1%) наблюдаемых в стадии ремиссии патологического процесса (полный ответ на терапию), в третью — 4 (12,5%) в период рецидива заболевания. При сравнении концентраций фрагментов сцДНК разных длин у пациентов и условно здоровых лиц установлены значимые различия,  $p < 0,001$  (таблица 1).

Таблица 1 - Содержание различных фрагментов сцДНК у онкогематологических больных

Номер п/п	Исследуемая группа, число обследованных (n)	СцДНК 91 п.н., нг/мл Ме [Q1-Q3]	p	СцДНК 211 п.н., нг/мл Ме [Q1-Q3]	p
1	Пациенты с гемобластозом <i>de novo</i> , n=11	896 [231-964]	<p><math>p &lt; 0,001^*</math></p> <p><math>p_{1-2} = 0,024^*</math></p> <p><math>p_{1-3} = 1,000</math></p> <p><math>p_{1-4} &lt; 0,001^*</math></p> <p><math>p_{2-3} = 0,044^*</math></p> <p><math>p_{2-4} &lt; 0,068</math></p> <p><math>p_{3-4} = 0,012^*</math></p>	119 [44-226]	<p><math>p &lt; 0,001^*</math></p> <p><math>p_{1-2} = 0,118</math></p> <p><math>p_{1-3} = 1,000</math></p> <p><math>p_{1-4} &lt; 0,001^*</math></p> <p><math>p_{2-3} = 0,054</math></p> <p><math>p_{2-4} &lt; 0,044^*</math></p> <p><math>p_{3-4} = 0,010^*</math></p>
2	Пациенты в ремиссии заболевания, n=17	40 [22-87]		17 [8-58]	
3	Пациенты с рецидивом заболевания, n=4	310 [61-1527]		123 [36-273]	
4	Группа сравнения, n=24	13 [5-25]		5 [2-9,5]	

\* - различия показателей статистически значимы ( $p < 0,05$ )

В группе пациентов с гемобластозом *de novo* уровни сцДНК были значимо выше, чем в группе сравнения ( $p_{1-4} < 0,001$ ) и у наблюдаемых в стадии ремиссии заболевания (для фрагментов 91 п.н.  $p_{1-2} < 0,024$ ). У больных с рецидивом патологического процесса также установлено повышение концентрации внеклеточной ДНК по сравнению с условно здоровыми лицами (для фрагментов 91 п.н.  $p_{3-4} = 0,012$ , для фрагментов 211 п.н.  $p_{3-4} = 0,010$ ) и пациентами в ремиссии в случае оценки коротких ампликонов 91 п.н. ( $p_{2-3} = 0,044$ ). Значимые различия между группой наблюдаемых в ремиссии и группой сравнения выявлены при оценке уровней длинных ампликонов 211 п.н. ( $p_{2-4} < 0,044$ ).

В связи с высоким содержанием сцДНК у пациентов 1 и 3 групп их объ-

единили для дальнейших исследований (n=15). Отдельную группу составили больные с ремиссией процесса (n=17). Концентрация сцДНК 91 п.н. у пациентов в дебюте / рецидиве заболевания составила 545 (83,5-964) нг/мл, в ремиссии - 40 (22-87) нг/мл (p=0,009). Уровень сцДНК 211 п.н. у больных с de novo или в рецидиве гемобластоза установлен на уровне 119 (42,5-222,5) нг/мл, в ремиссии заболевания - 17 (8-58) нг/мл (p=0,037).

Оценку концентраций сцДНК и степень ее фрагментации удалось осуществить у 15 пациентов с ЛПЗ в дебюте заболевания или рецидиве. В данную когорту вошли больные ДВКЛ, ММ, МАЛТ-лимфомой и ФЛ. У всех пациентов наблюдались высокие уровни сцДНК (таблица 2).

Таблица 2 - Содержание и степень фрагментации сцДНК у пациентов с лимфопролиферативными заболеваниями

Диагноз	Концентрация фрагментов сцДНК, нг/мл		Степень фрагментации сцДНК
	Длиной 91 п.н., Ме [Q1-Q3]	Длиной 211 п.н., Ме[Q1-Q3]	Ме [Q1-Q3]
ДВКЛ(n=7)	896 [310-949,5]	197 [75-22,5]	3,33 [2,67-3,56]
ММ (n=3)	957 [502-1732]	36 [29-192]	7,21 [4,67-16,9]
МАЛТ-лимфома (n=2)	228 [63-393]	85,5 [52-119]	2,25 [1,21-3,3]
ФЛ(n=3)	369 [230-670]	129 [82,5-191]	2,86 [2,71-3,35]

Уровень деградации сцДНК представлен в виде отношения концентрации коротких (91 п.н.) к более длинным фрагментам нуклеиновых кислот (211 п.н.). При их сравнении у условно здоровых лиц и пациентов с заболеваниями системы крови установлено усиление фрагментации у больных: 2,0 (0,7-4,3) против 3,3 (2,6-3,7), p=0,028. Данный показатель также выше у пациентов в дебюте заболевания и в рецидиве (3,3) по отношению к данным больных в ремиссии (2,3), p=0,03.

Установлена прямая корреляционная связь повышения концентрации сцДНК фрагментов 91 п.н. и уровня деградации у больных в дебюте / рецидиве заболевания, определенная с помощью коэффициента Спирмена (ρ=0,727, p=0,011). Таким образом, увеличение содержания внеклеточной сцДНК пациентов с гемобластозами происходит преимущественно за счет образования коротких ампликонов.

**Обсуждение.** Свободно циркулирующие нуклеиновые кислоты могут нахо-

даться в плазме и сыворотке крови как в несвязанном виде, так и в форме комплексов с протеинами, гистонами или компонентами клеточных стенок. Для выделения сцДНК чаще используют плазму, т.к. в сыворотке крови ее уровень будет повышен из-за возможного присутствия геномной ДНК. Установлено, что концентрация нуклеиновых кислот значительно увеличивается при хранении цельной крови в течение 6 и более часов при 4°C. В то же время длительное хранение цельной крови до момента выделения плазмы может приводить к разрушению фрагментированной ДНК в связи с ее крайней нестабильностью. Поэтому ее обработку необходимо осуществлять непосредственно после поступления материала в лабораторию [14]. В данной работе подготовку материала для исследования проводили в течение 2 часов после взятия крови. В связи с этим процедура подготовки плазмы и непосредственно процесс выделения внеклеточной ДНК из нее являются одними из важнейших стадий, обеспечивающих эффективность дальнейшего анализа.

До сих пор остается открытым вопрос о механизмах появления сцДНК в биологических жидкостях человека. Основными процессами считаются апоптоз, некроз и активное высвобождение ДНК клетками. Однако следует учитывать, что для опухолевых клеток характерен блок апоптоза [15]. В представленном исследовании уровни сцДНК в плазме крови онкогематологических больных значительно выше, чем у условно здоровых лиц (для фрагментов длиной 91 п.н. в 6,2 раза, для фрагментов 211 п.н. в 9,8 раз),  $p < 0,001$ .

Повышение концентрации суммарной сцДНК может отражать появление не только циркулирующей опухолевой ДНК, но и наблюдаться при других состояниях, включая инфекции или влияние химиотерапевтических препаратов, индуцирующих выброс сцДНК в кровоток. Поэтому в данной работе содержание сцДНК у пациентов оценивали до лечения (на момент диагностики заболевания) или не ранее, чем через 10 дней после окончания терапии. При последующем сравнении групп концентрация фрагментов сцДНК длиной 91 п.н. у онкогематологических больных в дебюте заболевания / рецидиве была выше в 13,6 раз, чем у наблюдаемых в состоянии ремиссии ( $p = 0,009$ ). Уровень сцДНК с размерами фрагментов 211 п.н. у пациентов с заболеванием *de novo* в 7 раз больше, чем у лиц в период ремиссии ( $p = 0,037$ ). Наиболее высокие уровни сцДНК длиной 91 п.н. установлены у пациентов с ММ (957 нг/мл) и с ДВКЛ (896 нг/мл).

При анализе уровня фрагментации сцДНК выявлена повышенная дегра-

дация циркулирующей ДНК у больных гемобластозами ( $p=0,028$ ). Тенденция к увеличению количества коротких фрагментов сцДНК установлена у пациентов в момент установления диагноза и рецидива по сравнению с данными больных в ремиссии заболевания ( $p=0,03$ ). Показана прямая корреляционная связь между повышением уровня сцДНК 91 п.н. и степенью фрагментации ( $r=0,727$ ,  $p=0,011$ ). Согласно М. Li и соавт., 2017 г. индекс распада сцДНК у пациентов с ДВКЛ, ЛХ и Т-клеточной лимфомой коррелировал с рядом клинических параметров (продвинутая стадия заболевания, наличие В-симптомов, повышение концентрации лактатдегидрогеназы), которые ассоциированы с худшим прогнозом [12]. Авторами сделан вывод, что показатель фрагментации внеклеточной ДНК может отражать присутствие активно пролиферирующих клеток. Возможно, значение деградации сцДНК может быть использовано при мониторинге терапии онкогематологических больных и являться ранним прогностическим маркером рецидива заболевания наряду с результатами определения концентраций свободно циркулирующей ДНК.

**Выводы.** Жидкостная биопсия и определение уровня сцДНК является одним из дополнительных перспективных способов оценки течения онкогематологических заболеваний и эффективности терапии. У пациентов с гемобластомами концентрация сцДНК значительно выше, чем у здоровых лиц. Увеличение уровня сцДНК за счет коротких фрагментов внеклеточных нуклеиновых кислот установлено у всех больных на этапе диагностики и при рецидиве заболевания. Наибольшие концентрации циркулирующей ДНК в плазме определены при ММ и ДВКЛ. У пациентов при достижении ремиссии заболевания уровни сцДНК снижались. Таким образом, мониторинг уровня сцДНК в плазме крови у больных с гемобластомами может быть использован для оценки эффективности специфической терапии.

## Список литературы

1. Клинические рекомендации. Агрессивные нефолликулярные лимфомы-диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома, первичная медиастинальная В-клеточная лимфома, лимфома Беркитта [Разработчик: Российское общество онкогематологов, Ассоциация содействия развитию гематологии и трансплантации костного мозга «Национальное гематологическое общество», Ассоциация онкологов России, Национальное общество детских гематологов и онкологов, 2022] – Москва, 2022. - Текст: электронный. - URL: [https://npngo.ru/biblioteka/klinicheskie\\_rekomendatsii\\_\\_2022\\_god](https://npngo.ru/biblioteka/klinicheskie_rekomendatsii__2022_god)
2. Свободно циркулирующая ДНК в плазме у пациентов с диффузной В-крупноклеточной лимфомой и В-клеточной лимфомой высокой степени злокачественности («doublehit»/«triplehit») / С.Ю. Смирнова, Е.Е. Никулина, Н.Г. Габеева [и др.]. - DOI: 10.21320/2500-2139-2023-16-2-200-208. - Текст: непосредственный // Клиническая онкогематология. - 2023. - Т. 16, № 2. - С. 200–208.
3. Клинические рекомендации. Острые миелоидные лейкозы [Разработчики: Ассоциация содействия развитию гематологии и трансплантологии костного мозга «Национальное гематологическое общество», Общероссийский национальный союз “Ассоциации онкологов России” 2022] – Москва, 2022. - Текст: электронный. - URL: [https://npngo.ru/biblioteka/klinicheskie\\_rekomendatsii\\_\\_2022\\_god](https://npngo.ru/biblioteka/klinicheskie_rekomendatsii__2022_god)
4. Клинические рекомендации. Множественная миелома [Разработчики: Ассоциация онкологов России, Национальное гематологическое общество, Российское профессиональное общество онкогематологов, 2020] - Москва, 2022. - Текст: электронный. - URL: [https://npngo.ru/biblioteka/klinicheskie\\_rekomendatsii\\_\\_2019\\_god](https://npngo.ru/biblioteka/klinicheskie_rekomendatsii__2019_god)
5. Lim, J. Role of cell-free DNA in haematological malignancies / J. Lim, B. Kuss, D. Talaulikar. - DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pathol.2021.01.004>. - Текст: непосредственный // Pathology. - 2021. - V. 53, № 3. - P. 416–426.
6. Schwarzenbach, H Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients / H. Schwarzenbach, D. Hoon, K. Pantel. - Текст: непосредственный // Nat Rev Cancer. - 2011. - V. 11. - P. 426–437.
7. Maia, M. Harnessing cell-free DNA: plasma circulating tumour DNA for liquid biopsy in genitourinary cancers / M. Maia, M. Salgia, S. Pal. - doi.org/10.1038/s41585-020-0297-9. - Текст: непосредственный // Nature Reviews. UROLOGY. - 2020. - V.17. - P. 271-291.
8. Cell-Free DNA as a prognostic biomarker for monitoring muscle-invasive bladder cancer / R. Carrasco, M. Torres, A. Gómez [et al.]. - doi.org/10.3390/ijms231911732. - Текст: электронный // Int. J. Mol. Sci. - 2022. - V. 23. - P. 11732. - URL: <https://www.mdpi.com/1422-0067/23/19/11732>

9. Melani, C. Monitoring clinical outcomes in aggressive B-cell lymphoma: From imaging studies to circulating tumor DNA / C. Melani, W.H. Wilson, M. Roschewski. - DOI: 10.1016/j.beha.2018.07.004. - Текст: непосредственный // Best Practice & Research Clinical Haematology — 2018. - V. 31, № 3. - P. 285–292.
10. Dynamics of tumor-specific cfDNA in response to therapy in multiple myeloma patients // D. Vrabel, L. Sedlarikova, L. Besse [et al.]. - DOI: 10.1111/ejh.13358. - Текст: непосредственный // Eur J Haematol. - 2020. - V. 104, № 3. - P. 190–197.
11. Monitoring multiple myeloma in the peripheral blood based on cellfree DNA and circulating plasma cells // E. Mack, S. Hartmann, P. Ross [et al.]. - doi: 10.1007/s00277-022-04771-5. - Текст: непосредственный // Ann. Hematol. - 2022. - V. 101, № 4. - P. 811-824.
12. Assessment of the circulating cell-free DNA marker association with diagnosis and prognostic prediction in patients with lymphoma: a single-center experience / M. Li, Y. Jia, J. Xu [et al.]. - doi: 10.1007/s00277-017-3043-5. - Текст: непосредственный // Ann. Hematol. - 2017/ - V. 96, № 8. - P. 1343–1351.
13. Cell-free circulating DNA in Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphomas / S. Hoehaus, M. Giachelia, G. Massini [et al.]. - doi: 10.1093/annonc/mdp006. – Текст: непосредственный // Ann. Oncol. - 2009. - V. 20, № 8. - P. 1408-1413.
14. Factors that influence quality and yield of circulating-free DNA: A systematic review of the methodology literature / R.M. Trigg, L.J. Martinson, S. Parpart-Li [et al.]. - doi: 10.1016/j.heliyon.2018.e00699. - Текст: электронный // Heliyon. - 2018. - V. 4, № 7 e00699. - URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30094369/>
15. About the possible origin and mechanism of circulating DNA Apoptosis and active DNA release / M. Stroun, J. Lyautey, C. Lederrey [et al.]. - doi: 10.1016/s0009-8981(01)00665-9. - Текст: электронный // Clin. Chim. Acta. - 2001. - V. 313. - P. 139-142. - URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11694251/>



УДК 616-006.441

ГРНТИ 76.29.33

*М.В. Сарпова*

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», Киров  
научный сотрудник лаборатории патоморфологии

*M.V. Sarpova*

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agency,  
Kirov  
Researcher of the Laboratory of Pathomorphology  
E-mail: sarpova@niigpk.ru

*Д.А. Дьяконов*

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», Киров  
к.м.н., заведующий лабораторией патоморфологии

*D.A. Diakonov*

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agency,  
Kirov  
Candidate of Medical Sciences, Head of the Laboratory of Pathomorphology  
E-mail: dyakonov@niigpk.ru

*Е.В. Ванеева*

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», Киров  
к.б.н., научный сотрудник лаборатории патоморфологии

*E.V. Vaneeva*

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agency,  
Kirov

Candidate of Biological Sciences, Researcher of the Laboratory of Pathomorphology

E-mail: [vaneeva@niigpk.ru](mailto:vaneeva@niigpk.ru)

*V.A. Rosin*

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови

Федерального медико-биологического агентства», Киров

к.м.н, старший научный сотрудник лаборатории патоморфологии

*V.A. Rosin*

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agency,

Kirov

Candidate of Medical Sciences, Senior Researcher of the Laboratory of

Pathomorphology

E-mail: [rosin@niigpk.ru](mailto:rosin@niigpk.ru)

*S.B. Самарина*

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови

Федерального медико-биологического агентства», Киров

к.м.н., заведующая клинико-диагностическим отделением гематологии и

химиотерапии с дневным стационаром

*S.V. Samarina*

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agency,

Kirov

Candidate of Medical Sciences, Head of the Clinical Diagnostic Department of

Hematology and Chemotherapy with Day Hospital

E-mail: [samarina@niigpk.ru](mailto:samarina@niigpk.ru)

## Взаимосвязь коэкспрессии белков p14ARF и p53 с выживаемостью больных диффузной В-крупноклеточной лимфомой

### Association of Co-expression of p14ARF and p53 Proteins with Survival of Patients with Diffuse Large B-cell Lymphoma

*Аннотация.* Исследована взаимосвязь коэкспрессии белков p14ARF и p53 с общей и беспрогрессивной выживаемостью при диффузной В-крупноклеточной лимфоме. Обнаружено, что одновременное высокое содержание p14ARF- и p53-позитивных опухолевых клеток ( $p14ARF \geq 65\%$  и  $p53 \geq 36\%$ ) ассоциировано с низкими показателями выживаемости пациентов.

*Abstract.* The association of the co-expression of p14ARF and p53 proteins and overall and progression-free survival in diffuse large B-cell lymphoma was studied. It was found that the simultaneous high content of p14ARF- and p53-positive tumor cells ( $p14ARF \geq 65\%$  and  $p53 \geq 36\%$ ) are associated with low patient survival rates.

*Ключевые слова:* p14ARF; p53; иммуногистохимия; ДВККЛ; выживаемость.

*Index terms:* p14ARF; p53; immunohistochemistry; diffuse large B-cell lymphoma; survival.

**Введение.** Диффузная В-крупноклеточная лимфома (ДВККЛ) является частым лимфопролиферативным заболеванием, на ее долю приходится 30–40% всех неходжкинских лимфом. По данным классификации Всемирной организации здравоохранения (2017), в первой линии терапии рекомендовано лечение по протоколу R-СНОР [15]. Однако только у 60–70% пациентов достигается полный ответ, у 30–40% больных фиксируются резистентные формы или ранние рецидивы заболевания [10]. Неудачи первой линии терапии представляют значительную клиническую проблему, поскольку большинство пациентов, рефрактерных к лечению, умирают в течение трех лет. Для оценки индивидуального риска неблагоприятного течения ДВККЛ на протяжении многих лет используют международный прогностический индекс (МПИ) и его модификации. Тем не менее, данная шкала, по мнению ряда авторов, имеет ряд недостатков, поскольку базируется на клинических характеристиках болезни и не учитывает биологические характеристики опухоли [2]. В связи с этим актуален поиск дополнительных прогностических факторов, позволяющих уже на этапе диагностики спрогнозировать течение ДВККЛ. В последнее время активно ведется изучение предикторов неоплазии среди маркеров сигнальных путей [1;3].

Регуляторный путь p14ARF-Hdm2-p53, направленный на супрессию опухолевого роста, сдерживание клональной пролиферации и поддержание стабильности генома, инактивируется при большинстве злокачественных новообразований. Одним из его участников является протеин p14ARF, основная функция которого заключается в подавлении аберрантного роста клеток в ответ на активацию онкогенов. Взаимодействуя со множеством клеточных партнеров, он участвует в предотвращении роста поврежденных клеток как p53-зависимыми, так и независимыми путями [4;6;13]. Связывая и изолируя онкобелок HDM2 (MDM2), p14ARF способен стабилизировать и активировать ключевой опухолевый супрессор p53, запускающий блокировку развития патологического процесса через p53-зависимый путь. Действуя как хранитель генома, p53 способен индуцировать остановку клеточного цикла, старение или апоптоз, что позволяет поврежденным клеткам пройти необходимое восстановление или быть уничтоженными до необратимой трансформации, ведущей к малигнизации [8]. Снижение активности p14ARF и/или p53 может придавать неопластическим клеткам дополнительные селективные преимущества, в частности повышенную устойчивость к различным терапевтическим воздействиям.

К нарушению структур и функций протеинов p14ARF и p53 приводят различные механизмы, например, аберрации генов CDKN2A и TP53, локализованных в регионах 9p21 и 17p13 соответственно, или аномальное метилирование их промоторов. Известно, что мутации в гене TP53 и высокая экспрессия протеина p53 могут быть взаимосвязаны и являться предикторами неблагоприятного прогноза при ДВККЛ [9]. Гомозиготные делеции CDKN2A у пациентов с данной патологией ассоциированы с потерей p14ARF и неблагоприятным течением заболевания [5].

Известно, что экспрессия мРНК p14ARF увеличивается у пациентов с гемобластомами, особенно на ранней стадии хронического миелоидного лейкоза, что позволило предположить его участие в патогенезе данного заболевания [11]. Встречаются единичные исследования сверхэкспрессии p14ARF, выявленной при различных агрессивных В-клеточных лимфомах и ассоциированной с неблагоприятным прогнозом заболеваний [12]. По данным литературы, избыточное накопление белка p14ARF в клетках может быть обусловлено абберациями компонентов сигнального пути p14ARF-Hdm2-p53, в частности мутациями TP53, вследствие регулирования по принципу отрицательной обратной связи [7]. Су-

ществует мнение, что белок p14ARF помимо опухольсупрессирующей функции обладает проонкогенными свойствами [14].

В связи с тем, что протеины p14ARF и p53 являются значимыми компонентами одного из сигнальных путей при ДВККЛ, особый интерес представляет исследование прогностического значения их коэкспрессии.

**Цель исследования.** Определить взаимосвязь коэкспрессии белков p14ARF и p53 с выживаемостью больных ДВККЛ.

**Материалы и методы.** Использованы биопсийные образцы опухолевой ткани (парафиновые блоки/кассеты) 104 пациентов с впервые установленной ДВККЛ. Из них 49,0% (51/104) – мужчин, 51,0% (53/104) – женщин. Медиана возраста – 59 лет ( $Q_1$ - $Q_3$ :49-67 лет). Все обследованные получали первую линию терапии по схеме R-СНОР. Пятилетняя общая выживаемость (ОВ) пациентов составила 63,5%, пятилетняя беспродвижная выживаемость (БПВ) – 55,8%. Медиана наблюдения – 47 мес. ( $Q_1$ - $Q_3$ : 18-60 мес.). Для идентификации опухолевых клеток, положительных в реакциях с моноклональными антителами к p14ARF (поликлон CDKN2A/p14ARF) и p53 (клон DO7), использовали иммуногистохимический (ИГХ) метод исследования. Препараты оценивали под микроскопом Axio Scope.A1 («Carl Zeiss», Германия), оснащенным камерой для получения цифровых изображений препаратов. Подсчет относительного количества клеток, экспрессировавших p14ARF и p53, проводили с помощью двойного «слепого» анализа морфометрическим методом. Статистическую обработку данных выполняли, используя программное обеспечение SPSS Statistic 26. Корреляционную связь между количественными переменными исследовали с помощью коэффициента ранговой корреляции  $\rho$  Спирмена. Пороговый уровень p14ARF- и p53-позитивных опухолевых клеток вычисляли с помощью ROC-анализа. Выживаемость пациентов с ДВККЛ рассчитывали по методу Каплана-Мейера. Различия между показателями выживаемости установлены с применением log-rank теста. Риск наступления события вычисляли с помощью регрессионного анализа Кокса с расчетом отношения рисков (ОР) и 95% доверительного интервала (ДИ). Различия между показателями считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

**Результаты и их обсуждение.** Относительное количество опухолевых клеток, позитивных в реакциях с антителами к p14ARF и p53, варьировало в диапазоне от 0 до 96% и от 0 до 91 %, медианы – 73,7% ( $Q_1$ - $Q_3$ :22,0-83,5) и 35% ( $Q_1$ - $Q_3$ :13,0-59,0), соответственно. Корреляционная связь между содержанием p14ARF- и p53- экспрессирующих ядер статистически не значима ( $p=0,874$ ).

С помощью ROC-анализа вычислены оптимальные прогностически значимые пороговые уровни: для p14ARF показатель соответствовал 65% позитивных опухолевых клеток, для p53 – 36%. На основании установленных значений всех обследованных разделили на группы с низким (<65%) и с высоким (>65%) количеством клеток, положительных к p14ARF: 39,4% (41/104) и 60,6% (63/104) соответственно. В зависимости от уровня p53-позитивных опухолевых клеток всех пациентов распределили на группы с подпороговым (<36%) и надпороговым (>36%) значениями: 51,9% (54/104) и 48,1% (50/104) соответственно.

Пятилетняя ОВ обследованных с высокой долей p14ARF-экспрессирующих опухолевых клеток значимо ниже по сравнению с таковым показателем больных, имевших низкий уровень белок-позитивных кариоцитов: 52,4% против 80,5% соответственно (медиана не достигнута;  $p=0,007$ ; рисунок 1а). Пятилетняя БПВ ниже у пациентов с содержанием p14ARF-позитивных клеток  $\geq 65\%$ , чем у обследованных с низким (<65%) значением маркера: 42,9% (медиана 23 мес.) против 75,6% (медиана не достигнута;  $p=0,003$ ; рисунок 1б).

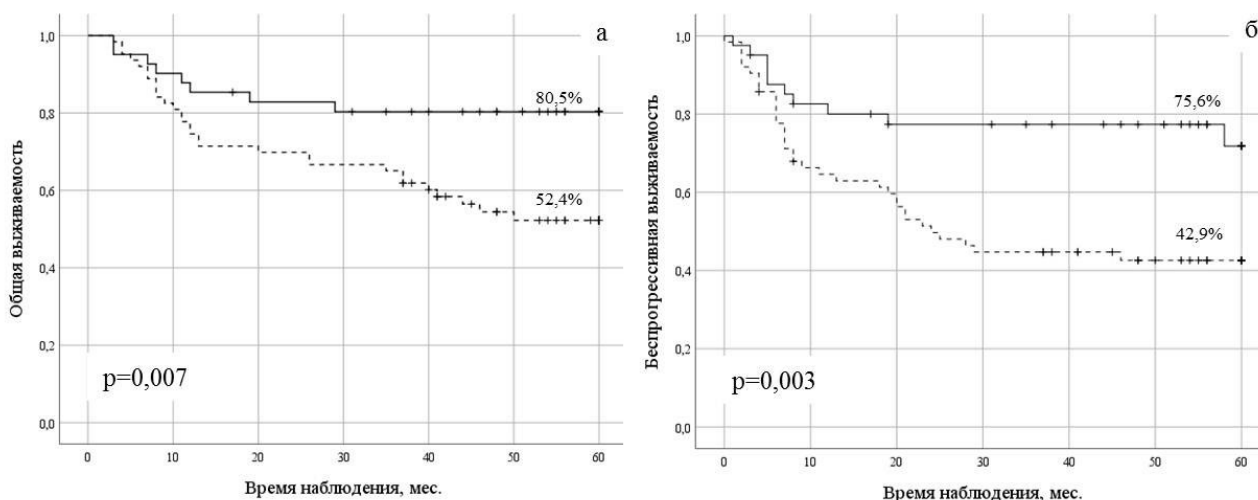


Рисунок 1 – Общая (а) и беспрогрессивная (б) выживаемость больных ДВККЛ с высоким (n=63; пунктирная линия) и низким (n=41; сплошная линия) содержанием p14ARF- экспрессирующих опухолевых клеток

Риск летального исхода и прогрессирования заболевания в 2,8 раза выше у больных ДВККЛ с высоким количеством p14ARF-положительных клеток, чем у пациентов с низкой экспрессией белка (ОР=2,8; 95% ДИ=1,26-6,02 и ОР=2,8; 95% ДИ=1,38-5,61, соответственно).

Пятилетняя ОВ в группе с надпороговым уровнем р53-экспрессирующих клеток значимо ниже такового показателя у больных с подпороговым значением маркера: 54,0% против 72,2% соответственно (медиана не достигнута;  $p=0,041$ ; рисунок 2а). Показатель БПВ значимо ниже у обследованных с  $p53>36\%$ , чем у лиц с  $p53<36\%$ : 46,0% (медиана 20 мес.) и 64,8% соответственно (медиана не достигнута;  $p=0,033$ , рисунок 2б).

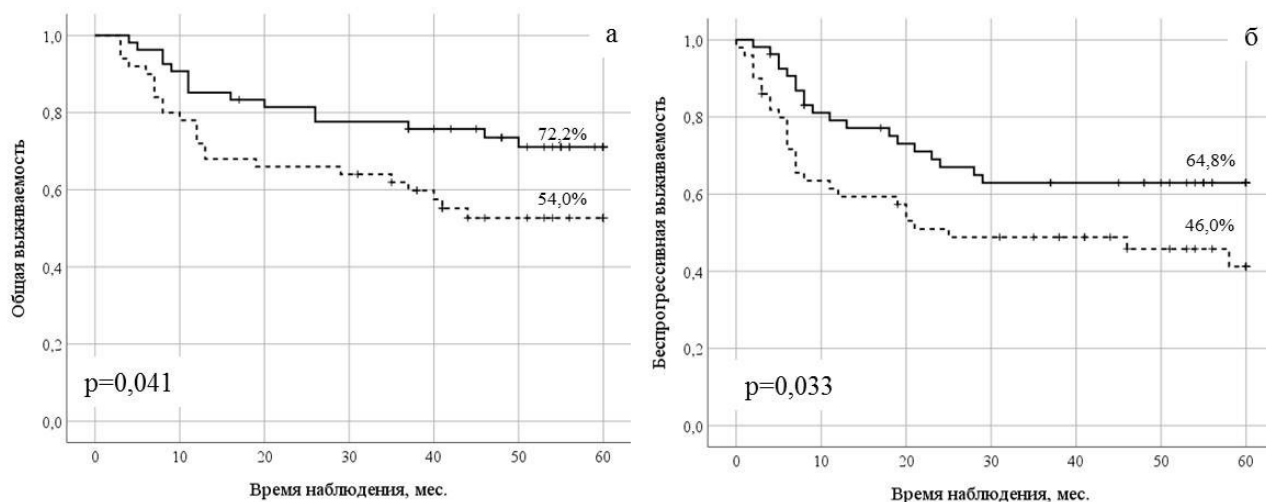


Рисунок 2 – Общая (а) и беспрогрессивная (б) выживаемость больных ДВККЛ с надпороговым ( $n=50$ ; пунктирная линия) и подпороговым ( $n=54$ ; сплошная линия) уровнем р53-позитивных клеток

Риск летального исхода и прогрессии неоплазии в 1,9 раза выше у пациентов с надпороговым количеством р53-экспрессирующих клеток, чем у пациентов с низким его уровнем ( $OR=1,9$ ; 95% ДИ=1,01-3,72 и  $OR=1,9$ ; 95% ДИ=1,04-3,36, соответственно). Полученные результаты согласуются с данными литературных источников [9;12].

Учитывая, что корреляционная связь между количеством р14ARF- и р53-положительных клеток статистически незначима, можно предположить, что данные маркеры не зависят друг от друга. Сочетанная высокая экспрессия маркеров р14ARF+ и р53+ зарегистрирована у 31 пациента, одновременно низкая экспрессия белков р14ARF- и р53- обнаружена у 22 больных. Комбинации р14ARF+ и р53- и р14ARF- и р53+ выявлены у 32 и 19 обследованных соответственно. При анализе отдаленных результатов терапии по протоколу R-CHOP установлено, что ОВ значимо выше у пациентов с низкими долями р14ARF- и

p53-положительных клеток (медиана не достигнута), чем у лиц с одновременно высоким их содержанием (медиана 41 мес.): 90,9% и 45,2%, соответственно ( $p=0,001$ , рисунок 3а). ОВ больных с низким количеством обоих маркеров выше (медиана не достигнута), чем у обследованных с изолированно-высокими показателями p14ARF или p53: 90,9% против 59,4% (медиана не достигнута,  $p=0,015$ ) и 90,9% к 68,4% соответственно ( $p=0,077$ ; рисунок 3б). Риск летального исхода заболевания увеличивался в 2,2 раза у пациентов с одновременным надпороговым уровнем p14ARF- и p53-позитивных опухолевых клеток, по сравнению с больными, не имевшими таких значений ( $p=0,013$ ; ОР=2,25; 95% ДИ=1,18-4,26).

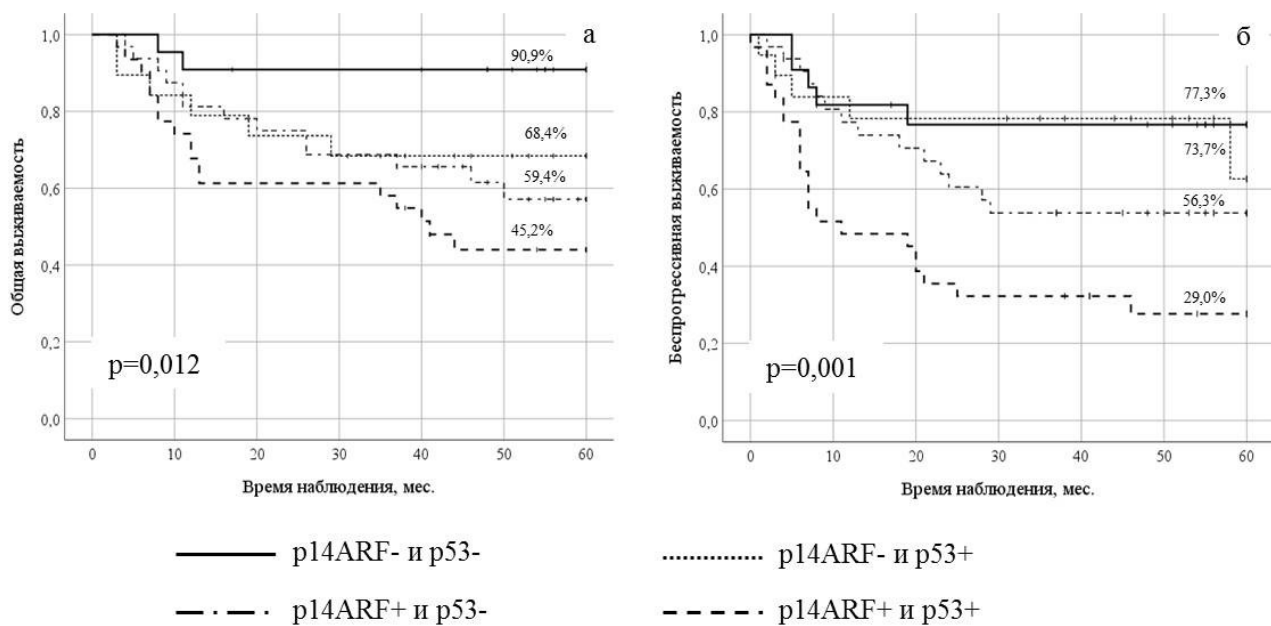


Рисунок 3 – Общая (а) и беспрогрессивная (б) выживаемость больных ДВККЛ с различным сочетанием p14ARF- и p53-позитивных клеток

Самая низкая БПВ установлена у больных с надпороговой долей p14ARF- и p53-экспрессирующих клеток и составила 29,0% (медиана 11 мес.). Данный показатель значимо ниже, чем у обследованных с изолированно высокими значениями p14ARF-позитивных клеток – 56,3% ( $p=0,017$ ), p53-экспрессирующих кариоцитов – 73,7% ( $p=0,008$ , рисунок 3б), а также значимо ниже, чем у больных с одновременными подпороговыми уровнями обоих исследованных маркеров – 77,3% ( $p=0,001$ ). Риск прогрессии ДВККЛ выше в 2,9 раза у пациентов с коэкспрессией  $p14ARF \geq 65\%$  и  $p53 \geq 36\%$ , чем у обследованных с другими сочетаниями маркеров ( $p < 0,001$ ; ОР=2,9; 95% ДИ=1,64-5,24).



**Заключение.** Одновременная высокая экспрессия p14ARF и p53 ассоциирована с низкими показателями ОБ и БПВ у пациентов с ДВККЛ. Высокая сочетанная коэкспрессия исследуемых маркеров может быть использована в качестве дополнительного прогностического патоморфологического предиктора неблагоприятного течения заболевания.

#### Список литературы

1. Значение экспрессии pAKT1 при диффузной В-крупноклеточной лимфоме / Е. В. Ванеева, В. А. Росин, Д. А. Дьяконов [и др.] // Бюллетень сибирской медицины. – 2021. – №3. – С. 6-13.
2. Клинико-гематологические показатели прогноза ответа на терапию первой линии у пациентов с диффузной В-крупноклеточной лимфомой / С. В. Самарина, Е. Л. Назарова, Н. В. Минаева [и др.] // Клиническая онкогематология. – 2019. – № 12. – С.68-72.
3. Оценка прогностического значения экспрессии pSTAT3 при диффузной В-крупноклеточной лимфоме на российской выборке пациентов / Е. В. Ванеева, В. А. Росин, Д. А. Дьяконов [и др.] // Сибирский научный медицинский журнал. – 2019. – Т.39. №5. – С. 125-133.
4. Cilluffo, D. P14ARF: The Absence that Makes the Difference / D. Cilluffo, V. Barra, A. Di Leonardo // Genes (Basel). – 2020. – Vol.11, I. 7. – P.824.
5. Diffuse large B-cell lymphomas with CDKN2A deletion have a distinct gene expression signature and a poor prognosis under R-CHOP treatment: a GELA study / F. Jardin, J. P. Jais, T. J. Molina [et al.] // Blood. – 2010. – Vol. 116, I. 7. - P. 1092-1104.
6. Dual Role of the Alternative Reading Frame ARF Protein in Cancer / R. Fontana, M. Ranieri, G. La Mantia, M. Vivo. // Biomolecules. – 2019. – Vol.9, I.3. – P. 87.
7. Kung C.P. It's Getting Complicated-A Fresh Look at p53-MDM2-ARF Triangle in Tumorigenesis and Cancer Therapy / C. P. Kung, J. D. Weber // Front Cell Dev Biol. – 2022. – № 10. – P. 818744.
8. Kasthuber, E. R. Putting P53 in Context / E. R. Kasthuber, S. W. Lowe // Cell. – 2017. – Vol. 170, I. 6. – P. 1062–1078.
9. Mutational profile and prognostic significance of TP53 in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with R-CHOP: report from an International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program Study / Z.Y. Xu-Monette, L. Wu, C. Visco [et al.] // Blood. – 2012. – Vol. 120, I. 19. –P. 3986–3996.
10. Long-term outcome of patients in the LNH-98.5 trial, the first randomized study comparing

rituximab-CHOP to standard CHOP chemotherapy in DLBCL patients: a study by the Groupe d'Etudes des Lymphomes de l'Adulte / B. Coiffier, C. Thieblemont, E. Neste [et al.] // Blood. – 2010. – Vol.116. – P. 2040–2045.

11. Overexpression of p16INK4a and p14ARF in haematological malignancies / Y.K. Lee, J.Y. Park, H.J. Kang, H.C. Cho // Clin. Lab. Haematol. – 2003. – №25. – P. 233–237.

12. P14ARF nuclear overexpression in aggressive B-cell lymphomas is a sensor of malfunction of the common tumor suppressor pathways / A. Sánchez-Aguilera, M. Sánchez-Beato, J.F. García [et al.] // Blood. – 2002. – Vol. 99, I. 4. – P.1411-1418.

13. The ARF tumor suppressor prevents chromosomal instability and ensures mitotic checkpoint fidelity through regulation of Aurora B. / E. M. Britigan, J. Wan, L.M. Zasadil [et al.] // Mol Biol Cell. – 2014. – Vol. 25, I. 18. – P. 2761-73.

14. The ARF tumor suppressor can promote the progression of some tumors / O. Humbey, J. Pimkina, J.T. Zilfou [et al.] // Cancer Res. – 2008. – Vol. 68, I. 23. – P. 9608-13.

15. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues / S. H. Swerdlow, E. Campo, N. L. Harris [et al.] // 4th ed. Lyon, France: IARC. - 2017.

УДК 616.419

ГРНТИ 75.03.39

*Д.Н. Смирнова*

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
«Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания  
крови Федерального медико-биологического агентства», Киров  
кандидат биологических наук, научный сотрудник научно-исследовательской  
лаборатории прикладной иммуногенетики

*D.N. Smirnova,*

The Federal State-Financed Scientific Institution  
Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion  
under the Federal Medical Biological Agency, Kirov  
PhD, researcher of the research laboratory of applied immunogenetics  
e-mail: smirnovadn@niigpk.ru

*М.А. Логинова*

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки

«Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания  
крови Федерального медико-биологического агентства», Киров  
доктор биологических наук, заведующий научно-исследовательской  
лабораторией прикладной иммуногенетики

*M.A. Loginova*

The Federal State-Financed Scientific Institution  
Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion  
under the Federal Medical Biological Agency, Kirov  
Doctor of Sciences in Biology, Head of the research laboratory of applied  
immunogenetics  
e-mail: loginova@niigpk.ru

*S.S. Druzhinina*

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
«Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания  
крови Федерального медико-биологического агентства», Киров  
младший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории  
прикладной иммуногенетики

*S.S. Druzhinina*

The Federal State-Financed Scientific Institution  
Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion  
under the Federal Medical Biological Agency, Kirov  
Research assistant of the research laboratory of applied immunogenetics  
e-mail: druzhinina@niigpk.ru

*I.P. Obukhov,*

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
«Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания  
крови Федерального медико-биологического агентства», Киров  
лаборант-исследователь научно-исследовательской лаборатории прикладной  
иммуногенетики

*I.P. Obukhov*

The Federal State-Financed Scientific Institution  
Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion  
under the Federal Medical Biological Agency, Kirov

Research technician of the research laboratory of applied immunogenetics  
e-mail: obuhov@niigpk.ru

*К.О. Репницына*

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
«Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания  
крови Федерального медико-биологического агентства», Киров  
лаборант-исследователь научно-исследовательской лаборатории прикладной  
иммуногенетики

*К.О. Repnitsyna*

The Federal State-Financed Scientific Institution  
Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion  
under the Federal Medical Biological Agency, Kirov  
Research technician of the research laboratory of applied immunogenetics  
e-mail: repnitsina@niigpk.ru

*И.В. Парамонов*

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
«Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания  
крови Федерального медико-биологического агентства», Киров  
доктор медицинских наук, директор института

*I.V. Paramonov*

The Federal State-Financed Scientific Institution  
Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion  
under the Federal Medical Biological Agency, Kirov  
Doctor of Sciences in Medicine, Head of the Institute  
e-mail: paramonov@niigpk.ru

**Иммуногенетическая характеристика русских доноров гемопоэтических стволовых клеток, проживающих в азиатской части России**  
**Immunogenetic characterization of the Russian donors of hematopoietic stem cells located in the Asian part of Russia**

*Аннотация.* Проведено HLA-типирование 3072 потенциальных доноров гемопоэтических стволовых клеток, проживающих в азиатской части Российской Федерации и самоидентифицирующих себя русскими, по технологии NGS в разрешении 2-поля по локусам HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1 и HLA-DQB1. Выявлено 77 аллелей по локусу HLA-A, 111 – по локусу HLA-B, 59 – по локусу HLA-C, 54 – по локусу HLA-DRB1 и 26 – по локусу HLA-DQB1. Наиболее часто встречающимся пятилокусным гаплотипом является A\*01:01~HLA-C\*07:01~HLA-B\*08:01:01~HLA-DRB1\*03:01~HLA-DQB1\*02:01 (3.5%).

*Abstract.* HLA-typing of 3072 potential donors of hematopoietic stem cells living in the Asian part of the Russian Federation and self-identifying themselves as Russians was carried out using NGS technology in 2-field resolution for HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1 and HLA-DQB1 loci. 77 alleles were identified for the HLA-A locus, 111 for the HLA-B locus, 59 for the HLA-C locus, 54 for the HLA-DRB1 locus, and 26 for the HLA-DQB1 locus. The most common five-locus haplotype is A\*01:01~HLA-C\*07:01~HLA-B\*08:01:01~HLA-DRB1\*03:01~HLA-DQB1\*02:01 (3.5%).

*Ключевые слова:* HLA-типирование; аллели; гаплотипы; секвенирование нового поколения.

*Index terms:* HLA-typing; alleles; haplotypes; Next Generation Sequencing.

**Введение.** HLA (Human Leukocytes Antigens) – генетическая система, ответственная за развитие специфического иммунного ответа, представляющая собой комплекс генов, кодирующих отдельные цепи димерных гликопротеинов, основными функциями которых является антигенное распознавание и межклеточное взаимодействие [7].

Система HLA, как известно, демонстрирует экстремально высокий уровень полиморфизма [13, 14]. Появление и развитие современных методов HLA-типирования сопровождается постоянным открытием новых аллелей и, соответственно, увеличением их числа, по состоянию на июнь 2023 года Номенклатурным комитетом Всемирной Организации Здравоохранения по факторам системы HLA зарегистрировано более 36 тысяч аллелей [23].

В настоящее время HLA-типирование применяют для решения целого ряда

задач: подбор доноров для трансплантации органов и тканей; определение предрасположенности к различным заболеваниям; идентификация личности и определение отцовства; диагностика бесплодия [5].

Выбор доноров для пациентов с заболеваниями системы крови, имеющих показания к трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК), — сложная многоаспектная задача [8]. Вероятность успешного поиска неродственного донора и его продолжительность напрямую зависят от распространенности HLA-гаплотипов [12, 16]. Установлено, что распределение HLA-аллелей и гаплотипов отличается у различных этносов. Даже между представителями одной этнической группы, проживающими в разных географических районах, наблюдаются отличия в частотах HLA-аллелей и HLA-гаплотипов [17, 19]. Это обуславливает необходимость рекрутирования доноров ГСК во всех субъектах Российской Федерации в целях увеличения генетического разнообразия донорских ресурсов, доступных для поиска неродственных доноров [3].

Большинство отечественных работ по изучению распределения HLA-аллелей и HLA-A\*-C\*-B\*-DRB1\*-DQB1\* гаплотипов посвящены иммуногенетическим характеристикам доноров Европейской части России и основаны на результатах HLA-типирования, выполненного в низком разрешении [1, 2, 6]. Однако с внедрением в рутинную практику типизирующих лабораторий метода Next Generation Sequencing (NGS) появилась возможность получения результатов HLA-типирования в высоком и аллельном разрешении без увеличения стоимости исследования. Связи с этим изучение иммуногенетических особенностей HLA-аллелей и гаплотипов доноров ГСК азиатской части России представляется актуальной задачей.

Цель работы – изучить особенности распределения аллелей локусов HLA-A, -B, -C, -DRB1 и -DQB1 и пятилокусных гаплотипов у русских доноров ГСК, рекрутированных в азиатской части Российской Федерации.

### **Материалы и методы**

В исследование включены 3072 потенциальных донора ГСК, рекрутированных в азиатской части России (Иркутская область (n=1806), Челябинская область (n=674), Кемеровская область (n=352), Алтайский край (n=93), Хабаровский край

(n=80), Курганская область (n=51), Республика Хакасия (n=16)) и самоопределившихся русскими.

Препараты ДНК выделяли из замороженных образцов цельной крови (антикоагулянт – КЗЕДТА в концентрации 2 мг/мл) методом колоночной фильтрации с применением наборов «QIAamp DNA Blood Mini Kit» («QIAGEN GmbH», Германия). Концентрацию препаратов ДНК измеряли на спектрофотометре «ТЕСАН Infinite M200PRO» (Австрия), в исследование включали образцы с концентрациями от 5 до 100 нг/мкл, при необходимости образцы ДНК разводили деионизированной водой.

HLA-типирование по локусам HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1, HLA-DQB1 проводили в разрешении 2-поля по технологии NGS с использованием реагентов «PARAllele™ HLA solution v3» (ООО «ПАРСЕК ЛАБ», Россия), массовое параллельное секвенирование осуществляли на приборе MiSeq™ System («Illumina Inc.», США). Амплификация всего гена для локусов I класса: HLA-A (3.2 Kb), HLA-B (4.6 Kb) и HLA-C (3 Kb), а также участки с 1 по 5 экзон локуса HLA-DQB1 (6.1 Kb) и со 2 по 4 экзоны локуса HLA-DRB1 (4.3 Kb) осуществляется в формате мультиплексной ПЦР длинных фрагментов.

Анализ полученных данных осуществляли с использованием программного обеспечения «PARAllele HLA software» (ООО «ПАРСЕК ЛАБ», Россия) в автоматическом режиме. Статистический анализ генетических характеристик выполнен с использованием интернет-ресурса HLA-net Gene [rate] [15]. Оценка CWD-статуса (common and well-documented или CWD) выявленных аллелей проводилась с применением каталога распространенных и хорошо документированных аллелей Европейской Федерации Иммуногенетики (EFI) [16].

## **Результаты**

Основные генетические характеристики анализируемых локусов представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Генетические характеристики локусов HLA-A, -B, -C, -DRB1, и -DQB1 (n= 3072)

Локус	Число аллелей	Гетерозиготность	HWE
<b>HLA-A</b>	77	0.8696	0.4908152
<b>HLA-B</b>	111	0.9513	1.0000000
<b>HLA-C</b>	59	0.9152	0.9882252
<b>HLA-DRB1</b>	54	0.9266	0.9756245
<b>HLA-DQB1</b>	26	0.8923	0.7855847
Примечание: HWE – p-value for Hardy-Weinberg equilibrium test			

Показатель гетерозиготности свидетельствует о генетической и фенотипической изменчивости, а также о разнородности изученной выборки. Наибольшим показателем гетерозиготности обладает локус HLA-B, также в нем выявлено наибольшее количество аллелей.

По результатам анализа на соответствие равновесному распределению Харди-Вайнберга (HWE) распределение генотипов по всем локусам соответствует закону Харди-Вайнберга (значение  $p > 0.05$ ).

В таблицах 2-5 представлены аллели по каждому анализируемому HLA-локусу с указанием частоты встречаемости и CWD-статуса. HLA-аллели разделены на две категории в соответствии с каталогом распространенных и хорошо документированных аллелей Европейской Федерации Иммуногенетики 2017 года (CWD) [16]: распространенные (common или C) и хорошо задокументированные (well documented или WD) аллели. Аллели, не вошедшие в данный каталог, классифицированы как редкие (rare или R); аллели, выявленные нами впервые, обозначены как новые (Novel или N). Распространенными считаются аллели, наблюдаемые с частотой  $> 0,001$  в референсных популяциях, состоящих из не менее чем 1500 человек; хорошо документированными – аллели, выявленные не менее пяти раз у неродственных индивидуумов методом SBT.



Таблица 2 – Частоты встречаемости и CWD-статус аллелей локуса HLA-A (n=3072)

№ п/п	Аллель	Частота встречаемости, %	CWD статус	№ п/п	Аллель	Частота встречаемости, %	CWD статус
1	A*02:01	27.19	C	40	A*02:704	0.03	R
2	A*03:01	14.36	C	41	A*03:123	0.02	R
3	A*24:02	11.61	C	42	A*68:35	<0.01	WD
4	A*01:01	10.72	C	43	A*02:20	<0.01	WD
5	A*11:01	5.66	C	44	A*11:83	<0.01	R
6	A*25:01	4.29	C	45	A*25:11	<0.01	R
7	A*26:01	4.28	C	46	A*26:15	<0.01	WD
8	A*68:01	3.19	C	47	A*24:33	<0.01	R
9	A*32:01	2.82	C	48	A*26:14	<0.01	WD
10	A*23:01	2.47	C	49	A*02:38	<0.01	R
11	A*31:01	2.42	C	50	A*01:261	<0.01	R
12	A*30:01	1.89	C	51	A*66:44	<0.01	R
13	A*33:01	1.37	C	52	A*02:12	<0.01	R
14	A*33:03	1.17	C	53	A*02:03	<0.01	WD
15	A*02:06	0.86	WD	54	A*02:66	<0.01	WD
16	A*29:02	0.83	C	55	A*02:174	<0.01	WD
17	A*02:05	0.68	C	56	A*02:1009	<0.01	R
18	A*66:01	0.63	C	57	A*24:314	<0.01	R
19	A*68:02	0.63	C	58	A*11:328	<0.01	R
20	A*29:01	0.41	C	59	A*11:326	<0.01	R
21	A*68:24	0.33	C	60	A*01:380	<0.01	R
22	A*30:02	0.28	C	61	A*68:66	<0.01	R
23	A*03:02	0.28	C	62	A*03:24	<0.01	R
24	A*30:04	0.24	C	63	A*32:116	<0.01	R
25	A*02:07	0.15	WD	64	A*68:164	<0.01	R
26	A*02:17	0.11	WD	65	A*02:614	<0.01	R
27	A*24:03	0.11	C	66	A*33:163	<0.01	R
28	A*69:01	0.10	C	67	A*11:306	<0.01	R
29	A*02:02	0.10	C	68	A*31:135	<0.01	R
30	A*26:08	0.07	C	69	A*24:463	<0.01	R
31	A*01:02	0.07	C	70	A*23:17	<0.01	WD
32	A*31:08	0.07	C	71	A*33:191	<0.01	R
33	A*02:09	0.05	R	72	A*26:203	<0.01	R
34	A*02:11	0.03	WD	73	A*03:312	<0.01	R
35	A*33:05	0.03	WD	74	A*29:119	<0.01	R
36	A*02:35	0.03	R	75	A*01:274	<0.01	R
37	A*01:28	0.03	R	76	A*25:68	<0.01	R
38	A*02:629	0.03	R	77	A*02:864	<0.01	R
39	A*34:02	0.03	C				

Таблица 3 – Частоты встречаемости и CWD-статус аллелей локуса HLA-B (n=3072)

№ п/п	Аллель	Частота встречаемости, %	CWD статус	№ п/п	Аллель	Частота встречаемости, %	CWD статус
1	B*07:02	12.11	C	57	B*67:01	<0.01	WD
2	B*18:01	7.11	C	58	B*07:10	<0.01	C
3	B*35:01	6.36	C	59	B*73:01	<0.01	C
4	B*08:01	6.30	C	60	B*55:02	<0.01	WD
5	B*13:02	6.27	C	61	B*51:07	<0.01	C
6	B*51:01	4.98	C	62	B*15:08	<0.01	R
7	B*15:01	4.93	C	63	B*57:03	<0.01	C
8	B*44:02	4.31	C	64	B*50:02	<0.01	WD
9	B*27:05	3.99	C	65	B*15:24	<0.01	WD
10	B*40:01	3.63	C	66	B*42:02	<0.01	C
11	B*38:01	3.47	C	67	B*51:04	<0.01	WD
12	B*44:03	3.19	C	68	B*15:73	<0.01	R
13	B*14:02	2.62	C	69	B*35:42	<0.01	R
14	B*57:01	2.46	C	70	B*18:18	<0.01	C
15	B*39:01	2.36	C	71	B*44:06	<0.01	R
16	B*35:03	2.15	C	72	B*40:32	<0.01	WD
17	B*40:02	2.12	C	73	B*13:125	<0.01	R
18	B*52:01	2.03	C	74	B*07:420	<0.01	R
19	B*49:01	1.76	C	75	B*27:148	<0.01	R
20	B*41:02	1.71	C	76	B*58:34	<0.01	R
21	B*56:01	1.46	C	77	B*15:27	<0.01	R
22	B*58:01	1.25	C	78	B*15:37	<0.01	R
23	B*35:02	1.24	C	79	B*39:31	<0.01	R
24	B*50:01	1.22	C	80	B*40:03	<0.01	R
25	B*27:02	1.11	C	81	B*53:17	<0.01	R
<b>26</b>	<b>B*44:27*</b>	<b>1.11</b>	<b>R</b>	82	B*15:09	<0.01	WD
27	B*37:01	1.09	C	83	B*39:10	<0.01	C
28	B*48:01	0.85	WD	84	B*15:33	<0.01	R
29	B*44:05	0.80	C	85	B*27:07	<0.01	WD
30	B*55:01	0.80	C	86	B*57:02	<0.01	C
31	B*41:01	0.73	C	87	B*38:02	<0.01	WD
32	B*39:06	0.42	C	88	B*51:367	<0.01	R
33	B*35:08	0.42	C	89	B*15:515	<0.01	R
34	B*40:06	0.29	C	90	B*40:117	<0.01	R
<b>35</b>	<b>B*27:14*</b>	<b>0.28</b>	<b>R</b>	91	B*38:99	<0.01	R
36	B*53:01	0.24	C	92	B*81:02	<0.01	R
37	B*47:01	0.23	C	93	B*48:08	<0.01	R
38	B*07:05	0.21	C	94	B*40:379	<0.01	R
39	B*18:03	0.21	C	95	B*07:355	<0.01	R
40	B*07:04	0.20	C	96	B*44:522	<0.01	R

41	<b>B*54:01*</b>	<b>0.18</b>	<b>R</b>	97	B*51:271	<0.01	R
42	B*15:17	0.15	C	98	B*44:270	<0.01	R
43	B*45:01	0.13	C	99	B*44:464	<0.01	R
44	B*14:01	0.11	C	100	B*44:302	<0.01	R
45	<b>B*15:220**</b>	<b>0.10</b>	<b>R</b>	101	B*42:01	<0.01	C
46	B*15:18	0.10	C	102	B*52:07	<0.01	R
47	B*15:16	0.08	WD	103	B*15:228	<0.01	R
48	B*07:06	0.07	WD	104	B*51:230	<0.01	R
49	B*13:01	0.07	C	105	B*50:57	<0.01	R
50	B*51:02	0.07	C	106	B*78:02	<0.01	WD
51	B*46:01	0.07	WD	107	B*14:64	<0.01	R
52	B*51:08	0.05	C	108	B*15:535	<0.01	R
53	B*15:11	0.05	WD	109	B*18:177	<0.01	R
54	B*39:24	0.05	WD	110	B*35:380	<0.01	R
55	B*15:10	<0.01	C	111	B*07:381	<0.01	R
56	B*51:05	<0.01	C				

Примечания: (\*) – в изученной популяции аллель может быть отнесен к категории «C»; (\*\*)  
– в изученной популяции аллель может быть отнесен к категории «WD»

Таблица 4 – Частоты встречаемости и CWD-статус аллелей локуса HLA-C (n=3072)

№ п/п	Аллель	Частота встречаемости, %	CWD статус	№ п/п	Аллель	Частота встречаемости, %	CWD статус
1	C*07:02	14.29	C	31	C*08:22	<0.01	R
2	C*04:01	12.22	C	32	C*17:38	<0.01	R
3	C*06:02	11.69	C	33	C*15:11	<0.01	C
4	C*07:01	11.00	C	34	C*15:06	<0.01	C
5	C*12:03	9.36	C	35	C*07:57	<0.01	R
6	C*03:04	6.09	C	36	C*07:250	<0.01	R
7	C*02:02	5.97	C	37	C*03:357	<0.01	R
8	C*01:02	4.49	C	38	C*07:617	<0.01	R
9	C*05:01	3.81	C	39	C*02:149	<0.01	R
10	C*03:03	3.73	C	40	C*07:1062N	<0.01	N
11	C*08:02	2.65	C	41	C*12:45	<0.01	R
12	C*07:04	2.31	C	42	C*07:126	<0.01	R
13	C*12:02	2.10	C	43	C*03:290	<0.01	R
14	C*15:02	1.95	C	44	C*12:05	<0.01	R
15	C*17:03	1.77	C	45	C*18:02	<0.01	WD
16	C*14:02	1.16	C	46	C*06:104	<0.01	R
17	C*03:02	1.07	C	47	C*15:250	<0.01	N
18	C*16:01	0.88	C	48	C*07:783	<0.01	R
19	C*08:03*	0.57	R	49	C*07:343	<0.01	R
20	C*17:01	0.50	C	50	C*15:205	<0.01	R
21	C*08:01	0.42	C	51	C*06:329	<0.01	R

22	C*16:02	0.39	C	52	C*12:167	<0.01	R
23	C*15:05	0.31	C	53	C*02:163	<0.01	R
24	C*07:18	0.20	C	54	C*06:274	<0.01	R
25	C*15:04	0.16	WD	55	C*05:248	<0.01	R
26	C*16:04	0.13	C	56	C*07:830	<0.01	R
27	C*07:06	0.13	WD	57	C*07:639	<0.01	R
28	C*15:13	0.13	WD	58	C*07:27	<0.01	R
29	C*02:151	0.07	R	59	C*07:19	<0.01	R
30	C*14:03	<0.01	C				

Примечание: (\*) – в изученной популяции аллель может быть отнесен к категории «С»

Таблица 5 – Частоты встречаемости и CWD-статус аллелей локусов HLA-DRB1 и HLA-DQB1(n=3072)

№ п/п	Аллель	Частота встречаемости, %	CWD статус	№ п/п	Аллель	Частота встречаемости, %	CWD статус
1	DRB1*07:01	14.18	C	1	DQB1*03:01	19.79	C
2	DRB1*15:01	12.11	C	2	DQB1*05:01	13.54	C
3	DRB1*01:01	11.02	C	3	DQB1*06:02	11.42	C
4	DRB1*03:01	08.12	C	4	DQB1*02:02	10.91	C
5	DRB1*13:01	6.97	C	5	DQB1*02:01	8.10	C
6	DRB1*11:01	6.41	C	6	DQB1*03:02	7.98	C
7	DRB1*04:01	4.38	C	7	DQB1*06:03	7.02	C
8	DRB1*11:04	4.22	C	8	DQB1*03:03	5.10	C
9	DRB1*16:01	3.97	C	9	DQB1*05:02	4.88	C
10	DRB1*08:01	3.29	C	10	DQB1*04:02	3.58	C
11	DRB1*04:04	3.21	C	11	DQB1*06:04	2.15	C
12	DRB1*13:02	2.91	C	12	DQB1*05:03	1.72	C
13	DRB1*13:03	2.77	C	13	DQB1*06:01	1.66	C
14	DRB1*12:01	2.18	C	14	DQB1*06:09	0.62	C
15	DRB1*09:01	1.68	C	15	DQB1*03:04	0.59	C
16	DRB1*01:02	1.53	C	16	DQB1*05:04	0.29	C
17	DRB1*15:02	1.51	C	17	DQB1*03:05	0.16	C
18	DRB1*14:54	1.27	C	18	DQB1*04:01	0.16	C
19	DRB1*04:02	1.17	C	19	DQB1*02:17	0.03	R
20	DRB1*10:01	1.17	C	20	DQB1*02:40	0.02	R
21	DRB1*11:03	0.93	C	21	DQB1*06:41	0.02	WD
22	DRB1*04:03	0.75	C	22	DQB1*06:443	0.02	N
23	DRB1*04:08	0.67	C	23	DQB1*03:10	0.02	WD
24	DRB1*04:05	0.50	C	24	DQB1*06:84	<0.01	WD
25	DRB1*04:07	0.50	C	25	DQB1*06:39	<0.01	C
26	DRB1*08:03	0.46	C	26	DQB1*06:88	<0.01	WD
27	DRB1*14:01	0.36	C				

28	DRB1*16:02	0.26	C				
29	DRB1*13:05	0.24	C				
30	DRB1*14:04	0.15	C				
31	DRB1*12:02	0.15	C				
32	DRB1*14:05	0.13	WD				
33	DRB1*08:02	0.11	C				
34	DRB1*14:03	0.10	WD				
35	DRB1*08:04	0.08	C				
36	DRB1*01:03	0.07	C				
37	DRB1*14:12	0.07	R				
38	DRB1*14:02	0.05	C				
39	DRB1*04:06	0.05	C				
40	DRB1*14:07	0.03	WD				
41	DRB1*11:06	0.03	WD				
42	DRB1*04:10	0.03	WD				
43	DRB1*14:27	0.03	R				
44	DRB1*11:15	0.02	WD				
45	DRB1*11:37	0.02	R				
46	DRB1*14:06	0.02	R				
47	DRB1*11:13	0.02	R				
48	DRB1*11:11	0.02	WD				
49	DRB1*14:89	0.02	R				
50	DRB1*13:15	0.02	C				
51	DRB1*11:12	0.02	R				
52	DRB1*11:02	0.02	C				
53	DRB1*11:16	0.02	WD				
54	DRB1*15:06	0.02	R				

При проведении исследования выявлено 5 новых HLA-аллелей, характеристика которых представлена в таблице 6.

Таблица 6 – Характеристика новых зарегистрированных аллелей

№ п/п	Новый аллель	Наиболее близкий аллель	Описание замены	Регистрационный номер (GenBank)
1	C*07:1062N	C*07:02:01:01	Кодирующая замена в 2 экзоне в позиции 331 (C>T), кодон 87, замена в 3 интроне в позиции 1477 (G>C)	OQ354210
2	C*15:250	C*15:02:01:01	Кодирующая замена в 3 экзоне в позиции 431 (G>T), кодон 120	OM621812

3	DQB1*02:02:23	DQB1*02:02:01:01	Синонимичная замена в 1 экзоне в позиции 81 (C>T), кодон -6	OP964021
4	DQB1*06:02:01:32	DQB1*06:02:01:01	Интронная (в псевдоэкзоне) замена в 5 экзоне в позиции 5746 (A>C)	OP964022
5	DQB1*06:443	DQB1*06:03:01:01	Кодирующая замена во 2 экзоне в позиции 287 (A>C), кодон 64	ON815475

HLA-A-C-B-DQB1-DRB1 гаплотипы с частотой встречаемости более 0,5 % представлены в таблице 7, 5 гаплотипов из 13 имеют частоту более 1,0%.

Таблица 7 – Гаплотипы HLA-A-C-B-DRB1-DQB1 в порядке уменьшения частоты встречаемости

№ п/п	Пятилокусный гаплотип	Частота встречаемости (%)
1	A*01:01~C*07:01~B*08:01~DRB1*03:01~DQB1*02:01	3.5
2	A*03:01~C*07:02~B*07:02~DRB1*15:01~DQB1*06:02	2.6
3	A*03:01~C*04:01~B*35:01~DRB1*01:01~DQB1*05:01	2.0
4	A*25:01~C*12:03~B*18:01~DRB1*15:01~DQB1*06:02	1.2
5	A*30:01~C*06:02~B*13:02~DRB1*07:01~DQB1*02:02	1.1
6	A*33:01~C*08:02~B*14:02~DRB1*01:02~DQB1*05:01	0.9
7	A*02:01~C*17:03~B*41:02~DRB1*13:03~DQB1*03:01	0.8
8	A*24:02~C*07:02~B*39:01~DRB1*04:04~DQB1*03:02	0.7
9	A*01:01~C*06:02~B*57:01~DRB1*07:01~DQB1*03:03	0.6
10	A*02:01~C*07:04~B*44:27~DRB1*16:01~DQB1*05:02	0.6
11	A*26:01~C*12:03~B*38:01~DRB1*13:01~DQB1*06:03	0.5
12	A*02:01~C*02:02~B*27:02~DRB1*16:01~DQB1*05:02	0.5
13	A*25:01~C*12:03~B*18:01~DRB1*04:01~DQB1*03:02	0.5

*Примечание:* в таблице показаны гаплотипы, для которых обнаружено положительное значение linkage disequilibrium (LD) при значении standardized residual > 2 между парами аллелей в соседних локусах

## Обсуждение

Численность населения России на 1 января 2023 года составляла более 146 млн человек, их них около 25,6 % проживают в азиатской части [17]. Русские –

основной этнос Российской Федерации, численность которого составляет около 80% населения [18].

Азиатская часть России – часть страны, географически относящаяся к Азии и отделяемая от Европейской части России Уральскими горами. В настоящее время административно подразделяется на Уральский, Сибирский и Дальневосточный федеральные округа Российской Федерации. Площадь макрорегиона около 13,1 млн км<sup>2</sup>, что составляет около 77 % территории России [19].

Изучение иммуногенетических особенностей жителей Российской Федерации является актуальным направлением исследования. Популяционные отличия в распределении HLA-генов в различных регионах России необходимо учитывать при формировании Федерального регистра доноров костного мозга и гемопоэтических стволовых клеток для обеспечения репрезентативности гаплотипов в регистре и оптимизации поиска донора для пациентов, нуждающихся в аллотГСК.

Информация о частотах распространения HLA-аллелей широко используется в мировой практике для создания каталогов распространенных и хорошо документированных аллелей или CWD-каталогов [2, 16, 20-22].

Для изучения иммуногенетических особенностей русских доноров наибольший интерес представляет сравнение с популяциями доноров из Европы, поэтому для нашего исследования в качестве референсного CWD-каталога был выбран каталог Европейской Федерации Иммуногенетики (EFI), в котором данные представлены на уровне 2-полей [16].

В ходе работы выявлено 77, 111, 59, 54 и 26 аллелей, относящихся к локусам HLA-A, -B, -C, -DRB1 и -DQB1 соответственно. В аналогичном исследовании русских доноров Европейской части России (n=3341) обнаружено 79, 115, 67, 71 и 34 аллеля соответственно [23, 24].

В локусе HLA-A обнаружено 77 аллелей, которые относятся к 17 группам на уровне первого поля. Тройка наиболее распространенных аллелей по локусу HLA-A в исследуемой популяции выглядит следующим образом: HLA-A\*02:01 (27.19%), HLA-A\*03:01 (14.36%), HLA-A\*24:02 (11.61%). Самой полиморфной группой аллелей в локусе HLA-A явилась HLA-A\*02, в которую вошли 20 аллелей, что составляет 26,0% от общего числа выявленных в данном локусе аллелей. Важно отметить, что при изучении доноров Европейской части России в аллель-

ной группе HLA-A\*02 обнаружено 12 аллелей, хотя исследование выполнено в разрешении 3-поля, да и общее количество аллелей отличается несущественно – 79 и 77, в европейской и азиатской частях России соответственно. Из этого можно сделать вывод, что по данному HLA-локусу азиатская популяция является более разнородной. Одиночными аллелями представлены аллельные группы A\*34 и A\*69.

В локусе HLA-B выявлено 111 аллелей, относящихся к 33 группам на уровне первого поля. Первое место по распространенности занимает аллель HLA-B\*07:02 (12.11%), второе – HLA-B\*18:01 (7.11%), третье – HLA-B\*35:01 (6.36%). Наиболее полиморфными группами аллелей оказались HLA-B\*15, в которой выявлено 17 аллелей, HLA-B\*44 и HLA-B\*51, в данных группах обнаружено по 9 аллелей и HLA-B\*07, в состав которой входят 8 аллелей. Для сравнения, при изучении европейской популяции русских доноров в аллельной группе HLA-B\*15 выявлено 16 аллелей, в группе HLA-B\*51 – 7 аллелей, в группе HLA-B\*07 – 4 аллеля, несмотря на то, что исследование проводилось на уровне 3-поля. Только одним аллелем представлены 12 аллельных групп: HLA-B\*08, -B\*37, -B\*45, -B\*46, -B\*47, -B\*49, -B\*54, -B\*56, -B\*67, -B\*73, -B\*78, -B\*81. Необходимо отметить, что аллельных групп HLA-B\*42, -\*67, -\*81 при изучении доноров Европейской части страны не обнаружено.

При анализе локуса HLA-C выявлено 59 аллелей, относящихся к 14 группам на уровне первого поля. Наиболее распространенными аллелями данного локуса с частотами встречаемости более 10% являются C\*07:02 (14.29%), C\*04:01 (12.22%), C\*06:02 (11.69%), C\*07:01 (11.00%). Самыми полиморфными аллельными группами оказались HLA-C\*07, включающая в себя 16 аллелей, и HLA-C\*15, состоящая из 8 аллелей. В аналогичном исследовании доноров Европейской части России в наиболее разнородной аллельной группе HLA-C\*07 выявлено 15 аллелей. Одиночными аллелями представлены группы HLA-C\*01, HLA-C\*04, HLA-C\*18.

Локус HLA-DRB1 включает в себя 54 аллеля, которые образуют 13 аллельных групп на уровне первого поля. Наибольшей полиморфностью отличаются группы HLA-DRB1\*04, HLA-DRB1\*11, HLA-DRB1\*14, которые включают в себя 9, 11 и 11 аллелей соответственно. Доноры Европейской части России характеризуются теми же наиболее разнородными аллельными группами, в них выявлено 10, 15 и 11 аллелей соответственно [23, 24]. Самыми распространенными алле-

176



лями в данном локусе оказались DRB1\*07:01 (14.18%), DRB1\*15:01 (12.11%), DRB1\*01:01 (11.02%). К аллельным группам, состоящим лишь из одного аллеля, относятся HLA-DRB1\*03, HLA-DRB1\*07 и HLA-DRB1\*09.

Локус HLA-DQB1 включает в себя 26 аллелей, относящихся к 5 аллельным группам на уровне первого поля. Наиболее распространенными аллелями в данном локусе оказались DQB1\*03:01 (19.79%), DQB1\*05:01 (15.54%), DQB1\*06:02 (11.42%), DQB1\*02:02 (10.91%). Самой полиморфной аллельной группой оказалась HLA-DQB\*06, включающая в себя 10 аллелей, в том числе 2 выявленных нами впервые. При изучении Европейской популяции русских доноров в данной аллельной группе выявлено 16 аллелей.

При сравнении полученных данных с результатами аналогичного исследования Европейской популяции русских доноров [23, 24] выявлено, что по всем пяти HLA-локусам распределения наиболее распространенных аллелей, выявляемых у доноров азиатской и европейской частей России, совпадают или очень близки, однако локусы I класса у доноров азиатской части характеризуются значительно большим генетическим разнообразием.

При оценке CWD-статуса аллелей локуса HLA-A установлено, что 30 аллелей (38.9%) относятся к категории распространенных «С», 13 (16.9%) – к числу хорошо документированных «WD», 34 (44.2%) – не включены в CWD-каталог, поэтому их можно отнести к числу редких «R». Аллели, обладающие наибольшей частотой встречаемости у русских доноров азиатской части страны, имеют статус «С» и «WD» в Европейском каталоге распространенных и хорошо документированных аллелей, однако 7 аллелей, выявленных один раз в изученной популяции, в CWD-каталоге имеют статус «WD»: A\*02:03, A\*02:20, A\*02:66, A\*02:174, A\*26:14, A\*26:15, A\*68:35.

Согласно данным CWD-каталога, 55 аллелей локуса HLA-B имеют статус «С» (49.6%), 16 (14.4%) – «WD», 40 (36.0%) – «R». Также, как и в локусе HLA-A, для наиболее распространенных аллелей отмечается тенденция соответствия CWD-статуса в Европейском каталоге и частоты распространения в исследуемой популяции. Необходимо отметить, что в локусе HLA-B выявлены четыре аллеля, не включенные в каталог CWD, однако для изученной популяции их можно отнести к категории распространенных (HLA-B\*44:27 (1.11%), HLA-B\*27:14 (0.28%) и HLA-B\*54:01 (0.18%)) и хорошо документированных (HLA-B\*15:220). Кроме

того, в локусе HLA-B 19 аллелей, которые встречаются в изученной популяции от одного до трех раз имеют статус «С» и «WD» в CWD-каталоге, например аллели В\*18:18, В\*39:10, В\*42:02 и В\*57:02, выявленные по одному разу, в каталоге отнесены к категории «С».

Распределение аллелей локуса HLA-C по CWD-статусу выглядит следующим образом: 27 аллелей (45.8 %) относятся к распространенным «С», 4 аллеля (6.8 %) – к хорошо документированным «WD», 26 аллелей (44.0%) не входят в CWD-каталог и считаются редкими «R», также в локусе HLA-C обнаружено 2 новых аллеля (3,4%) – С\*07:1062N и С\*15:250, их характеристика представлена в Таблице 6. При сравнении CWD-статуса аллелей с частотой их выявления в изученной популяции можно отметить, что большинство распространенных аллелей имеют статус «С» и «WD», однако аллель HLA-C\*08:03, отнесенный к категории редких, в популяции русских доноров азиатской части России был выявлен у 35 человек и может считаться распространенным, также обнаружены 4 аллеля, имеющие статус «С» и «WD», но в исследуемой популяции встречающиеся с низкой частотой (менее 0,01 %): С\*14:03, С\*15:06, С\*15:11, С\*18:02.

Среди аллелей локуса HLA-DRB1 38 (70.4%) относятся к категории «С», 8 (14.8%) – к категории «WD», 8 (14.8%) – можно отнести к редким «R». Аллели DRB1\*11:11, DRB1\*11:15, DRB1\*11:16, выявленные в популяции доноров азиатской части России по одному разу, имеют в CWD-каталоге статус «WD», а аллели DRB1\*11:02 и DRB1\*13:15 – статус «С», несмотря на то, что также выявлены в изученной выборке единожды.

При оценке CWD статуса аллелей локуса HLA-DQB1 установлено, что 19 из них (73.0%) относятся к категории «С», 4 (15.4%) – к категории «WD», 2 аллеля (7.7%) не входят в CWD-каталог и их можно отнести к редким. Необходимо отметить, аллель DQB1\*03:10, выявленный в изученной популяции один раз, относится к категории «WD» каталога EFI. В локусе выявлено 3 новых аллеля: DQB1\*02:02:23, DQB1\*06:02:01:32, DQB1\*06:443, в Таблице 6 представлена характеристика всех новых аллелей.

Для локусов II класса сохраняется та же закономерность, что и для локусов I класса, согласно которой распространенные в изученной популяции аллели имеют статус «С» и «WD» в CWD-каталоге, однако обнаружены аллели, выявляемые в популяции русских азиатской части России один-два раза, но имеющие в ката-

логе EFI статусы распространенных и хорошо документированных.

При изучении пятилокусных гаплотипов выявлено 81596 максимально возможных гаплотипов, из них 13 имеют частоту встречаемости более 0.5%. В аналогичном исследовании доноров Европейской части России обнаружено 99766 максимально возможных гаплотипов, из них 13 характеризуются частотой более 0.5% [23, 24] Три наиболее распространенных гаплотипа в исследуемой выборке – HLA-A\*01:01-C\*07:01-B\*08:01-DRB1\*03:01-DQB1\*02:01 (3.5%), HLA-A\*03:01-C\*07:02-B\*07:02-DRB1\*15:01-DQB1\*06:02 (2,6%), HLA-A\*03:01-C\*04:01-B\*35:01-DRB1\*01:01-DQB1\*05:01 (2,0%), аналогичные данные получены при изучении русских Европейской части России, однако у них второй и третий гаплотип поменялись местами [23, 24].

При оценке частоты встречаемости в странах Европы наиболее распространенных в популяции доноров азиатской части России гаплотипов можно отметить, что гаплотип A\*01:01-C\*07:01-B\*08:01-DRB1\*03:01-DQB1\*02:01 встречается у доноров из Южной Ирландии (11.5 %) [25], Северо-Западной Англии (9.5 %) [26], Польши (5.9%) [26], Италии (4.7%) [25]. Гаплотип HLA-A\*03:01-C\*07:02-B\*07:02-DRB1\*15:01-DQB1\*06:02, находящийся в изученной популяции на втором месте, также распространен среди доноров из Южной Ирландии (4.3%) [25], Северо-Западной Англии (4.2%) [25], Польши (2.6%), Германии (2.2%) [25]. Гаплотип HLA-A\*03:01-C\*04:01-B\*35:01-DRB1\*01:01-DQB1\*05:01, занимающий третье место, является достаточно редко встречающимся в странах Европы, частота его распространения среди популяций доноров из Германии оставляет от 0.53 % до 0,96% [25], также данный гаплотип был выявлен среди доноров из Италии (0.88%) и Польши (0.67%). Наибольшая частота встречаемости этого гаплотипа выявлена для популяций доноров из Европейской части России [25] – среди татар Башкортостана (4.04%), доноров из Нижнего Новгорода (2.6%), Вологды (2.5%), Карелии (1.88%), в мире данный гаплотип обнаружен с высокой частотой в популяции доноров из Бразилии (2.9%) [25].

## **Выводы**

1. При изучении иммуногенетических особенностей русских доноров азиатской части России обнаружена схожесть в распределении наиболее распространенных аллелей и гаплотипов с русскими донорами Европейской

части России.

2. На выборку из 3072 потенциальных доноров приходится 5 новых аллелей, часть которых характеризуется заменами в регионах, лежащих за пределами пептидсвязывающего сайта, что подтверждает необходимость применения технологии NGS при HLA-типировании потенциальных доноров.
3. Наиболее распространенные у русских доноров азиатской части России аллели имеют статус «С» в каталоге CWD (51,7%), однако из 327 выявленных аллелей 110 являются редкими (33,6%), именно они наряду с распространенными аллелями сформировали аллельное разнообразие изученной популяции.
4. В двух из пяти изученных локусах выявлено 5 аллелей, не включенных в каталог CWD, однако являющихся распространенными в изученной выборке потенциальных доноров.

### **Заключение**

Проведенное исследование подтверждает целесообразность рекрутинга доноров во всех регионах Российской Федерации, а также необходимость разработки каталога распространенных и хорошо документированных аллелей, характеризующего российские популяции, с целью ускорения процесса поиска неродственного донора для пациентов, повышения доступности информации для популяционных исследований и при изучении ассоциации HLA-генотипов с заболеваниями.

### **Список литературы**

1. Бубнова Л.Н. Сравнительный анализ иммуногенетических характеристик потенциальных доноров гемопоэтических стволовых клеток регистров двух российских мегаполисов / Бубнова Л.Н., Кузьмич Е.В., Павлова И.Е. [и др.] – Текст: электронный // Медицинская иммунология. – 2022. – Т. 24. – № 5. – С. 1047-1056.
2. Бубнова, Л.Н. Иммуногенетическая характеристика доноров гемопоэтических стволовых клеток северо-западного региона России / Бубнова Л. Н., Павлова И. Е., Беркос А. С. [и др.] – Текст: электронный // Вестник гематологии. – 2016. – Т.11. – № 2. – С.11-12.
3. Логинова, М.А. Оценка эффективности деятельности регистра потенциальных доноров гемопоэтических стволовых клеток / М.А. Логинова, Н.А. Малышева, Н.В. Минаева,

И.В. Парамонов – Текст: электронный // ГЕМАТОЛОГИЯ И ТРАНСФУЗИОЛОГИЯ. – 2020. – Т.65. – №3. – С.291-298.

4. Смирнова, Д.Н. Иммуногенетический профиль (HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1) русских доноров гемопоэтических стволовых клеток / Д.Н. Смирнова, М.А. Логинова, С.С. Дружинина [и соавт.] – Текст: электронный // Актуальные вопросы трансфузиологии и онкогематологии: сб. материалов научн.-практ. конф. молодых учёных и спец. – Киров: ООО «Флат-Принт». – 2022. – С. 173-190.

5. Смолянинов, А.Б. Аллогенная трансплантация стволовых клеток и роль главного комплекса гистосовместимости / А.Б. Смолянинов, Е.В. Жаров., Е.А. Котелевская [и др.] – Текст: электронный // Журнал российской ассоциации акушеров-гинекологов. – 2009. – №3. – С.3-8.

6. Трусова, Л.М. Частота встречаемости HLA-аллелей и гаплотипов в русской популяции Самарской и Челябинской областей / Л.М. Трусова, Д.Ю. Ключников, М.Н. Вавилов [и др.] – Текст: электронный // Вестник гематологии. – 2018. – Т.14 – №2. – С.47.

7. Угольник, Т.С. Антигены системы HLA: структура и функции / Т.С. Угольник, С.А. Шут – Текст: электронный // Методические рекомендации. – Гомель: ГоГМИ, 2001. – 37 с.

8. Хамаганова, Е.Г. Подбор неродственного донора для трансплантации гемопоэтических стволовых клеток. HLA-гаплотипы больных с заболеваниями системы крови / Е.Г. Хамаганова, Е.Н. Паровичникова, Л.А. Кузьмина [и др.]. – Текст: электронный // Терапевтический архив. – 2014. – № 7. – С.31-36.

9. Cano, P. Common and Well-Documented HLA alleles: Report of the Ad-Hoc Committee of the American Society for Histocompatibility and Immunogenetics / P. Cano, W. Klitz, S.J. Mask [et al] – Text: electronic // Hum Immunol. – 2007. – Vol. 68. – №5. – P.392-417.

10. He, Y. HLA common and well-documented alleles in China [Text] / Y. He, F. Zhu, J. Li [et al.] – Text: electronic // HLA. – 2018. – Vol. 92. – No 4. – P. 199-205.

11. Hurley, C.K. Common, intermediate and well-documented HLA alleles in world populations: CIWD version 3.0.0. / C.K Hurley, J. Kempenich, K. Wadsworth [et al] – Text: electronic // HLA. –2020. – Vol. 95. – №6. – P.516-531.

12. Jöris, M.M. The impact of frequent HLA haplotypes in high linkage disequilibrium on donor search and clinical outcome after unrelated haematopoietic SCT / M.M. Jöris, A.C. Lankester, P.V. Borne [et al]. – Text: electronic // Bone Marrow Transplantat. – 2012. – P.189

13. S.J. Mack, S.J. Common and well-documented HLA alleles: 2012 update to the CWD catalogue / S.J. Mack, P. Cano, J.A. Hollenbach [et al] – Text: electronic // Tissue Antigens. – 2013. – Vol. 81. – №4. – P. 194-203.

14. Nunes, J.M. HLA-net 2013 collaboration. The HLA-net GENE[RATE] pipeline for effective HLA data analysis and its application to 145 population samples from Europe and neighbouring areas / Nunes J.M., Buhler S., Roessli D., Sanchez-Mazas A. - Text: electronic //

- Tissue Antigens. – 2014. – Vol. 83. – №5. – P. 307-323.
15. Nunes, J.M. Using informat and gene[rate] to analyze data with ambiguities in population genetics / J.M. Nunes. – Text: electronic // EvolBioinform Online. –2016. – №11. – P.19-26.
  16. Petersdorf, E.W. MHC Haplotype Matching for Unrelated Hematopoietic Cell Transplantation / E.W. Petersdorf, M. Malkki, T.A. Gooley [et al]. – Text: electronic // Public Library Sc Med. – 2007. – Vol.4. – №1. – P. 59-68.
  17. Sacchi, N. High-resolution analysis of the HLA-A, -B, -C and -DRB1 alleles and national and regional haplotype frequencies based on 120 926 volunteers from the Italian Bone Marrow Donor Registry / N. Sacchi, M. Castagnetta, V. Miotti [et al.] – Text: electronic // HLA. – 2019. – Vol. 94. – No 3. – P. 285-295.
  18. Sanchez-Mazas, A. Common and Well-documented HLA alleles over all of Europe and within European sud-regions: a catalogue from European Federation of Immunogenetics / A. Sanchez-Mazas, J.M. Nunes, D. Middleton [at all] – Text: electronic // HLA. –2017. –Vol. 89. – №2. – P. 104-113.
  19. Schmidt, A.H. Regional HLA Differences in Poland and Their Effect on Stem Cell Donor Registry Planning / A.H Schmidt, U.V Solloch., J. Pingel – Text: electronic // PLOS ONE. – 2013. – Vol. 9. – No 9. – P. 1-10.
  20. Seitz, S. Estimating HLA haplotype frequencies from homozygous individuals / S.Seitz, V. Lange, P.J. Norman, J.Sauter, A.H.Schmidt. – Text: electronic // A Technical Report. Int J Immunogenet. – 2021. – Vol. 48. –№6. – P. 490-495.
  21. Smirnova, D.N. Distributions of HLA-A, -B, -C, -DRB1 and -DQB1 alleles typed by next generation sequencing in Russian volunteer donors / D.N. Smirnova, M.A. Loginova, S.S. Druzhinina [at all] – Text: electronic // HLA. – 2023. – Vol.101. –№3. – P.623-633.
  22. URL: <http://www.allelefreqencies.net> [Электронный ресурс] (дата обращения 25.05.2023).
  23. URL: <https://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/about/statistics/> (дата обращения 20.06.2023).
  24. URL:<https://topogis.ru/geograficheskiye-ob-yekty-aziatskoy-chasti-rossii.php?ysclid=li66u0m6pb974682195> [Электронный ресурс] (дата обращения 27.05.2023).
  25. URL: <http://ru.spinform.ru/people> [Электронный ресурс] (дата обращения 27.05.2023).
  26. URL: [https://ru.wikipedia.org/wiki/Население\\_России](https://ru.wikipedia.org/wiki/Население_России) [Электронный ресурс] (дата обращения 25.05.2023).

УДК 616-097

ГРНТИ 76.29.33

*Смольникова М.В.*

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», Киров  
младший научный сотрудник лаборатории иммуногематологии

*M. V. Smolnikova*

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical and Biological Agency, Kirov

Junior researcher of laboratory of Immunohematology

E-mail: smolnikova@niigpk.ru

*Йовдий А. В.*

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», Киров  
кандидат медицинских наук, заведующий лабораторией иммуногематологии

*A. V. Yovdiy*

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agency, Kirov

Candidate of Medical Science, Head of Laboratory of Immunohematology

E-mail: yovdiy@niigpk.ru

*Шерстнёв Ф. С.*

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», Киров  
кандидат медицинских наук, заведующий отделением трансфузиологии и процессинга гемопоэтических стволовых клеток

*F. S. Sherstnev*

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical and Biological Agency, Kirov

Candidate of Medical Science, Head of the Department of Transfusiology and Processing of Hematopoietic Blood Stem Cells

E-mail: sherstnyov\_phil@mail.ru

## Антиэритроцитарные антитела у пациентов гематологической клиники

### Anti-red blood cell antibodies in patients of hematology clinic

**Аннотация:** Аллоиммунизация к антигенам эритроцитов – ключевое звено патогенеза посттрансфузионных осложнений гемолитического типа. К группе высокого риска осложнений относятся пациенты с полиспецифическими антителами. У 7,9 % больных гематологической клиники обнаружены антиэритроцитарные антитела.

**Abstract:** Red blood cell alloimmunization is a key link in the pathogenesis of post-transfusion complications of the hemolytic type. Patients with polyspecific antibodies are at high risk. Anti-erythrocyte antibodies were found in 7,9 % of patients at the hematology clinic.

**Ключевые слова:** аллоиммунизация; скрининг антител; антигены; антитела.

**Index terms:** alloimmunization; antibody screening; antigens; antibodies.

**Введение.** Скрининг антиэритроцитарных антител относится к обязательным лабораторным исследованиям, которые выполняются при каждом поступлении больного в гематологическую клинику [1, 3], что позволяет выявить риск развития посттрансфузионных гемолитических реакций. К группе высокого риска относятся пациенты с полиспецифическими антителами, которые могут экранировать специфические аллоантитела, имеющие клиническое значение [4]. Аллоиммунизация к антигенам эритроцитов лежит в основе развития посттрансфузионных осложнений гемолитического типа. Высокий уровень аллоиммунизации может быть связан как с патогенезом заболевания, так и с особенностями проведения трансфузионной терапии – постоянной и на протяжении длительного периода времени [2, 5]. Наличие в анамнезе у больных с гематологической патологией многократных трансфузий повышает вероятность их иммунизации к антигенам эритроцитов доноров и развития посттрансфузионных осложнений.

**Цель** – оценить результаты скрининга и идентификации антител к антигенам эритроцитов у пациентов гематологической клиники.

#### Материалы и методы

Изучены результаты иммуногематологического обследования у 2130 пациентов, получавших лечение в 2017–2022 гг. в гематологической клинике ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России. Из них мужчин - 1102 (51,7%), женщин - 1028 (48,3%). Возраст больных – от 2 до 82 лет (медиана возраста 58 лет). Антитела к антиге-



нам эритроцитов больных определялись с помощью оборудования и реактивов производства Bio-Rad, США, в непрямом антиглобулиновом тесте. При статистической обработке результатов использован критерий  $\chi^2$ .

### Результаты и их обсуждение

У 168 (7,9%) больных в результате скрининга выявлены антитела к антигенам эритроцитов. Из них у 29,1% пациентов диагностированы лимфопролиферативные заболевания (у 13,1% - хронический лимфолейкоз, у 12,5% - неходжкинская лимфома, у 3,6% - лимфома Ходжкина), у 27,4% - множественная миелома, у 11,3% - острые лейкозы (у 7,7% - острый лимфобластный лейкоз, у 3,6% - острый миелобластный лейкоз), у 6,5% - гемолитическая анемия, у 7,1% - идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура, у 4,8% - миелодиспластический синдром, у 3,6% - апластическая анемия, 2,4% - хронический миелолейкоз, у 1,8% - гемофилия А, у 3,6% - другие гематологические заболевания.

В результате иммуногематологического обследования у пациентов зафиксированы 203 (9,5%) случая выявления антител различной специфичности. С высокой частотой обнаруживались полиспецифические антитела (43,8% случаев) ( $p < 0,01$ ), из которых 67,4% составили полиспецифические аутоиммунные антитела (ПСАУАТ), характерные для пациентов с аутоиммунной гемолитической анемией и больных, получавших препараты на основе моноклональных анти-CD38 антител. Появление полиспецифических антител осложняет как обнаружение аллоиммунных антител, так и подбор совместимых доноров эритроцитов, зачастую делая его невозможным. У 26,6% пациентов, иммунизированных к антигенам эритроцитов, выявлены специфические антитела, что обусловлено беременностями, предыдущими трансфузиями эритроцитов, введением иммуноглобулинов. Также обнаружены аллоантитела неустановленной специфичности (23,6%).

При анализе результатов скрининга и идентификации антиэритроцитарных антител у пациентов, впервые поступивших в гематологическую клинику, в 111 (54,7%) случаях выявлены антиэритроцитарные антитела, из них ПСАУАТ определялись чаще (36,9%), чем другие варианты антител ( $p < 0,01$ ). Специфические антитела установлены в 33,3% случаев (табл. 1). Антитела к антигенам системы Резус превалировали над другими и составили в совокупности 17,1% ( $p < 0,01$ ). Аллоиммунизация к антигену Д у пациентов возникала после беременности и введения иммуноглобулинов. Положительными на антитела к антигену К оказа-

лись 2,7% обследуемых. Помимо антител к антигенам системы Резус и Kell, определены клинически значимые антитела к минорным антигенам: анти-М (2,7%), анти-Кра (1,8%), анти-Јка (1,8%), анти-Lea (0,1%), анти-Lua (0,1%). Антитела к антигену Сw диагностированы у 1,8% больных, аутоиммунные специфические антитела, такие как ауто анти-е – у 1,8%, ауто анти-Д – у 0,9%, ауто анти-С - 0,9%. Первичные пациенты являлись носителями аллоантител неустановленной специфичности (17,1%) и полиспецифических аллоантител (ПСАТ) (7,2 %).

У больных, неоднократно получавших лечение в гематологической клинике, зафиксировано 92 (44,4 %) случая обнаружения антиэритроцитарных антител. На фоне терапии чаще выявлялись аллоантитела неустановленной специфичности (38,0%) ( $p < 0,01$ ) (табл.1). Полиспецифические антитела определялись в 41,7% случаев, из которых ПСАУАТ установлены у 19 пациентов (20,7 %), ПСАТ – у 21 пациента (22,8 %). У 24 больных наблюдались полиспецифические антитела после получения терапии моноклональными анти- CD38 антителами. Установлено 18,5% случаев выявления специфических антител: анти-Е - 7,6%, анти-М - 5,4%, анти-Д -3,3%, анти-С – 1,0 %, ауто анти-С – 1,0%. Появление антител к антигену Д у пациентов обусловлено введением человеческого иммуноглобулина.

Таблица 1 - Частота встречаемости антиэритроцитарных антител различной специфичности

Специфичность антител	Первичные пациенты, абс.	Повторные пациенты, абс.
<b>Полиспецифические</b>	<b>49 (44,1 %)</b>	<b>40 (43,5 %)</b>
- аутоантитела	41 (36,9 %)	19 (20,7 %)
- аллоантитела	8 (7,2 %)	21 (22,8 %)
<b>Специфические антитела</b>	<b>37 (33,3 %)</b>	<b>17 (18,5 %)</b>
- анти-Д	10 (9,0 %)	3 (3,3 %)
- анти-Е	4 (3,6 %)	7 (7,6 %)
- анти-С	5 (4,5 %)	1 (1,0 %)
- анти-К	3 (2,7 %)	-
- анти-Сw	2 (1,8 %)	-
- анти-М	3 (2,7 %)	5 (5,4 %)
- анти-Кра	2 (1,8 %)	-
- анти-Lea	1 (0,9 %)	-
- анти-Lua	1 (0,9 %)	-
- анти-Јка	2 (1,8 %)	-
- ауто анти-Д	1 (0,9 %)	-
- ауто анти-С	1 (0,9 %)	1 (1,0 %)
- ауто анти-е	2 (1,8 %)	-
<b>Аллоантитела неустановленной специфичности</b>	<b>25 (22,6 %)</b>	<b>35 (38,0 %)</b>
<b>Всего</b>	<b>111 (100 %)</b>	<b>92 (100 %)</b>

### Заклучение

У 7,9% больных гематологической клиники ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России выявлялись антиэритроцитарные антитела. Среди них преобладали полиспецифические антитела (43,8% случаев) ( $p < 0,01$ ), которые затрудняли индивидуальный подбор совместимых доноров в непрямом антиглобулиновом тесте «вслепую» или делали его невозможным. Доля пациентов со специфически-

ми антителами составила 26,6%. Наиболее часто определялись анти-Д (6,4%), анти-Е (5,4%), анти-М (3,9%) аллоантитела ( $p < 0,01$ ). Аллоантитела неустановленной специфичности обнаруживались у 23,6 % больных.

#### Список литературы

1. Бутина, Е. В. Алгоритм подбора доноров эритроцитов / Е. В. Бутина, Е. А. Попонина, А. В. Йовдий, Ф. С. Шерстнев, И. В. Парамонов // Трансфузиология. — 2021. — Т.22 №3. — С.235-242.
2. Бутина, Е. В. Аллоиммунизация к антигенам эритроцитов у пациентов с гематологическими и онкогематологическими заболеваниями / Е. В. Бутина, Н. В. Минеева, Г. А. Зайцева, Е. А. Попонина, А. В. Йовдий // Трансфузиология. — 2019. — Т.20, №2. — С. 107-114.
3. Бутина, Е. В. Результаты скрининга и идентификации антиэритроцитарных антител у пациентов гематологической клиники / Е. В. Бутина, Т. А. Коряковцева, О. Д. Максимов, Ф. С. Шерстнев, А. В. Караваева, Г. А. Зайцева // Трансфузиология. — 2018. — №1. — С. 57-66.
4. Минеева, Н. В. Группы крови человека. Основы иммуногематологии. / Н. В. Минеева. — 2-е изд., переработанное и дополненное. СПб: Гангут; 2020. 978-5-85875-600-2. ISBN: 978-5-85875-600-2
5. Минеева, Н. В. Аллосенсибилизация к антигенам эритроцитов (обзор литературы) / Н. В. Минеева, И. А. Пашкова, И. И. Кробинец, Е. А. Сысоева // Онкогематология. — 2015. — Т. 10. — № 4. — С. 60–65.
6. Минеева, Н. В. Частота выявления антиэритроцитарных, антилейкоцитарных, антитромбоцитарных аллоантител у больных гематологическими заболеваниями / Н. В. Минеева, С. В. Гавровская, И. И. Кробинец, И. А. Пашкова, Н. Н. Бодрова, Е. А. Сысоева // Онкогематология. — 2013. — Т.4 — С.13-17.

УДК 616-006.446.2

ГРНТИ 76.29.33

*Трегубова Е.В.*

младший научный сотрудник лаборатории клеточной и молекулярной  
иммунологии

Федеральное государственное учреждение науки «Кировский научно-  
исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального  
медико-биологического агентства», Киров

*E.V. Tregubova*

junior researcher of laboratory of cellular and molecular immunology  
The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of  
Hematology and Blood Transfusion under the Federal  
Medical Biological Agency, Kirov  
E-mail: tregubova@niigpk.ru

*Сарпова М.В.*

научный сотрудник лаборатории патоморфологии  
Федеральное государственное учреждение науки «Кировский научно-  
исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального  
медико-биологического агентства», Киров

*M.V. Sarpova*

researcher of laboratory pathomorphology  
The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of  
Hematology and Blood Transfusion under the Federal  
Medical Biological Agency, Kirov  
E-mail: sarpova@niigpk.ru

*Назарова Е.Л.*

к.м.н., зав. лабораторией клеточной и молекулярной иммунологии  
Федеральное государственное учреждение науки «Кировский научно-  
исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального  
медико-биологического агентства», Киров

*E.L. Nazarova*

PhD, MD, head of the laboratory of cellular and molecular immunology

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of  
Hematology and Blood Transfusion under the Federal  
Medical Biological Agency, Kirov

E-mail: nazarova@niigpk.ru

Минаев М.С.

младший научный сотрудник лаборатории патоморфологии  
Федеральное государственное учреждение науки «Кировский научно-  
исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального  
медико-биологического агентства», Киров

M.S. Minaev

junior researcher of laboratory pathomorphology

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of  
Hematology and Blood Transfusion under the Federal  
Medical Biological Agency, Kirov

E-mail: minaev@niigpk.ru

*Дьяконов Д.А.*

к.м.н., зав. лабораторией патоморфологии

Федеральное государственное учреждение науки «Кировский научно-  
исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального  
медико-биологического агентства», Киров

*D.A. Diakonov*

PhD, MD, head of the laboratory pathomorphology

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of  
Hematology and Blood Transfusion under the Federal  
Medical Biological Agency, Kirov

E-mail: dyakonov@niigpk.ru

## Микросателлитная нестабильность и aberrации локуса 9p24.1 при классической лимфоме Ходжкина

### Microsatellite instability and aberrations of the 9p24.1 locus in classical Hodgkins lymphoma

*Аннотация.* Проведена оценка частоты встречаемости микросателлитной нестабильности (MSI) и aberrаций в локусе 9p24.1 у больных классической лимфомой Ходжкина (кЛХ). Частота выявления MSI составила 12,3%. Установлено, что нормальное количество копий локуса 9p24.1 значимо чаще обнаруживается у пациентов с резистентным течением заболевания ( $p < 0,001$ ), в то время как увеличение числа копий 9p24.1 ассоциируется с полным ответом на стандартную линию терапии. Статистически значимых различий, связанных с наличием MSI и изменениями в локусе 9p24.1, а также с ответом на терапию, не обнаружено.

*Abstract.* The frequency of microsatellite instability (MSI) detection and at the locus 9p24.1 aberrations in patients with classical Hodgkins lymphoma (cHL) was evaluated. The detection rate of MSI was 12.3%. It was found that the normal copies number of the 9p24.1 is significantly more often found in patients with a resistant course of the disease ( $p < 0.001$ ), while an increase in the number of copies of 9p24.1 is associated with a complete response to the standard line of therapy. There were no statistically significant differences associated with presence MSI and 9p24.1 alterations, as well as with the response to therapy.

**Ключевые слова:** Микросателлитная нестабильность; лимфома Ходжкина; aberrации в локусе 9p24.1; блокада иммунных контрольных точек.

**Index terms:** Microsatellite instability; Hodgkin lymphoma; aberrations at 9p24.1 locus; immune checkpoint blockade.

**Введение.** С внедрением в клиническую практику ингибиторов иммунных контрольных точек (ИКТ), в частности лиганда программируемой клеточной гибели-1 (PD-L1), произошел прогресс в лечении химиорезистентных злокачественных новообразований. Гиперэкспрессия PD-L1 и высокая микросателлитная нестабильность (MSI-H) – хорошо известные биомаркеры, предсказывающие эффект ИКТ при различных солидных опухолях [4, 9].

MSI – состояние, обусловленное нарушением в системе репарации ошибочно спаренных оснований ДНК (mismatch repair deficiency, dMMR), которая в норме устраняет такие ошибки. Система dMMR состоит из пары белков MLH1, MSH2, выполняющих поиск поломок ДНК, и двух протеинов MSH6, PMS2, ко-

торые формируют комплекс с MLH1, MSH2 в месте выявленного дефекта ДНК. Дефицит белков системы MMR приводит к накоплению в опухолевых клетках большого количества микросателлитных повторов [2]. В результате возникают мутации со сдвигом рамки считывания, приводящие к раннему появлению стоп-кодона и инактивации разных генов. В свою очередь, рост числа этих aberrаций сопровождается увеличением количества опухолевых неоантигенов, распознаваемых иммунной системой. При этом злокачественные клетки с MSI защищены от воздействия иммунной системы высокой экспрессией лигандов PD-L1, CTLA-4, LAG-3 и IDO.

Имеются данные о связи уровня экспрессии PD-L1 с нестабильностью микросателлитов [3]. Как известно, злокачественные клетки классической лимфомы Ходжкина (кЛХ) характеризуются высокой экспрессией лигандов PD-L1 и PD-L2, которые возникают вследствие aberrаций в локусе 9p24.1, в частности генов CD274 (PD-L1) и PDCDL1LG2 (PD-L2), конститутивной активации пути JAK-STAT и при наличии инфекции, вызванной вирусом Эпштейна-Барр. Рядом исследований показана значимая роль изменений локуса 9p24.1 при кЛХ [1, 4, 5, 7, 10]. Выявлено, что амплификация 9p24.1 на момент постановки диагноза ассоциирована с продвинутой стадией кЛХ и с низкой беспрогрессивной выживаемостью пациентов после первой линии терапии [3, 4].

Несмотря на имеющиеся литературные данные, прогностическая значимость MSI и aberrаций 9p24.1 при кЛХ из-за небольшого количества опухолевого субстрата до сих пор остается неизученной [8].

**Цель.** Определить частоту встречаемости микросателлитной нестабильности, хромосомных aberrаций в локусе 9p24.1 при классической лимфоме Ходжкина и их связь с ответом на терапию.

**Материалы и методы.** Проанализировано 73 образца опухолевой ткани больных с впервые диагностированной кЛХ. Среди обследуемых 35 (47,9 %) мужчин и 38 (52,1 %) женщин. Медиана возраста в дебюте заболевания составила 32 года (min-max: 17-81 лет). Резистентное течение заболевания установлено в 24 (32,9 %) случаях. У всех пациентов в качестве первой линии терапии использовались стандартные протоколы (ABVD, BEACOPP).

Оценку MSI выполняли методом полимеразной цепной реакции с исполь-



зованием набора реагентов «CorDIS MSI» («Гордиз», Россия) с последующим фрагментным анализом продуктов амплификации капиллярным электрофорезом на генетическом анализаторе ABI 3500xL («Thermo Fisher Scientific», США). Нарушения генов PDL-1 и PD-L2 (PDL-1/2) оценивали методом флуоресцентной гибридизации in situ (FISH) на микроскопе AxioScope.A1 «CarlZeiss» (Германия) с использованием зондов CD274/PDCD1LG2/9qhet FISH probe («CytoCell», Великобритания) по стандартной методике в соответствии с протоколом фирмы-производителя.

Статистическая обработка результатов исследования осуществлялась по программе STADIA с применением непараметрических методов анализа. Различия считались статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

**Результаты и обсуждение.** Частота встречаемости микросателлитной нестабильности при КЛХ составила 12,3 % (9/73). Во всех случаях присвоен статус низкой MSI. Случаи без нарушений повторов микросателлитов считались стабильными (MSS). Увеличение числа копий (gain) 9p24.1 выявлено у 38 из 73 (52,1 %) больных, амплификация (amp) – у 15 (20,5 %), полисомия – у 5 (6,9 %), нормальное количество копий по хромосоме 9 – у 15 (20,5 %). Для последующего анализа amp и полисомия объединены в одну группу.

При сопоставлении наличия/отсутствия нарушений 9p24.1 с ответом на стандартную терапию выявлены статистически значимые различия (таблица 1).

Таблица 1 – Частота встречаемости aberrаций в локусе 9p24.1 в зависимости от ответа на терапию

Фактор		Ответ на терапию				p	ОШ;95% ДИ
		Полный ответ (n=49)		Резистентность (n=24)			
		Абс.	%	Абс.	%		
9p24.1	Норма	4	8,2	11	45,8	0,001	9,52 (2,59-34,94)
	amp/ полисомия	13	26,5	7	29,2	0,403	1,14 (0,39-3,37)
	gain	32	65,3	6	25,0	0,001	0,18 (0,06-0,53)

Представленные результаты показывают, что частота встречаемости gain 9p24.1 была выше у пациентов, достигших полного ответа (32/49, 65,3%,  $p = 0,001$ ), в то время как норма по хромосоме 9 чаще встречалась у больных с резистентным течением заболевания (11/24, 58,3%) ( $p < 0,001$ ).

При сопоставлении aberrаций генов PDL-1 и PDL-2 со стадией кЛХ и статусом MSI статистически значимых различий не обнаружено ( $p=0,16$  и  $p=0,41$  соответственно). Ассоциации MSI с ответом на терапию также не выявлено ( $p=0,123$ ) (таблица 2), при этом следует отметить, что частота MSI при резистентности к лечению выше (20,8%), чем у пациентов, достигших полного ответа на стандартную терапию (8,2%).

Таблица 2 – Статус микросателлитов в зависимости от ответа на терапию

Фактор	Ответ на терапию				p	ОШ; 95% ДИ
	Полный ответ (n=49)		Резистентность (n=24)			
	Абс.	%	Абс.	%		
MSS	45	91,8	19	79,2	0,123	2,96 (0,72-12,25)
MSI	4	8,2	5	20,8		0,34 (0,08-1,40)

По данным ряда авторов, амплификация генов PDL-1/2 при кЛХ связана с более короткой выживаемостью без прогрессирования, в отличие от пациентов, имеющих увеличение числа копий, полисомию или нормальное количество копий (дисомия) локуса [1, 3, 7, 10]. Полученные нами результаты свидетельствуют об обратном. В представленном исследовании опухолевые клетки кЛХ с нормальным числом копий хромосомы 9 детектировались чаще у пациентов с резистентным течением заболевания. В имеющихся исследованиях, касающихся альтераций генов PDL-1 и PDL-2 при различных злокачественных новообразованиях, дисомии выявлялись реже других нарушений и чаще ассоциировались с благоприятным прогнозом заболевания [4, 7, 11]. В нашем случае это может быть связано, прежде всего, с качеством и количеством анализируемого материала, с однородностью и численностью представленной выборки, а также с популяционной принадлежностью пациентов.

Результаты исследования MSI, в целом, коррелируют с данными зарубежных авторов [6, 8]. Однако анализ опухолевого материала, фиксированного формалином, при лимфоме Ходжкина практически не проводился. Большинство ра-

бот выполнено с использованием клеточных линий, поэтому следует отметить, что требуются дальнейшие исследования для определения роли нестабильности микросателлитов в развитии и течении кЛХ [6].

**Выводы.** Микросателлитная нестабильность выявлена в 12,3% случаях с впервые диагностированной кЛХ. Среди хромосомных aberrаций в локусе 9p24.1 чаще встречались увеличение количества копий (52,1%) и амплификации (20,5%). Однако при сравнении обнаруженных альтераций в зависимости от ответа на стандартную терапию выявлено, что нормальное количество копий (15/73) генов PDL-1 и PDL-2 ассоциировано с резистентностью к лечению (45,8%,  $p < 0,001$ ), в то время как gain чаще обнаруживался у пациентов, достигших полного ответа (65,3%,  $p = 0,001$ ). Для подтверждения полученных результатов и обоснования использования MSI и нарушений генов PDL-1/2 в качестве дополнительных прогностических маркеров необходимо проведение дальнейших исследований с целью отбора группы больных с неблагоприятным течением кЛХ.

#### Список литературы

1. Лепик К.В. Эффективность и безопасность PD-1 ингибитора (ниволумаба) в лечении резистентной и рецидивирующей классической лимфомы Ходжкина [текст]: дис. ... канд.мед.наук 14.00.21: С-Петерб.гос.мед.унив.им.ак. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, 2019. – 152с.
2. Навматуля, А.Ю., Чубенко, В.А., Савчук, С.А., Альмухаметова, Ф.Р. Проспективное исследование неоадьювантной иммунотерапии анти-PD-1/PD-L1 препаратами больных местно-распространенным раком желудка с микросателлитной нестабильностью / А.Ю. Навматуля, В.А. Чубенко, С.А. Савчук, Ф.Р. Альмухаметова. –DOI: 10.31917/2204244 // Практическая онкология. – 2021. – Т.22, №4. – С.244-254.
3. Трякин, А.А., Федянин, М.Ю., Цуканов, А.С. Микросателлитная нестабильность как уникальная характеристика опухолей и предиктор эффективности иммунотерапии / А.А. Трякин, М.Ю. Федянин, А.С. Цуканов [и др.]. – DOI: 10.18027 / 2224 5057 2019 9 4 59-69 // Злокачественные опухоли. Российское общество клинической онкологии. – 2019. –Т. 9(4). – С.59-69.
4. Cho, Y.A.; Lee, H.; Kim, D.G. PD-L1 Expression Is Significantly Associated with Tumor Mutation Burden and Microsatellite Instability Score / Y.A. Cho, H. Lee, D.G. Kim [et al.]. – doi.org/10.3390/ cancers13184659 / Cancers. – 2021. – V.13. –P.4659.

5. Chen, X., Kong, H., Luo, L. High efficacy of PD-1 inhibitor after initial failure of PD-L1 inhibitor in Relapsed/Refractory classical Hodgkin Lymphoma / X. Chen [et al.].–doi.org/10.1186/s12885-021-09028-4 // BMC Cancer. – 2022. – 22:9.
6. Cuceu, C., Colicchio, B., Jeandidier E. Independent Mechanisms Lead to Genomic Instability in Hodgkin Lymphoma: Microsatellite or Chromosomal Instability / C. Cuceu, B. Colicchio, E. Jeandidier [et al.]. – doi:10.3390/cancers10070233 // Cancers. – 2018. – 10(7):233. – P.1-23.
7. Roemer, M., Advani, R., Ligon, A. PD-L1 and PD-L2 Genetic Alterations Define Classical Hodgkin Lymphoma and Predict Outcome / M. Roemer, R. Advani, A. Ligon [et al.]. – DOI: 10.1200/JCO.2016.66.4482 // J Clin Oncol. – 2016. – V.34(23). – P.2690-2697.
8. Kacher, R., Cuceu, C., Colicchio, B. Microsatellite and chromosomal instability constitute two mechanisms that independently lead to genomic instability in Hodgkin lymphoma / Poster Conference: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON HODGKIN LYMPHOMA ISHL11 // URL: [https://www.researchgate.net/publication/338902109\\_Microsatellite\\_and\\_chromosomal\\_instability\\_constitute\\_two\\_mechanisms\\_that\\_independently\\_lead\\_to\\_genomic\\_instability\\_in\\_Hodgkin\\_lymphoma](https://www.researchgate.net/publication/338902109_Microsatellite_and_chromosomal_instability_constitute_two_mechanisms_that_independently_lead_to_genomic_instability_in_Hodgkin_lymphoma).
9. Thomas, BS, Ah-Reum Jeong, MD. Tumor Mutational Burden and PD-L1 Expression in Hematologic Malignancies / BS. Thomas, MD. Ah-Reum Jeong [et al.]. – doi.org/10.1182/blood-2020-134375 // Blood – 2020. – 136 (Supplement 1):15.
10. Wei Xie, L. Jeffrey Medeiros, Shaoying Li. PD-1/PD-L1 Pathway and Its Blockade in Patients with Classic Hodgkin Lymphoma and Non-Hodgkin Large-Cell Lymphomas / doi.org/10.1007/s11899-020-00589-y // Current Hematologic Malignancy Reports. – 2020. – 15. – P.372–381.
11. Yang, L., Liu, S., He W., Xiong Z., Xia L. Characterisation of tumor microenvironment and prevalence of CD274/PD-L1 genetic alterations difference in colorectal Cancer / doi.org/10.1186/s12885-023-10610-1 // BMC Cancer. – 2023. – 23:221. – P.1-11.

УДК 616-006.441

ГРНТИ 76.29.33

*А.Н. Турубанова*

ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», Киров  
младший научный сотрудник лаборатории патоморфологии

*A.N. Turubanova*

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agency,  
Kirov

Junior Researcher at the Laboratory of Pathomorphology

E-mail: turubanova@niigpk.ru

*М.В. Сарпова*

ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», Киров  
научный сотрудник лаборатории патоморфологии

*M.V. Sarpova*

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agency,  
Kirov

Researcher of the Laboratory of Pathomorphology

E-mail: sarpova@niigpk.ru

*Д.А. Дьяконов*

ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», Киров  
кандидат медицинских наук, заведующий лабораторией патоморфологии

*D.A. Diakonov*

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agency,  
Kirov

Candidate of Medical Sciences, Head of the Laboratory of Pathomorphology

E-mail: dyakonov@niigpk.ru

*V.A. Rosin*

ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», Киров  
кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории  
патоморфологии

*V.A. Rosin*

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agency,  
Kirov

Candidate of Medical Sciences, Senior Researcher of the Laboratory of Pathomorphology

E-mail: rosin@niigpk.ru

*S.V. Samarina*

ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», Киров  
кандидат медицинских наук, заведующая клинико-диагностическим отделением  
гематологии и химиотерапии с дневным стационаром

*S.V. Samarina*

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agency,  
Kirov

Candidate of Medical Sciences, Head of the Clinical Diagnostic Department of Hematology and Chemotherapy

E-mail: samarina@niigpk.ru

*S.D. Golovko*

ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», Киров  
младший научный сотрудник лаборатории патоморфологии

*S.D. Golovko*

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agency,  
Kirov

Junior Researcher at the Laboratory of Pathomorphology

E-mail: sergey.golovko.work@mail.ru

**Взаимосвязь хромосомных aberrаций в локусе BCL6 (3q27) с  
выживаемостью больных диффузной В-крупноклеточной лимфомой  
The relationship chromosomal aberration at the BCL6 (3q27) locus with  
survival of patients with Diffuse Large B-cell Lymphoma**

*Аннотация.* Исследована взаимосвязь хромосомных aberrаций в локусе BCL6 (3q27) с выживаемостью больных диффузной В-крупноклеточной лимфомой. Выявлено, что наличие реаранжировки BCL6 ассоциировано с низкой общей выживаемостью пациентов с ДВККЛ.

*Abstract.* The relationship of chromosomal aberrations at the BCL6 locus with the survival of patients with diffuse B-large cell lymphoma was investigated. It was revealed that the presence of BCL6 rearrangement is associated with low overall survival of patients with DLBCL.

**Ключевые слова:** BCL6; ДВККЛ; выживаемость

**Index terms:** BCL6; DLBCL; survival

**Введение.** Диффузная В-крупноклеточная лимфома (ДВККЛ) – наиболее распространенный вариант агрессивных лимфопролиферативных заболеваний [14]. Патология представляет собой высокогетерогенную группу опухолей, различающихся по морфологическим, иммунофенотипическим, генетическим характеристикам, а также по клиническому течению и прогнозу [3, 8].

Стандартной терапией первой линии для пациентов с ДВККЛ является протокол R-СНОР (ритуксимаб, циклофосфамид, доксорубицин, винкристин, преднизолон) [6]. Эффективность лечения наблюдается только в половине случаев, у 40% больных развивается прогрессия или рецидивирующее/рефрактерное течение заболевания [3].

Для определения прогноза течения ДВККЛ используются различные системы оценки рисков, базирующиеся на морфологических, клинических и генетических факторах. Одна из них – международный прогностический индекс (МПИ) [4]. Клинические прогностические критерии не всегда позволяют точно определить выживаемость больных с данной патологией [6]. В связи с этим поиск дополнительных предикторов течения ДВККЛ актуален в настоящее время.

Одной из причин опухолевой гетерогенности и широкой вариабельности клинических исходов являются молекулярно-генетические изменения, происходящие в клетках. К наиболее частым хромосомным аномалиям при ДВККЛ относят перестройки MYC, BCL2 и BCL6 [7, 8]. Ген BCL6 локализуется в хромосомном регионе 3q27 и кодирует фактор транскрипции, который имеет решающее значение для нормального развития В-клеток в зародышевом центре фолликула

путем поддержания эпигенетического и транскрипционного состояния. Известно, что активность BCL6 может дерегулироваться различными механизмами, что способствует в дальнейшем развитию В-клеточной лимфомы [1, 13, 15].

Зарубежные авторы в своих работах доказали ассоциацию транслокации с вовлечением локуса BCL6 с благоприятным исходом у больных ДВККЛ. К. Offit и соавт. обнаружили корреляционную зависимость между перестройкой BCL6 и повышением выживаемости пациентов. В группе пациентов с реаранжировкой BCL6 беспрогрессивная выживаемость составила 82% (медиана не достигнута) против 49% (медиана 70 мес.) в группе без данной аберрации. Многомерный анализ показал, что перестройка 3q27 была наиболее сильным предиктором высокой общей и беспрогрессивной выживаемости больных. Риск неблагоприятного исхода в 0,09 раза ниже у обследованных с реаранжировкой BCL6, чем у лиц с ее отсутствием [9, 12, 14].

Аберрации в локусе BCL6 могут быть связаны с агрессивным клиническим течением заболевания, устойчивостью к стандартной химиотерапии и летальным исходом [8, 11]. J. Shustik и соавт. (2010) изучили корреляцию между перестройкой BCL6 и характером течения ДВККЛ. Реаранжировка гена обнаруживалась в 19,5% случаев, ассоциировалась с non-GCB подтипом заболевания, коррелировала с высоким МПИ. Наблюдалась тенденция к снижению общей выживаемости (ОВ) у пациентов с перестройкой BCL6, получавших R-СНОР. При многофакторном анализе не подтверждена независимая прогностическая значимость данной генетической аберрации [7].

N. Akyurek и соавт. (2012) выявили перестройки BCL6 у 69 (29%) из 239 пациентов с ДВККЛ. Значимой связи данной реаранжировки с клиническими характеристиками, экспрессией белка BCL6, индексом пролиферации Ki-67 не выявлено. Наличие перестройки BCL6 коррелировало с низкой ОВ больных. Пациенты с non-GCB подтипом заболевания и аберрацией BCL6 имели значительно меньшую выживаемость. В многофакторном анализе Кокса, который включал МПИ, стадию и перестройки BCL6 и MYC, только МПИ и перестройка MYC оставались независимыми прогностическими факторами для ОВ [11].

Прогностическая роль дополнительных копий BCL6 при ДВККЛ менее изучена. С. Хуанг и соавт. (2019) исследовали 130 случаев ДВККЛ с аномалиями в генах MYC, BCL2 и BCL6. Распространенность дополнительных копий BCL6 составила 14,6%, а реаранжировка гена – 16,9%. Дополнительные копии гена чаще выявлялись у лиц мужского пола. У пациентов с реаранжировкой BCL6 общая выживаемость была низкой. В однофакторном анализе перестройка гена имела прогностическую значимость, однако в многофакторном анализе утрачивалась.



Авторы предполагают, что пациенты с дополнительными копиями MYC, BCL2 и BCL6 могут иметь менее благоприятный прогноз заболевания [10]. Единого мнения о влиянии реаранжировки BCL6 на прогноз и течение заболевания на сегодняшний день не существует. Таким образом, основываясь на данных литературы, актуальным является изучение взаимосвязи между наличием генетических изменений в локусе BCL6 (3q27) с характером течения ДВККЛ.

**Цель исследования.** Определить взаимосвязь хромосомных aberrаций в локусе BCL6 (3q27) с выживаемостью больных диффузной В-крупноклеточной лимфомой.

**Материалы и методы.** Изучены архивные образцы (парафиновые блоки/кассеты) биоптатов лимфатических узлов и опухолевых образований, полученные от 100 пациентов с впервые установленным диагнозом ДВККЛ, наблюдавшихся в клинике ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России в период с 2012 по 2019 гг. Из них мужчины составили 49% (n=49), женщины – 51% (n=51), медиана (Me) возраста – 59 лет (Q1-Q3: 49-67,5 лет). Все больные получали стандартную иммунохимиотерапию первой линии по схеме R-СНОР. Стадирование пациентов с ДВККЛ проведено согласно классификации по Ann Arbor [2]. У 37% (n=37) больных установлены 1 и 2 стадии заболевания, у 63% (n=63) – 3 и 4 стадии. Подтип опухоли определен на основании алгоритма С.Р. Hans [5]. У большей части обследованных выявлен non-GCB (не герминальный) подтип ДВККЛ – 71% (n=71) случаев, GCB-подтип определен у 29% (n=29). Согласно балльной системе оценки МПИ всех больных разделили на 2 группы риска. В 1 группу с низким и низким-промежуточными значениями прогностического индекса включены 50% пациентов, во 2 группу вошли 50% больных с высоким-промежуточным и высоким прогностическим индексом. Высокая активность ЛДГ выявлена у 70% обследованных, в 30% случаев ее уровень находился пределах референтных значений.

Реаранжировку в локусе BCL6 (3q27) изучали методом флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH) на гистологических образцах опухолевой ткани с использованием ДНК-зондов Kreatech BCL6 (3q27) Break FISH probe. Оценка препаратов осуществлялась с помощью флуоресцентного микроскопа Axio Scope A1 («Carl Zeiss», Германия), оснащенного камерой для получения цифровых изображений препаратов. В каждом случае анализировали не менее 100 ядер с подсчетом сигналов. При наличии свободных сигналов 3'- и/или 5'-фрагментов локуса BCL6 (3q27) устанавливали реаранжировку гена. Образцы с двумя сливными сигналами классифицировали нормальными. При появлении 3 и более сливных сигналов определяли увеличение копий локуса. Пороговое значение для установления хромосомной aberrации BCL6 составляло >10%.

Статистическая обработка данных произведена с использованием программного обеспечения IBM SPSS Statistics 26. Пятилетнюю общую (ОБ) и беспрогрессивную выживаемость (БПВ) рассчитывали по методу Каплана-Мейера с использованием критерия log-rank test. Риск наступления события определяли с помощью регрессионного анализа Кокса с расчетом отношения рисков (ОР) и 95% доверительного интервала (ДИ). Различия между показателями считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

**Результаты и обсуждение.** Реаранжировка BCL6 диагностирована у 17% больных ( $n=17$ ). Увеличение копий локуса 3q27 выявлено в 31% ( $n=31$ ) случаев, при этом у 6% ( $n=6$ ) обследованных при наличии перестройки обнаружены дополнительные копии, не вовлеченные в транслокацию. В 46% ( $n=46$ ) хромосомный регион 3q27 оставался интактным.

Установлено, что при наличии у обследованных реаранжировки BCL6 (медиана 46 месяцев) пятилетняя ОБ значимо ниже, чем у пациентов с ее отсутствием (медиана не достигнута): 43,5% против 70,1% соответственно ( $p=0,018$ ; рисунок 1а). Риск летального исхода в 2,2 раза выше у больных с перестройкой BCL6, чем у лиц без данной аберрации ( $ОР=2,2$ ;  $ДИ=1,12-4,38$ ). Наблюдалась тенденция к снижению БПВ у больных с наличием перестройки в локусе 3q27 ( $p=0,068$ ; рисунок 1б). При оценке ОБ и БПВ у обследованных с увеличением копий BCL6 статистической значимости не выявлено (данные не представлены).

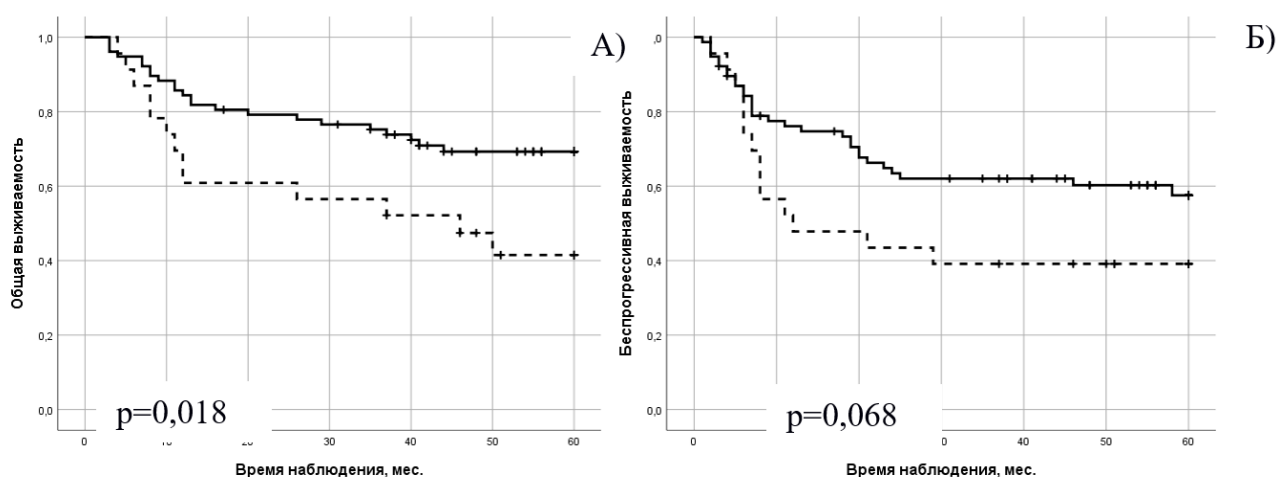


Рисунок 1 – Общая (А) и беспрогрессивная (Б) выживаемость больных ДВККЛ в зависимости от наличия (пунктирная линия) или отсутствия (сплошная линия) реаранжировки BCL6

В многофакторный анализ Кокса предикторов ОВ включены показатели: МПИ>2, реаранжировка BCL6, наличие дополнительных копий BCL6, non-GCB подтип. Установлено, что транслокация с вовлечением BCL6 явилась независимым неблагоприятным предиктором низкой ОВ наряду с МПИ>2 у больных ДВККЛ. Риск летального исхода в 2,1 раза выше у пациентов с перестройкой гена, чем у обследованных с ее отсутствием (p=0,033; ОР=2,1; ДИ=1,06-4,17; таблица 1).

Таблица 1 – Результаты многофакторного регрессионного анализа Кокса предикторов общей выживаемости

Параметры	ОВ		
	ОР	95% ДИ	p
МПИ>2	5,1	2,29-11,18	<0,001*
Реаранжировка BCL6	2,1	1,06-4,17	0,033*

Примечание: \* – различия показателей статистически значимы (p<0,05)

**Выводы.** Наличие реаранжировки BCL6 ассоциировано с низкой общей выживаемостью больных ДВККЛ. При многофакторном анализе Кокса установлено, что перестройка локуса BCL6 является независимым прогностическим предиктором неблагоприятного течения заболевания.

#### Список литературы

1. Мисюрина А. Е. Роль экспрессии генов с-МУС, BCL2 и BCL6 в патогенезе диффузной В-крупноклеточной лимфомы / А. Е. Мисюрина, В. А. Мисюрин, Е. А. Варях, А. М. Ковригина, С. К. Кравченко // Клин. онкогематол. – 2014. – №4. – С.512-521.
2. Поддубная И. В. Диффузная В-клеточная крупноклеточная лимфома. Российские клинические рекомендации по диагностике и лечению лимфопролиферативных заболеваний / И. В. Поддубная, В. Г. Савченко // М., ООО «БукиВеди». – 2018. – С.58.
3. Расторгуев С. М. Клиническое и прогностическое значение молекулярных маркеров диффузной В-крупноклеточной лимфомы / С. М. Расторгуев, Д. А. Королева, Е. С. Булыгина // Клин. онкогематол. – 2019. – №12. – С.95-100.
4. Самарина С. В. Клинико-гематологические показатели прогноза ответа на терапию первой линии у пациентов с диффузной В-крупноклеточной лимфомой / С. В. Самарина, Е. Л. Назарова, Н. В. Минаева // Клиническая онкогематология. – 2019. – №12. – С.68-72.

5. Carvalho P. S. Clinical and Molecular Properties of Human Immunodeficiency Virus-Related Diffuse Large B-Cell Lymphoma / P.S. de Carvalho, F.E. Leal, M.A. Soares // *Front. Oncol.* – 2021. – Vol.11. – P.1-17.
6. Clinical characteristics and outcomes of patients with diffuse large B cell lymphoma treated with R-CHOP-like or CHOP-like regimens: an 8-year experience from a single center / H. Huang, L. Fan, D. Fu et al. // *Ann Palliat Med.* – 2020. – Vol.9. – №4. – P.1442-1452.
7. Correlations between BCL6 rearrangement and outcome in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with CHOP or R-CHOP / J. Shustik, G. Han, P. Farinha et al. // *Haematologica.* – 2010. – Vol.95. – №1. – P.96-101.
8. Li, Sh. Diffuse large B-cell lymphoma / Sh. Li, K.H. Young, J. Medeiros // *Pathology.* – 2018. – Vol.50. – №1. – P.74-87.
9. Ohno, H. Significance of rearrangement of the BCL6 gene in B-cell lymphoid neoplasms / H. Ohno, S.Fukuhara // *Leuk Lymphoma.* – 1997. – Vol.27. – №.1-2. – P.53-63.
10. Prognostic impact of diffuse large B-cell lymphoma with extra copies of MYC, BCL2 and/or BCL6: comparison with double/triple hit lymphoma and double expressor lymphoma / S. Huang, L. Nong, W. Wang et al. // *Diagn Pathol.* – 2019. – Vol.14. – №81. – P.1-12.
11. Prognostic significance of MYC, BCL2, and BCL6 rearrangements in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone plus rituximab / N. Akyurek, A. Uner, M. Benekli et al. // *Cancer.* – 2012. – Vol.118. – №17. – P.4173-4183.
12. Rearrangement of the BCL-6 gene as a prognostic marker in diffuse large-cell lymphoma / K. Offit, F.L. Coco, D.C. Louie et al. // *N Engl J Med.* – 1994. – Vol.331. – P.74-80.
13. The Expanding Role of the BCL6 Oncoprotein as a Cancer Therapeutic Target / M.G. Cardenas, E. Oswald, W. Yu et al. // *Clin Cancer Res.* – 2017. – Vol.23. – №4.– P.885-893.
14. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues / S. H. Swerdlow, E. Campo, N. L. Harris et al. // 4th ed. Lyon, France: IARC. - 2017.
15. Yang H. Epigenetic Programming of B-Cell Lymphoma by BCL6 and Its Genetic Deregulation / H. Yang, M.R. Green // *Front Cell Dev Biol.* – 2019. – Vol.7.– №272. – P.1-











