

**Федеральное государственное бюджетное учреждение  
«Российский научно-исследовательский институт  
гематологии и трансфузиологии  
Федерального медико-биологического агентства»**

**ВЕСТНИК ГЕМАТОЛОГИИ  
THE BULLETIN OF HEMATOLOGY**

**Том XVII № 3 2021**

Ежеквартальный научно-практический журнал  
Основан в сентябре 2004 года

**Главный редактор**  
Заслуженный деятель науки РФ  
Доктор медицинских наук  
профессор  
*С.С. Бессмельцев*

Санкт-Петербург  
2021

## **Редакционная коллегия:**

*С. С. Бессмельцев* (главный редактор), заслуженный деятель науки РФ, доктор медицинских наук, профессор, академик РАЕ, Санкт-Петербург;

*А. Н. Богданов*, доктор медицинских наук, профессор, Санкт-Петербург;

*Л. Н. Бубнова*, заслуженный деятель науки РФ, доктор медицинских наук, профессор, Санкт-Петербург;

*Т. В. Глазанова* (ответственный секретарь), доктор медицинских наук, Санкт-Петербург;

*С. В. Грицаев*, доктор медицинских наук, Санкт-Петербург;

*С. А. Гусева*, доктор медицинских наук, профессор, г. Киев (Украина);

*И. Л. Давыдкин*, доктор медицинских наук, профессор, г. Самара;

*А. Ю. Зарицкий*, доктор медицинских наук, профессор, Санкт-Петербург;

*Н. М. Калинина*, доктор медицинских наук, профессор, Санкт-Петербург;

*Л. П. Папаян*, доктор медицинских наук, профессор, Санкт-Петербург;

*Р. М. Рамазанова*, доктор медицинских наук, профессор, г. Алматы (Республика Казахстан);

*Н. А. Романенко*, доктор медицинских наук, Санкт-Петербург;

*О. А. Рукавицын*, доктор медицинских наук, профессор, г. Москва;

*В. Н. Чеботкевич*, доктор медицинских наук, профессор, Санкт-Петербург.

## **Редакционный совет:**

*К. Т. Бобоев*, доктор медицинских наук, профессор, г. Ташкент (Республика Узбекистан)

*А. К. Голенков*, доктор медицинских наук, профессор, академик РАЕН, заслуженный врач РФ, г. Москва;

*И. Г. Дуткевич*, доктор медицинских наук, профессор, заслуженный врач РФ, Санкт-Петербург;

*В. И. Мазуров*, доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, Санкт-Петербург;

*И. В. Поддубная*, доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, г. Москва;

*Т. И. Поспелова*, доктор медицинских наук, профессор, заслуженный врач РФ, г. Новосибирск;

*А. Г. Румянцев*, доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, г. Москва;

*В. Г. Савченко*, доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, г. Москва.

Зав. редакцией — кандидат медицинских наук, доцент

*Е. Р. Шилова*, тел.: (812) 717-58-57

Ответственный секретарь — доктор медицинских наук

*Т. В. Глазанова*, тел.: (812) 717-08-90, факс: (812) 717-20-87

Импакт-фактор РИНЦ: 0,387

## **Адрес редакции:**

191024, Санкт-Петербург, ул. 2-я Советская, д. 16

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

Сайт: [www.bloodscience.ru](http://www.bloodscience.ru)

За содержание рекламных объявлений редакция ответственности не несет.

При перепечатке материалов ссылка на журнал «Вестник гематологии» обязательна.

Мнение членов редакционной коллегии не всегда совпадает с мнением авторов статей.

---

Обложка и художественное оформление *М. В. Келер*

Компьютерная верстка *М. В. Келер*

Журнал зарегистрирован Северо-Западным окружным межрегиональным территориальным управлением по Санкт-Петербургу и Ленинградской области Министерства Российской Федерации по делам печати, телерадиовещания и средствам массовых коммуникаций.

Свидетельство о регистрации ПИ № 2-7271 от 28 мая 2004 г.

Подписано в печать 12.05.2021 г. Формат бумаги 60 × 90 1/8.

Бумага офсетная. Печать офсетная. Тираж 500 экз. Заказ 55.

Издательство РосНИИГТ, 193024, Санкт-Петербург, ул. 2-я Советская, д. 16.

Отпечатано в ООО «Комильфо», Санкт-Петербург, наб. Обводного канала, д. 23.

18 +

# СОДЕРЖАНИЕ

## ПЕРЕДОВАЯ СТАТЬЯ

*Чеботкевич В.Н., Кулешова А.В., Киселева Е.Е., Бессмельцев С.С.*

МИКРОБИОМ ЧЕЛОВЕКА И ЕГО РОЛЬ В ГЕМОПОЭЗЕ И В РАЗВИТИИ МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМЫ .....	4
---	---

## ОРИГИНАЛЬНАЯ СТАТЬЯ

*Голенков А.К., Клинушкина Е.Ф., Катаева Е.В., Чукурина Ю.Ю., Митина Т.А., Трифонова Е.В., Захаров С.Г., Высоцкая Л.Л., Черных Ю.Б., Белоусов К.А., Савин А.О., Марьина С.А., Когарко И.Н., Когарко Б.С.*

АНАЛИЗ СВОБОДНЫХ ЛЕГКИХ ЦЕПЕЙ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ СЫВОРОТКИ КРОВИ У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ЛИМФОЛЕЙКОЗОМ В ПРОЦЕССЕ ХИМИОИММУНОТЕРАПИИ .....	10
---	----

## СЛУЧАЙ ИЗ ПРАКТИКИ

*Савин А.О., Клинушкина Е.Ф., Седов К.В.*

ОСТРЫЙ ПРОМИЕЛОЦИТАРНЫЙ ЛЕЙКОЗ, РАЗВИВШИЙСЯ ПОСЛЕ ИЗЛЕЧЕННОГО ЛИМФОГРАНУЛЕМАТОЗА ПО ПРОГРАММЕ ВЕАСОРР, ОСЛОЖНИВШИЙСЯ ДВС-СИНДРОМОМ С ТРОМБОЗОМ ВЕН НИЖНИХ КОНЕЧНОСТЕЙ И ТРОМБОЭМБОЛИЕЙ ЛЕГОЧНЫХ АРТЕРИЙ.....	19
--	----

## ГЕМАТОЛОГИЯ: ВЧЕРА, СЕГОДНЯ, ЗАВТРА

*Дудина Г.А., Мабудзаде Ч.К., Глуценко Д.Ю.*

ИСТОРИЯ ИЗУЧЕНИЯ КЛАССИФИКАЦИИ И ТЕРАПИИ МИЕЛОДИСПЛАСТИЧЕСКОГО СИНДРОМА (ЛЕКЦИЯ) .....	25
---	----

Вероссийская научно-практическая конференция с международным участием  
«Проблемы иммуногенетики в трансплантации органов, тканей и гемопоэтических стволовых клеток»

*Бубнова Л.Н., Павлова И.Е., Глазанова Т.В.*

ОБ ИСТОРИИ КОНФЕРЕНЦИЙ ПО ИММУНОГЕНЕТИКЕ В ФЕДЕРАЛЬНОМ ГОСУДАРСТВЕННОМ БЮДЖЕТНОМ УЧРЕЖДЕНИИ «РОССИЙСКИЙ НАУЧНО- ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ГЕМАТОЛОГИИ И ТРАНСФУЗИОЛОГИИ ФЕДЕРАЛЬНОГО МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКОГО АГЕНТСТВА» .....	39
--	----

МАТЕРИАЛЫ КОНФЕРЕНЦИИ .....	41
-----------------------------	----

# CONTENTS

## EDITORIAL ARTICLE

*Chebotkevich V.N., Kuleshova A.V., Kiseleva E.E., Bessmeltsev S.S.*

THE HUMAN MICROBIOME AND ITS ROLE IN HEMOPOIESIS AND IN THE DEVELOPMENT OF MULTIPLE MYELOMA.....	4
---	---

## ORIGINAL ARTICLES

*Golenkov A.K., Klinushkina E.F., Kataeva E.V., Chuksina Yu.Yu., Mitina T.A., Trifonova E.V., Zakharov S.G., Vysotskaya L.L., Chernykh Yu.B., Belousov K.A., Savin A.O., Maryina S.A., Kogarko I.N., Kogarko B.C.*

ANALYSIS OF FREE LIGHT CHAINS OF BLOOD SERUM IMMUNOGLOBULINS IN PATIENTS WITH CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA DURING CHEMOIMMUNOTHERAPY .....	10
---	----

## FOR PRACTICE

*Savin A.O., Klinushkina E.F. Sedov K.V.*

ACUTE PROMYELOCYTIC LEUKEMIA, WHICH DEVELOPED AFTER CURED LYMPHOGRANULOMATOSIS ACCORDING TO THE BEACOPP PROGRAM, COMPLICATED BY DISSEMINATED INTRAVASCULAR COAGULATION SYNDROME WITH VENOUS THROMBOSIS OF THE LOWER ENDPOINTS AND THROMBOEMBOLISM OF THE PULMONARY ARTERIES.....	19
---	----

## HEMATOLOGY: YESTERDAY, TODAY, TOMORROW

*Dudina G., Mabudzada C.K. Glushchenko D. Yu.*

HISTORY OF THE STUDY CLASSIFICATION AND THERAPY OF MYELOYDYSPLASTIC SYNDROME (LECTURE) .....	25
---	----

**Чеботкевич В.Н., Кулешова А.В., Киселева Е.Е., Бессмельцев С.С.**

*ФБГУ «Российский НИИ гематологии и трансфузиологии ФМБА России» г. Санкт-Петербург*

## **МИКРОБИОМ ЧЕЛОВЕКА И ЕГО РОЛЬ В ГЕМОПОЭЗЕ И В РАЗВИТИИ МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМЫ**

**Резюме.** Микробиом под которым понимают совокупность микроорганизмов, включающих бактерии, вирусы и грибы, колонизирующие человеческий организм, образует экологическую систему, критически важную для здоровья человека. На протяжении последнего десятилетия микробное сообщество (микробиом) организма человека было признано фундаментальным фактором, определяющим его физиологию и патологию. Исследования последних лет выявили важную роль микробиоты кишечника в гемопоэзе. Нарушение баланса кишечного микробио-

ма, дисбиоз, приводит к развитию различных нарушений, таких как воспалительные заболевания кишечника, ожирение. Ведущим фактором, способствующим возникновению дисбиоза у больных, является антибиотикотерапия. В последние несколько лет исследуется роль микробиома при гематологических заболеваниях. Активно изучается участие микробиоты в патогенезе гемобластозов, в частности множественной миеломы.

**Ключевые слова.** Микробиом, гемопоэз, гемобластозы, множественная миелома.

***Chebotkevich V.N., Kuleshova A.V., Kiseleva E.E., Bessmeltsev S.S.***

*Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology FMBA of Russia, Saint-Petersburg*

## **THE HUMAN MICROBIOME AND ITS ROLE IN HEMOPOIESIS AND IN THE DEVELOPMENT OF MULTIPLE MYELOMA**

**Abstract.** Microbiome, which is understood as a set of microorganisms including bacteria, viruses and fungi that colonize the human body form an ecological system that is critical to human health. Over the past decade, the microbial community (microbiome) of the human body has been recognized as a fundamental factor determined its physiology and pathology. Recent studies have revealed the important of gut microbiota in hemopoiesis. Violation of the balance of intestinal microbiota – dysbiosis

leads to the development of various disorders such as inflammatory bowel diseases, obesity. The leading factor contributing to the onset of dysbiosis in patients is antibiotic therapy. In the past few years, the role of microbiome in hematological diseases has been investigated. The participation of microbiota in the pathogenesis of hemoblastosis, in particular multiple myeloma is being actively studied.

**Keywords.** Microbiome, hemopoiesis, hemoblastosis, multiple myeloma.

**Введение.** В 2010 году в журнале «Nature» была опубликована работа под названием «Наш другой геном» (Our 'other' genome). Именно тогда начался активный пересмотр патогенеза ряда инфекционных и неинфекционных заболеваний человека с учетом новых данных о микробиоме человека. Важно осознать тот факт, что классические микробиологические (культуральные) методы оказались несостоятельны для исследования микробиоты человека. Более 70% видов микроорганизмов не поддаются микробиологическому культивированию, то есть не могут быть выделены в чистой культуре на искусственных питательных средах и идентифицированы. Поэтому основными методами изучения микробиоты явились некультуральные методы, в частности метагеномика, а также секвенирование микробиома.

Под термином «микробиом» понимают весь

набор микроорганизмов, включая бактерии, вирусы, грибы и археи, которые колонизируют человеческий организм, образуя экологическую систему, критически важную для здоровья человека [1]. Микробное сообщество (микробиом) организма человека было признано фундаментальным фактором, определяющим его физиологию и патологию. Триллионы бактерий, обитающих в желудочно-кишечном тракте людей, значительно расширяя возможности генома хозяина. Это означает, что с помощью микроорганизмов человек способен выполнять функции, которые не кодируются собственным геномом, например, защита от инвазивных патогенов, синтез ключевых молекул для развития собственных клеток и тканей, взаимодействие с системой иммунитета и участие в гемопоэзе [2]. В последние годы активно исследуется роль микробиоты при гематоло-

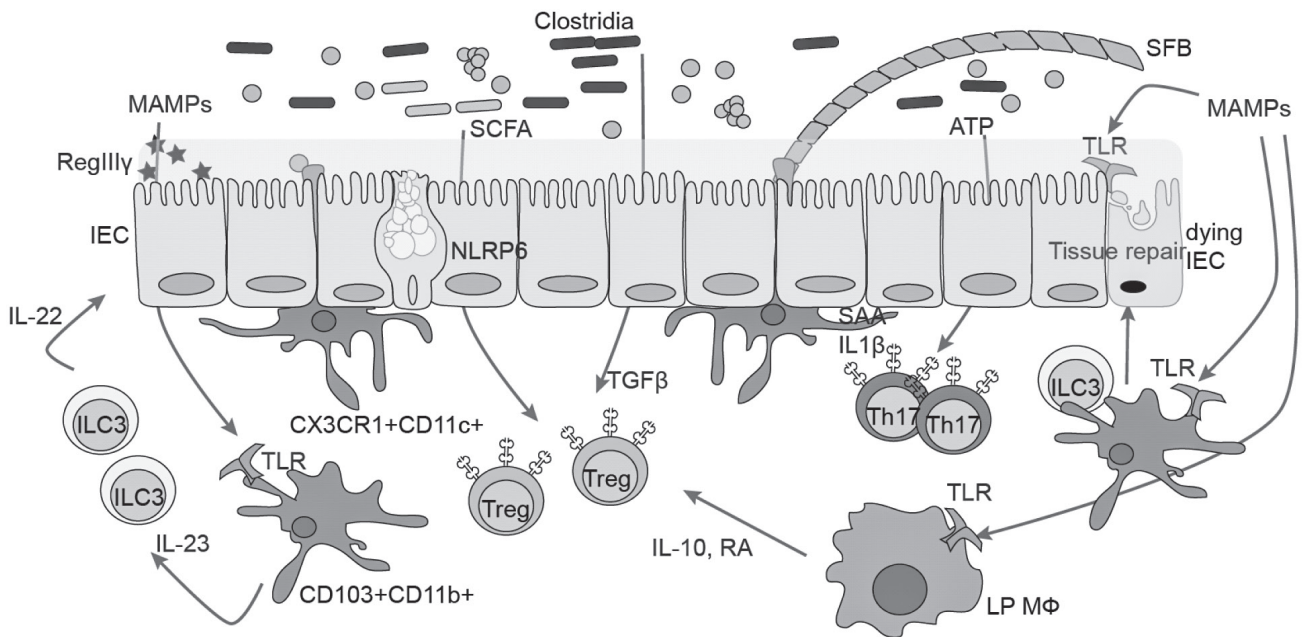


Рис 1. Микробиота в роли регулятора иммунной системы [12].

Обозначения: SCFA – короткоцепочечные жирные кислоты, TLR – толл-подобные рецепторы, Treg – регуляторные Т-лимфоциты, RegIIIγ – антибактериальный лектин, MAMPs – микроассоциированные молекулярные паттерны, IL – интерлейкины, tissue repair – тканевое восстановление в кишечнике, RA – ретиноевая кислота, IEC(dying) – клетка кишечного эпителия (погибшая) SFB – иммуностимулирующая сегментированная филаментная бактерия, ATF – аденозинтрифосфат, ILC3 – лимфоидная клетка врожденного иммунитета, Th17 – Т-хелперы 17-го типа, SAA – сывороточный амилоид А, TGF-β – трансформирующий ростовой фактор β, CD – кластер дифференцировки, NLRP – Nod подобные рецепторы

гических заболеваниях, в частности при множественной миеломе [3, 4, 5, 6].

**Микробиом и гемопоэз**

Характер питания оказывает большое влияние на состав, разнообразие и плотность кишечной микробиоты. Устоявшиеся пищевые привычки человека ведут к определённым сдвигам в его микробиоме, в частности, повышенное потребление животных белков и жиров стимулирует рост представителей рода Bacteroides, а повышенное потребление растительных углеводов увеличивает численность рода Prevotella. Показано, что недостаток растительной клетчатки в рационе питания у мышей, колонизированных человеческой микробиотой, приводит к стойкому уменьшению микробного разнообразия, которая не возвращается в норму даже при нормализации диеты [7].

Растительные волокна и метаболиты, продуцируемые Bacteroides thetaiotaomicron, способствуют дифференциации бокаловидных клеток кишечника и экспрессии генов, ответственных за синтез муцина. С другой стороны, Faecalibacterium prausnitzii потребитель ацетата и продуцент бутирата, снижает стимулирующий эффект ацетата на слизиобразование и предотвращает перепроизводство слизи, тем самым сохраняя гомеостаз кишечного эпителия [8].

Обеспечение возможности проживания большого количества видов симбионтных бактерий на слизистых рассматривается как отдельная и независимая функция иммунной системы, направленная не на уничтожение, а на создание и постоянное поддержание иммунологической толерантности к антигенам нормальной микробиоты, сохранение и передачу полезных бактерий своему потомству.

Несмотря на строгий иммунный контроль, микробиота кишечника успешно сохраняет за собой право на данную территорию, в том числе регулируя функции подлежащей ткани кишечника. С другой стороны, непосредственная близость популяции бактерий к слизистым и наружным покровам человека создает потенциальный риск инвазии, поэтому иммунная система наиболее тщательно контролирует бактерии, колонизирующие просвет кишечника.

Показано, что антибиотикотерапия осложняет течение экспериментального колита у мышей за счет снижения количества микробных лигандов, ассоциированных с толл-подобными рецепторами (TLR), что обеспечивает в норме экспрессию медиаторов тканевого гомеостаза и восстановления поврежденных тканей [9].

Маргарет МакФалл-Нгай американская исследова-

довательница, внесшая фундаментальный вклад в иммунологию симбиотических отношений, выдвинула концепцию, согласно которой движущей силой формирования адаптивного иммунитета в эволюции является не борьба с патогенами, а установление взаимоотношений с симбионтными микроорганизмами, и предложила заменить основное понятие микробного распознавания – патогенассоциированные молекулярные паттерны (PAMPs), введенное Чарльзом Дженоуэем [10] более широким термином – микробоассоциированные молекулярные паттерны (MAMPs) для обозначения взаимодействия и с патогенами, и с симбионтными бактериями [11]. Для распознавания растворимых MAMPs, клетки кишечника экспрессируют паттерн-распознающие рецепторы TLR (толл-подобные рецепторы) и NLRP (Nod-подобные рецепторы).

Основные системы иммунитета полагаются на сигналы MAMPs для правильной работы, в частности, калибровки уровня ответа и поддержания напряженности иммунитета, как в отношении симбиотических организмов, так и патогенов (рис.1).

Многое из того, что в настоящее время известно о связи между микробиотой и кроветворением, получено в исследованиях на лабораторных мышах. Так, у безмикробных (GF) мышей, содержащихся в стерильных условиях, имеются хорошо известные нарушения клеток костного мозга [13, 14, 15, 16, 17] – уменьшена популяция гемопоэтических стволовых и клеток-предшественников (HSPC), аномальное количество мезенхимальных клеток и нарушены функции Т-клеток, по сравнению с SPF мышами (контроль) [7, 9, 10]. Эти эффекты не зависели от продолжительности введения антибиотиков, их адсорбции и типа используемого антибиотика [18]. Важно отметить, что биологически значимые концентрации антибиотиков не токсичны для HSPC в условиях культивирования *in vitro*, что свидетельствует против прямого действия антибиотиков на гемопоэз [19].

Дисбиоз или, точнее, дисбаланс микробиомы кишечника связан также с супрессией гемопоэза у человека. Важно подчеркнуть, что, под термином дисбиоз подразумевается именно дисбаланс микробиоты кишечника, а не присутствие специфических микробных патогенов, которые конечно могут вызвать определенные гематологические нарушения [2]. Речь идет о дисбалансе кишечных бактерий – комменсалов и характеризуется воспалительными заболеваниями кишечника (ВЗК), включая уменьшение бактериального разнообразия, увеличение количества бактериофагов и повышение титра условно патогенных микробов [20, 21]. Интересно отметить, что воспалительные заболевания кишечника оказались независимо связаны с немедикаментозной апластической

анемией [22, 23]. Нарушения метаболизма также имеют общую связь с дисбалансом микробиоты и гематологическими заболеваниями. Например, ожирение связано как с дисбиозом, так и с гематологическими нарушениями [24, 25]. Недоедание также связано с изменениями микробных сообществ кишечника [26, 27], а также с серьезными гематологическими нарушениями [28, 29].

Более прямая связь между микробным дисбиозом и изменениями гемопоэза наблюдается у пациентов, получающих антибиотики. Лечение антибиотиками вызывает дисбиоз кишечника. Устранение определенных классов бактерий связано с рядом гематологических аномалий. О развитии цитопении, включая нейтропению, анемию, тромбоцитопению при антибиотикотерапии сообщалось в ряде исследований. Например, ретроспективный анализ показал, что у 5-15% пациентов развилась нейтропения, определяемая как <1000 нейтрофилов на мм<sup>3</sup> через 10 или более дней после лечения лактамными антибиотиками [30]. Из общего числа пациентов, у которых развилась нейтропения, у 94% восстановилось число нейтрофилов после прекращения лечения антибиотиками. Эти исследования указывают, что нарушения микробиома кишечника значительно влияет на гемопоэз.

Выделенный из микробиоты липополисахарид (ЛПС) поддерживает экспрессию базального уровня RegIII-γ (бактерицидный лектин С-типа) в эпителиальных клетках кишечника и клетках Панета. К примеру, RegIIIγ не обнаружен у стерильных (безмикробных) лабораторных мышей [31], и даже кратковременная антибиотикотерапия ухудшает его экспрессию у нестерильных мышей, что делает их восприимчивыми к инфекции, вызванной ванкомицин-резистентными энтерококками (VRE), при этом данный дефект является обратимым при пероральном введении ЛПС [32]. Подобным образом флагеллин бактерий кишечника способствует поддержанию экспрессии RegIIIγ в клетках человека. Именно флагеллин, посредством воздействия на рецепторы TLR5 дендритных клеток слизистой оболочки кишечника, стимулирует выделение ИЛ-22 и последующую экспрессию RegIIIγ в эпителиальных клетках кишечника [33, 34]. Гранулоциты также контролируются сигналами бактерий-комменсалов, чьи медиаторы имеют эффект в том числе и на клетки костного мозга человека. В эксперименте NOD1-опосредованное воздействие на мезодиаминопимелевую кислоту (мезо-ДАПК), как часть пептидогликана бактерий, способствовало усилению нейтрофильной реакции на патогены, а именно *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus pneumoniae* [35]. У изначально стерильных мышей мезо-ДАПК появлялась в крови и костном мозге в течение трех суток после колонизации

*E. coli* в эксперименте, тем самым доказывая, что бактериальные лиганды из просвета кишечника характеризуются системным распределением и, следовательно, приводят к системным эффектам [35]. Кроме того, перинатальное введение антибиотиков в эксперименте отрицательно влияло на количество и функции нейтрофилов у мышей, ухудшая продукцию гранулоцитарного колоние-стимулирующего фактора (Г-КСФ) и ИЛ-17, а также повышая риск сепсиса, вызванного *E. coli* или *K. pneumoniae* [36]. Подобным образом, антибактериальная терапия приводила к нарушениям в базофильном ростке костного мозга и крови у мышей, реализуя отрицательный эффект посредством цепи Th2-ИЛ-4-IgE, что приводило к осложненным аллергическим синдромам [37]. Функция антиген-презентирующих клеток (АПК) также зависит от бактерий микробиоты. К примеру, показано, что миграция дендритных клеток и продукция ИЛ-1 $\beta$ /ИЛ-18 нарушены у пролеченных антибиотиками мышей на фоне инфицирования их вирусом гриппа [38]. Логично, что в данном эксперименте уровни иммуноглобулинов, количество Т-клеток и продукция интерферона- $\gamma$  были также снижены, что привело к увеличению титров вируса. Весьма интересно, что введение в кишечник агонистов TLR-рецепторов восстанавливало иммунный ответ в дыхательной системе лабораторных животных в этом исследовании, указывая на то, что микробные сигналы из кишечника способны регулировать и восстанавливать системный иммунный ответ, в том числе опосредованный другими органами и тканями.

Опубликованы данные о том, что антибиотики нарушают иммунный ответ против вируса лимфоцитарного хориоменингита у мышей, снижая экспрессию антивирусных генов в макрофагах легочной ткани, что приводит к дефектам функции CD8<sup>+</sup> Т-клеток, а также снижению продукции интерферона- $\gamma$ /ФНО- $\alpha$  и иммуноглобулинов класса G [39]. В другом исследовании сообщалось, что макрофаги селезенки у стерильных и пролеченных антибиотиками мышей теряли способность к адекватному взаимодействию с НК-клетками из-за недостатка хроматина в промоторной области генов, кодирующих важные цитокины, такие как интерфероны ( $\alpha$ ,  $\beta$ ), ИЛ-6 и ФНО- $\alpha$  [40]. Таким образом, в результате введения антибиотиков лабораторные животные не могли контролировать уровень вируса на фоне экспериментального инфицирования цитомегаловирусом мыши. Функция Т-лимфоцитов так же страдает при нарушении взаимодействия между иммунной системой и микробиотой, как и В-клеточное звено иммунитета. Действительно, было показано, что титры иммуноглобулинов ниже у мышей, получавших антибиотики до момента развития вирусной инфекции [38, 39]. Более того, продемонстрировано,

что наличие ЛПС бактериальной природы необходимо для созревания В1-субпопуляции лимфоцитов в селезенке и для поддержания базального уровня циркулирующих иммуноглобулинов класса М, которые оказывают защитную роль в экспериментальных моделях сепсиса у мышей [41].

### **Микробиом человека и множественная миелома**

Представленные выше материалы демонстрируют выраженное влияние микробиоты кишечника на гемопоэз и на иммунный ответ организма. В этой связи важным представляется изучение участия микробиома в патогенезе гематологических заболеваний и возможности использования этих знаний для повышения эффективности их терапии.

В последние годы появился ряд исследований по изучению роли микробиома при множественной миеломе (ММ), частота которой составляет 10-13% всех гематологических опухолей [42].

Микробиом кишечника находится под постоянным контролем иммунной системы и, следовательно, изменения в этой экосистеме может привести к местным и/или системным воспалениям. Местная иммунная стимуляция возникает в lamina propria и в лимфатической системе. Активация системного иммунитета происходит несколькими путями, которые еще недостаточно изучены. Растущее количество фактов указывают на то, что местная иммунная активность микробиома кишечника может воздействовать на отдаленные органы, в частности, на клетки костного мозга (КМ) и его микроокружение [5]. Микроокружение КМ включает как клеточные, так и внеклеточные компоненты и регулирует пролиферацию гемопоэтических стволовых клеток (ГСК). Специализированные клетки микроокружения влияют друг на друга как посредством клеточных контактов, так и растворимых метаболитов, и вся система находится в динамическом равновесии [43].

Несмотря на значительные успехи в лечении, ММ остается неизлечимой. Заболевание обычно возникает из предопухолевого состояния, называемого моноклональной гаммапатией неопределенного значения (MGUS). Клон миеломы эволюционирует от MGUS через тлеющую миелому к миеломе симптоматической.

Исследователи из университета Осло выявили, что плазматические клетки, особенно те, у которых отсутствует экспрессия CD19 и CD45, потенциально могут жить десятилетиями в кишечнике, в тесном контакте с микробиотой [44].

Характер микробиоты кишечника влияет на степень антигенной стимуляции этих клеток и может играть определенную роль в их мутациях и клональной эволюции. Состав микробиоты и ее метаболиты также влияют на микроокружение

КМ [4].

Ahmed и соавт. отмечают, что существует несколько путей воздействия микробиоты на окружение КМ [5]. Один из них связан с синтезом биоактивных метаболитов, таких как короткоцепочечные жирные кислоты (SCFA). SCFA могут подавлять ядерный фактор легкой цепи каппа, усиливающий активность В-клеток (NF-κB) и провоспалительных цитокинов, таких как ИЛ-6 и фактор некроза опухоли (TNF-альфа). И наоборот, они могут повышать уровень ИЛ-10, Th17 и Th1.

В другом исследовании показало, что у пациентов с ММ по сравнению с контролем уровень SFCA-продуцирующих бактерий понижен, а азот-продуцирующих бактерий увеличен [45]. Имеются исследования, указывающие на то, что кишечная микробиота влияет на результаты лечения пациентов с ММ [46]. Так, в работе Calcinotto A. и соавт. [46] установлено, что пациенты без МОБ (минимальная остаточная болезнь) после индукционной терапии имели тенденцию к более высокому уровню *Eubacterium hallii* по сравнению с больными, имеющими МОБ. В другом исследовании [47] было показано, что пациенты, у которых наблюдался более высокий уровень *Bacteroides* в образцах кала, на 7-й день после ауто-ТГСК имели менее выраженную диарею.

Имеются данные о том, что микробиота может влиять на эффективность лечения ММ. Так, Huang

Е.У. и соавт. установили, что лечение ММ дексаметазоном связано со снижением продукции ИЛ-17 [48]. Поскольку продукция ИЛ-17 зависит и от кишечной флоры, изменения в микробиоте, вызванные лечением дексаметазоном, могут влиять на активность этого препарата при лечении ММ.

Таким образом приведенные исследования указывают на участие микробиома в патогенезе и клиническом течении ММ. Однако значение этих взаимосвязей требует дальнейшего всестороннего исследования. Можно надеяться, что в будущем мы сможем получить более ясное представление об роли микробиома при ММ.

#### **Конфликты интересов**

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

#### **Источник финансирования**

Исследование не имело источника финансирования

#### **Вклад авторов**

Концепция и дизайн: все авторы  
Сбор и обработка данных: все авторы  
Представление материалов исследования: все авторы  
Анализ и интерпретация: все авторы  
Подготовка рукописи: все авторы  
Окончательное одобрение рукописи: Чеботкевич В.Н., Бессмельцев С.С.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Belkaid, Y., Harrison, O.J. Homeostatic immunity and the microbiota // *Immunity*. – 2017. – Vol. 46, № 4. – P. 562-576.
2. Yan, H., Baldridge, M.T., King, K.Y. Hematopoiesis and the bacterial microbiome // *Blood*. – 2018. – Vol. 132, № 6. – P. 559-564.
3. Manzo, V.E., Bhatt, A.S. The human microbiome in hematopoiesis and hematologic disorders // *Blood*. – 2015. – Vol. 126, № 3. – P. 311-318.
4. Alkharabsheh, O. et al. The human microbiota in multiple myeloma and proteasome inhibitors // *Acta Haematol.* – 2020. – Vol. 143. – P. 118-123.
5. Ahmed, N. et al. Influence of gut microbiome on multiple myeloma: friend or foe? // *J. Immunother Cancer*. – 2020. – Vol. 8:e000576. doi:10.1136/jitc-2020-000576.
6. Чеботкевич, В.Н., Кулешова, А.В., Киселева, Е.Е. и др. Этиопатогенетические особенности инфекций у больных гемобластомами при трансплантации гемопоэтических стволовых клеток // *Вестник Новгородского Государственного Университета*. – 2020. – Т. 3, № 119. – С. 62-66.
7. Sonnenburg, E.D. et al. Diet-induced extinctions in the gut microbiota compound over generations // *Nature*. – 2016. – Vol. 529, № 7585. – P. 212-215.
8. Wrzosek, L. et al. *Bacteroides thetaiotaomicron* and *Faecalibacterium prausnitzii* influence the production of mucus glycans and the development of goblet cells in the colonic epithelium of a gnotobiotic model rodent // *BMC biology*. – 2013. – Vol. 11, – P. 61. 98.
9. Rakoff-Nahoum, S. et al. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis // *Cell*. – 2004. – Vol. 118, № 2. – P. 229.
10. Medzhitov, R., Janeway, C.A. Decoding the patterns of self and nonself by innate immune system // *Science*. – 2002. – Vol. 296. – P. 298-300. doi:10.1126/science.1068881
11. Koropatnick, T.A. et al. Microbial factor-mediated development in a host-bacterial mutualism // *Science*. – 2004. – Vol. 306. – P. 1186-1188.
12. Becattini, S. Taur, Y., Pamer, E.G. Antibiotic-Induced Changes in the Intestinal Microbiota and Disease // *Trends in Molecular Medicine*. – 2016. – Vol. 22, № 6. – P. 458-478.
13. Balmer, M.L. et al. Microbiota-derived compounds drive steady-state granulopoiesis via MyD88/TICAM signaling // *J Immunol*. – 2014. – Vol. 193, № 10. – P. 5273-5283.
14. Khosravi, A. et al. Gut microbiota promote hematopoiesis to control bacterial infection // *Cell Host Microbe*. – 2014. – Vol. 15, № 3. – P. 374-381.
15. Iwamura, C. et al. Sensing of the microbiota by NOD1 in mesenchymal stromal cells regulates murine hematopoiesis // *Blood*. – 2017. – Vol. 129, № 2. – P. 171-176.
16. Inagaki, H. et al. Increased susceptibility to primary infection with *Listeria monocytogenes* in germfree mice may be due to lack of accumulation of L-selectin+ CD44+ T cells in sites of inflammation // *Infect Immun*. – 1996. – Vol. 64, № 8. – P. 3280-3287.
17. Tada, T. et al. Level of myelopoiesis in the bone marrow is influenced by intestinal flora // *Cell Immunol*. – 1996. – Vol. 173, № 1. – P. 155-161.
18. Zhang, D. et al. Neutrophil ageing is regulated by the microbiome // *Nature*. – 2015. – Vol. 525, № 7570. – P. 528-532.



19. Josefsson, K.S. et al. Antibiotics impair murine hematopoiesis by depleting the intestinal microbiota // *Blood*. – 2017. – Vol. 129, № 6. – P. 729-739.
20. Kostic, A.D., Xavier, R.J., Gevers, D. The microbiome in inflammatory bowel disease: current status and the future ahead // *Gastroenterology*. – 2014. – Vol. 146, № 6. – P. 1489-1499.
21. Norman, J.M. et al. Disease-specific alterations in the enteric virome in inflammatory bowel disease // *Cell*. – 2015. – Vol. 160, № 3. – P. 447-460.
22. Kishikawa, H. et al. Ulcerative colitis associated with aplastic anemia // *Dig Dis Sci*. – 2003. – Vol. 48, № 7. – P. 1376-1379.
23. Sharma, B.C. et al. Hypoplastic anemia associated with ulcerative colitis in a child // *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. – 1996. – Vol. 23, № 3. – P. 326-328.
24. Herishanu, Y. et al. Leukocytosis in obese individuals: possible link in patients with unexplained persistent neutrophilia // *Eur J Haematol*. – 2006. – Vol. 76, № 6. – P. 516-520.
25. Bellows, C.F. et al. Influence of BMI on level of circulating progenitor cells // *Obesity (Silver Spring)*. – 2011. – Vol. 19, № 8. – P. 1722-1726.
26. Blanton, L.V. et al. Childhood undernutrition, the gut microbiota, and microbiota-directed therapeutics // *Science*. – 2016. – Vol. 352, № 6293. – P. 1533.
27. Smith, M.I. et al. Gut microbiomes of Malawian twin pairs discordant for kwashiorkor // *Science*. – 2013. – Vol. 339, № 6119. – P. 548-554.
28. el-Nawawy, A. et al. Evaluation of erythropoiesis in protein energy malnutrition // *East Mediterr Health J*. – 2002. – Vol. 8, № 2-3. – P. 281-289.
29. Santos, E.W. et al. Hematological alterations in protein malnutrition // *Nutr Rev*. – 2017. – Vol. 75, № 11. – P. 909-919.
30. Neftel, K.A., Hauser, S.P., Müller, M.R. Inhibition of granulopoiesis in vivo and in vitro by beta-lactam antibiotics // *J Infect Dis*. – 1985. – Vol. 152, № 1. – P. 90-98.
31. Cash, H.L. et al. Symbiotic bacteria direct expression of an intestinal bactericidal lectin // *Science (New York, N.Y.)*. – 2006. – Vol. 313, № 5790. – P. 1126-1130.
32. Brandl, K. et al. Vancomycin-resistant enterococci exploit antibiotic-induced innate immune deficits // *Nature*. – 2008. – Vol. 455, № 7214. – P. 804-807.
33. Kinnebrew, M.A. et al. Interleukin 23 production by intestinal CD103(+)/CD11b(+) dendritic cells in response to bacterial flagellin enhances mucosal innate immune defense // *Immunity*. – 2012. – Vol. 36, № 2. – P. 276-287.
34. Kinnebrew, M.A. et al. Bacterial flagellin stimulates Toll-like receptor 5-dependent defense against vancomycin-resistant *Enterococcus* infection // *The Journal of Infectious Diseases*. – 2010. – Vol. 201, № 4. – P. 534-543.
35. Clarke, T.B. et al. Recognition of peptidoglycan from the microbiota by Nod1 enhances systemic innate immunity // *Nature Medicine*. – 2010. – Vol. 16, № 2. – P. 228-231.
36. Deshmukh, H.S. et al. The microbiota regulates neutrophil homeostasis and host resistance to *Escherichia coli* K1 sepsis in neonatal mice // *Nature Medicine*. – 2014. – Vol. 20, № 5. – P. 524-530.
37. Hill, D.A. et al. Commensal bacteria-derived signals regulate basophil hematopoiesis and allergic inflammation // *Nature Medicine*. – 2012. – Vol. 18, № 4. – P. 538-546.
38. Ichinohe, T. et al. Microbiota regulates immune defense against respiratory tract influenza A virus infection // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2011. – Vol. 108, № 13. – P. 5354-5359.
39. Abt, M.C. et al. Commensal bacteria calibrate the activation threshold of innate antiviral immunity // *Immunity*. – 2012. – Vol. 37, № 1. – P. 158-170.
40. Ganal, S.C. et al. Priming of natural killer cells by nonmucosal mononuclear phagocytes requires instructive signals from commensal microbiota // *Immunity*. – 2012. – Vol. 37, № 1. – P. 171-186.
41. Proietti, M. et al. ATP-gated ionotropic P2X7 receptor controls follicular T helper cell numbers in Peyer's patches to promote host-microbiota mutualism // *Immunity*. – 2014. – Vol. 41, № 5. – P. 789-801.
42. Бессмельцев, С.С., Абдулкадыров, К.М. Множественная миелома: руководство для врачей /М.: МК. – 2016. – 504 с.
43. Семенова, Н.Ю., Артюхина, З.Е., Бессмельцев, С.С. Роль микроокружения костного мозга и сигнальные пути CXCR4/CXCL12 в развитии множественной миеломы // *Вестник гематологии*. – 2021. – Т. XVII, № 1. – С. 36-46.
44. Landsverk, O.J. et al. Antibody-secreting plasma cells persist for decades in human intestine // *J Exp Med*. – 2017. – Vol. 214, № 2. – P. 309-317.
45. Jian X, Zhu Y, Ouyang J, et al. Alterations of gut microbiome accelerate multiple myeloma progression by increasing the relative abundances of nitrogen-recycling bacteria // *Microbiome*. – 2020. – Vol. 8, № 1. – P. 74.
46. Calcinotto A, Brevi A, Chesi M, et al. Microbiota-driven interleukin-17-producing cells and eosinophils synergize to accelerate multiple myeloma progression // *Nat Commun*. – 2018. – Vol. 9, № 1. – P. 4832. doi:10.1038/s41467-018-07305-8
47. El Jurdi N, Filali-Mouhim A, Salem I, et al. Gastrointestinal Microbiome and Mycobiome Changes during Autologous Transplantation for Multiple Myeloma: Results of a Prospective Pilot Study // *Biol Blood Marrow Transplant*. – 2019. – Vol. 25, № 8. – P. 1511-1519.
48. Huang EY, Inoue T, Leone VA, et al. Using corticosteroids to reshape the gut microbiome: implications for inflammatory bowel diseases // *Inflamm Bowel Dis*. – 2015. – Vol. 21, № 5. – P. 963-972.

**Голенков А.К.<sup>1</sup>, Клинушкина Е.Ф.<sup>1</sup>, Катаева Е.В.<sup>1</sup>, Чукурина Ю.Ю.<sup>1</sup>, Митина Т.А.<sup>1</sup>, Трифонова Е.В.<sup>1</sup>, Захаров С.Г.<sup>1</sup>, Высоцкая Л.Л.<sup>1</sup>, Черных Ю.Б.<sup>1</sup>, Белоусов К.А.<sup>1</sup>, Савин А.О.<sup>1</sup>, Марьяна С.А.<sup>3</sup>, Козарко И.Н.<sup>2</sup>, Козарко Б.С.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> ГБУЗ МО "Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского", Москва

<sup>2</sup> Институт химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, Москва

<sup>3</sup> ФГБУ НМИЦ "Гематологии" МЗ РФ, Москва

## **АНАЛИЗ СВОБОДНЫХ ЛЕГКИХ ЦЕПЕЙ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ СЫВОРОТКИ КРОВИ У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ЛИМФОЛЕЙКОЗОМ В ПРОЦЕССЕ ХИМИОИММУНОТЕРАПИИ**

**Golenkov A.K.<sup>1</sup>, Klinushkina E.F.<sup>1</sup>, Kataeva E.V.<sup>1</sup>, Chuksina Yu.Yu.<sup>1</sup>, Mitina T.A.<sup>1</sup>, Trifonova E.V.<sup>1</sup>, Zakharov S.G.<sup>1</sup>, Vysotskaya L.L.<sup>1</sup>, Chernykh Yu.B.<sup>1</sup>, Belousov K.A.<sup>1</sup>, Savin A.O.<sup>1</sup>, Maryina S.A.<sup>3</sup>, Kogarko I.N.<sup>2</sup>, Kogarko B.C.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Vladimirsky Moscow Regional Research Clinical Institute, Moscow

<sup>2</sup> Semenov Institute of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow

<sup>3</sup> FGBU NMRC "Hematology", Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow

## **ANALYSIS OF FREE LIGHT CHAINS OF BLOOD SERUM IMMUNOGLOBULINS IN PATIENTS WITH CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA DURING CHEMOIMMUNOTHERAPY**

**Резюме.** Современная химиоиммуноterapia (ХИТ) хронического лимфолейкоза (ХЛЛ) постоянно совершенствуется, что требует изучения дополнительных методов оценки ее эффективности. Существующий иммунофенотипический метод позволяет определять минимальную остаточную болезнь (МОБ) с точностью <0,01% опухолевых клеток, что обозначается как неизмеряемая остаточная болезнь (НМОБ). Показано, что достижение НМОБ улучшает отдаленные результаты лечения. Идея предпринятой работы заключается в том, что при достижении НМОБ часть опухолевых клеток может остаться *in situ* за счет их адгезивных свойств, в то время как синтез свободных легких цепей (СЛЦ) опухолевыми клетками позволяет определить их в крови.

**Материалы и методы.** В исследование включено 50 больных ХЛЛ, мужчин 31, женщин 19, в возрасте 61 год (30-76). Впервые выявленный ХЛЛ диагностирован у 20, фаза прогрессии или рецидива установлена у 23, оценку состояния полного (ПО) или частичного (ЧО) ответов проводили до и после проведения курсов ХИТ. Оценку стадии болезни и констатацию ответа на терапию проводили в соответствии с существующими рекомендациями. Иммунофенотипирование лимфоцитов крови проводили методом проточной цитофлуориметрии (2-лазерный проточный цитометр "Facs Calibur"-США) с использованием моноклональных антител "Becton Dickinson". Оценку МОБ проводили методом 4-х цветной проточной цитофлуориметрии по международному стандартизованному протоколу (ERIC). Концентрацию СЛЦ сыворотки крови определяли на иммунохимическом анализаторе (Image 800 и Beckman

**Abstract.** Modern chemoimmunotherapy (CIT) of chronic lymphocytic leukemia (CLL) is constantly being improved, which requires the study of methods for assessing its effectiveness. The existing immunophenotypic method allows the determination of minimal residual disease (MRD) with an accuracy of <0.01% of tumor cells, which is referred to as unmeasurable residual disease (IMRD). It has been shown that the achievement of BMD improved treatment results. The idea of the undertaken work is that, upon reaching BMP, some of the tumor cells can remain *in situ* due to their adhesive properties, while the synthesis of free light chains (FLC) by tumor cells makes it possible to detect them in the blood.

**Materials and methods**

**Materials and methods** The study included 50 patients with CLL, 31 men, 19 women, aged 61 years (30-76). Newly diagnosed CLL was diagnosed in 20, the phase of progression or relapse was established in 23, the state of complete (PO) or partial (PR) responses was carried out before and after the courses of CIT. The stage of the disease and the ascertaining of the response to therapy were carried out in accordance with the existing recommendations. Immunophenotyping of blood lymphocytes was performed by flow cytometry (2-laser flow cytometer "Facs Calibur" - USA) using monoclonal antibodies "Becton Dickinson". MRD was assessed by the method of 4-color flow cytometry according to the international standardized protocol (ERIC). Serum FLC concentration was determined using an immunochemical analyzer (Image 800 and Beckman Coulter, USA). Polyclonal antisera to  $\kappa$  and  $\lambda$  FLC (Binding Site, England) were used as reagents. Statistical processing of the results was carried out by

Coulter, США). В качестве реактивов использовали поликлональные антисыворотки к  $\kappa$  и  $\lambda$  СЛЦ (Binding Site, Англия). Статистическую обработку результатов проводили методом дисперсионного анализа.

**Результаты.** Установлено, что у 32 из 50 исследованных больных в сыворотке крови установлен клон СЛЦ (64%). У 18 клоновых изменений СЛЦ (36%) не обнаружено. При исследовании фенотипа клона СЛЦ у 32 больных -тип определен у 26 (81.3%),  $\lambda$ -тип у 6 (18.7%). Проведение ХИТ по программам FCR, BR, ибрутиниб пропорционально снижало концентрацию опухолевой СЛЦ и в меньшей степени СЛЦ физиологических антителопродукторов. В 30% наблюдений при достижении НМОБ концентрация СЛЦ и  $\kappa/\lambda$  отношения имели опухолевый характер.

**Ключевые слова:** хронический лимфолейкоз, свободные легкие цепи, иммунофенотип, химиотерапия.

**Введение.** Проблема химиотерапии (ХИТ) хронического лимфолейкоза (ХЛЛ) получила свое широкое развитие с момента опубликования работы [1], показавшей клиническое преимущество комбинации противоопухолевых препаратов флударабин, циклофосфан, ритуксимаб (FCR) в сравнении с флударабином и циклофосфаном (FC). Дальнейшее совершенствование программ лечения ХЛЛ было связано с синтезом новых противоопухолевых препаратов, действие которых было направлено на ключевые сигнальные пути, обеспечивающие функцию опухолевых клеток.

К ним относятся ингибитор брутонтинкиназы ибрутиниб (ибр.), ингибитор VCL-2 венетоклакс, ингибитор PI3K – иделалисиб и новые генерации моноклональных антител к CD20. Оценивая в целом современный иммунохимиотерапевтический потенциал ХЛЛ, следует отметить его высокую противоопухолевую избирательность. В свою очередь, это требует совершенствования оценочных систем лечения, которые необходимы для сравнительного анализа эффективности новых лекарственных препаратов, а также для установления причинной связи между минимальной остаточной болезнью (МОБ) и отдаленными результатами лечения.

Это положение подтверждается опубликованными работами, показавшими что МОБ является независимым прогностическим фактором выживаемости без прогрессии (ВБП) и общей выживаемости (ОВ) [2]. Высокая воспроизводимость результатов, указывающих на связь МОБ и ОВ и ВБП, была получена при использовании иммунофенотипического анализа с повышенной разрешающей способностью [3]. При чувствительности  $<0,01\%$  опухолевых клеток (неизмеряемая МОБ – НМОБ) эта закономерность сохраняется для стандарт-

the method of analysis of variance.

**Results.** It was found that in 32 out of 50 studied patients, the FLC clone (64%) was established in the blood serum. No FLC changes were found in 18 clonal changes (18%). When studying the phenotype of the FLC clone in 32 patients,  $\kappa$ -type was determined in 26 (81.3%),  $\lambda$ -type in 6 (18.7%). Conducting HIT according to FCR programs. BR, ibrutinib proportionally reduced the concentration of tumor FLC and, to a lesser extent, FLC of physiological antibody producers. In 30% of cases, upon reaching IMOB, the concentration of FLC and the  $\kappa/\lambda$  ratio had a tumor character.

**Keywords:** chronic lymphocytic leukemia, free light chains, immunophenotype, chemoimmunotherapy.

ных и инновационных программ лечения. Более точным местом для установления НМОБ является костный мозг, так как там реже достигается НМОБ, чем в периферической крови [4], что, по-видимому, связано с адгезивностью опухолевых лимфоцитов [5]. Этот факт подтверждает точку зрения о том, что топографическая асимметрия распространения опухолевых лимфоцитов при ХЛЛ, обусловленная адгезивными свойствами, может создавать условия для функционирования остаточной опухоли *in situ* [6]. При этом опухолевые клетки не выходят в циркуляцию, что может искажать результаты НМОБ. В этой связи следует отметить, что СЛЦ не связаны с клеточной адгезией и могут быть определены в циркуляции, независимо от адгезивных свойств опухоли. Важно отметить, что продукция свободных легких цепей (СЛЦ) иммуноглобулинов сыворотки крови доказана у большинства больных ХЛЛ [7, 8]. Поэтому в группе больных СЛЦ(+) ХЛЛ методом определения СЛЦ (Free Light) можно визуализировать остаточную болезнь *in situ* в случаях НМОБ и более точно прогнозировать отдаленные результаты лечения.

**Методы исследования.** Исследовано 50 больных ХЛЛ, мужчин 31, женщин 19, в возрасте 61 год (30-76). Впервые выявленный ХЛЛ диагностирован у 20, фаза прогрессии или рецидива установлена у 23, состояние полной (ПО) или частичной (ЧО) ремиссии было у 7 больных. У 11 больных исследование СЛЦ проводили в динамике до и после проведенных только программ ИХТ FCR, BR (бендамустин и ритуксимаб) или в сочетании с ибрутинибом (BR+ибрутиниб). Диагноз заболевания устанавливали в соответствии с существующими рекомендациями [9, 10]. Стадию болезни устанавливали согласно критериям Rai. Эффективность лечения оценивали по критериям международной

рабочей группы по ХЛЛ (IWCLL) [11]. Иммунофенотипирование лимфоцитов крови проводили методом проточной цитофлуориметрии (2-лазерный проточный цитометр "Facs Calibur", США) с использованием панели моноклональных антител "Vecton Dickinson". Определяли экспрессию CD45; CD19; CD20; CD22; CD79b; CD5; CD23; CD43; CD200; CD25; CD38, а также экспрессию легких цепей  $\kappa$  и  $\lambda$ . Оценку МОБ проводили методом 4-х цветной проточной цитофлуориметрии по международному стандартизованному протоколу для мониторинга МОБ ХЛЛ и в модификации European Research Initiative in CLL (ERIC) [12].

Концентрацию СЛЦ сыворотки крови определяли на иммунохимическом анализаторе Image

800 "Beckman Coulter", США. В качестве реактивов использовали поликлональные антисыворотки к  $\kappa$  и  $\lambda$  СЛЦ (Binding Site, Англия). Всем больным проводили стандартные клинические исследования, принятые в гематологическом стационаре. При статистической обработке результатов использовали метод дисперсионного анализа.

**Результаты.** Данные полученных концентраций СЛЦ анализировали вместе с клиническими данными на момент исследования СЛЦ в связи с результатами проведенной ХИТ. При анализе результатов установлено, что из 50 обследованных больных ХЛЛ СЛЦ клон был установлен у 32 (64%). (таблица 1).

**Таблица 1**

**Подгруппы больных с ХЛЛ в зависимости от наличия клона свободных легких цепей иммуноглобулинов сыворотки крови**

Число больных	СЛЦ клон*				
	есть		%	нет	%
	$\kappa$	$\lambda$			
50	26	6	64	18	36
	32				

\*  $\kappa/\lambda$  отношение 0.6 (0.26-1.65)

У большинства больных (26 из 32) клон СЛЦ был фенотипа  $\kappa$  (81.3%). Опухолевый клон, секретирующий СЛЦ  $\lambda$ -типа был установлен у 6 из 32 больных (18.7%). Это очень важное положение свидетельствует о том, что у большинства больных с ХЛЛ опухолевые клетки секретируют СЛЦ. Это согласуется с ранее опубликованными на-

блюдениями [7, 8].

При анализе полученных результатов у 18 больных где не было установлено клональных изменений концентраций СЛЦ ( $\kappa/\lambda$  отношение в пределах нормы – 0.30-1.59) данные имели разнонаправленный характер.

**Таблица 2**

**Изменение концентраций  $\kappa$  и  $\lambda$  СЛЦ у 18 больных с СЛЦ (-) ХЛЛ**

Число больных	СЛЦ мг/л		
	$\kappa$	$\lambda$	$\kappa/\lambda$
9	↑	↑	0,30-1,59
7	↑	↓	
2	↓	↓	
Нормальные значения	7,3 (3,3-19,4)	12,7 (5,7-26,3)	0,6 (0,26-1,65)

Из данных таблицы 2 видно, что у 9 больных концентрации  $\kappa$  и  $\lambda$  СЛЦ были повышены (поликлональный характер изменений). У 7 больных концентрация цепи  $\kappa$  была повышена, а  $\lambda$ -цепи была снижена. В 2 наблюдениях концентрации  $\kappa$  и  $\lambda$  СЛЦ были снижены. Причем в некоторых наблюдениях  $\kappa/\lambda$  соотношения выходили за пределы нормальных значений, но они не сопровождались повышением концентрации одной из СЛЦ, а нао-

борот сопровождались избирательным снижением концентрации одной из них. По-видимому, это следует расценивать как дисрегуляцию в системе антителопродукторов при ХЛЛ.

Следующим этапом анализа полученных результатов было изучение концентрации СЛЦ у 32 первичных и предлеченных больных ХЛЛ с клональной секрецией СЛЦ.

Концентрация СЛЦ у 32 первичных и предлеченных СЛЦ (+) больных ХЛЛ

Количество больных	Опухолевый клон $\kappa$ -типа		Опухолевый клон $\lambda$ -типа			Предлеченность		
	СЛЦ $\kappa$	СЛЦ $\lambda$	$\kappa/\lambda$	СЛЦ $\kappa$	СЛЦ $\lambda$	$\kappa/\lambda$	$\kappa$	$\lambda$
32 $\kappa$ -26 $\lambda$ -6	75,8 мг/л (16,7-700)	10,1 (мг/л) (5,7-26,3)	7,5	1,59 мг/л (1,12-2,58)	12,4 мг/л (7,5-169)	0,12	14/26 53,8%	4/6 66%
Нормальные значения	$\kappa$ 7,3 мг/л (3,3-19,4)	$\lambda$ 12,7 мг/л (5,7-26,3)		$\kappa/\lambda$ 0,6 мг/л (0,26-1,65)				

Как следует из таблицы 3 среди 32 изученных больных СЛЦ клон фенотипа  $\kappa$  установлен у 26, а  $\lambda$ -фенотипа у 6 больных. Оценивая концентрации СЛЦ у больных с фенотипом  $\kappa$  СЛЦ-клона, следует отметить что концентрация клональной СЛЦ- $\kappa$  у этих больных составляла 75,8 мг/л (16,7-700), что значительно превышало нормальные значения для  $\kappa$ -СЛЦ 7,3 мг/л (3,3-19,4). Концентрация  $\lambda$  СЛЦ, не вовлеченной в опухолевый процесс была несколько ниже нормы и составляла 10,1 мг/л. При этом нормальные значения составляли 12,7 мг/л (5,7-26,3).

Ключевым признаком наличия клона опухолевых клеток, продуцирующих СЛЦ -фенотипа было  $\kappa/\lambda$  отношение, которое носило клональный характер, так как в 12,5 раз превышало аналогичный показатель нормальных значений (7,5 против 0,6). Из 26 больных этой группы у 14 (53,8%) была предлеченность ХИТ, что в целом уменьша-

ло интенсивность продукции СЛЦ опухолевыми клетками. У 6 больных с клональным характером изменений СЛЦ  $\lambda$ -фенотипа,  $\kappa/\lambda$  отношение составляло 0,12 и было в 5 раз меньше нормальных значений аналогичного показателя (0,6). Концентрация опухолевой СЛЦ  $\lambda$ -фенотипа составляла 12,4 мг/л и практически не отличалась от средних значений нормы (12,7-МЕ) с колебаниями концентраций (от 7,5 до 169 мг/л). Предлеченность больных в этой группе составляла 66% (4 из 6). Следует отметить, что в эту группу были включены больные с клональным  $\kappa/\lambda$  отношением <0,26, с повышением концентраций  $\lambda$  СЛЦ у 3.

В качестве подтверждения роли проводимой противоопухолевой ИХТ на продукцию СЛЦ был проведен анализ концентрации опухолевых СЛЦ- $\kappa$  и неопухолевых СЛЦ- $\lambda$  у 11 больных с впервые выявленным ХЛЛ до проведения ИХТ.

Таблица 4

Концентрация опухолевых СЛЦ- $\kappa$  и неопухолевых СЛЦ- $\lambda$  у 11 больных с впервые выявленным ХЛЛ

Число больных	СЛЦ мг/л (Ме*)			% получавших ХИТ
	$\kappa$	$\lambda$	$\kappa/\lambda$	
11	121 (30,3-700)	11,4 (8,38-61)	9,04 (3,15-33,8)	0
Нормальные значения	7,3 (3,3-19,4)	12,7 (5,7-26,3)	0,6 (0,26-1,65)	

\*Ме-медиана

Из таблицы 4 следует, что Ме концентрации опухолевых СЛЦ- $\kappa$  у 11 больных составляла 121 мг/л (30,3-700), что значительно превышало аналогичный показатель в группе больных, где 53,8% проводилась ИХТ (75,8 мг/л). Очевидно, что это различие связано с супрессивным влиянием ХИТ на опухолевые клетки, секретирующие СЛЦ-клон. Эти данные позволяют утвердительно оценивать метод free light assay в качестве дополнительного

оценочного критерия эффективности противоопухолевого лечения ХЛЛ. Следует отметить, что под влиянием ИХТ, применяемой для лечения больных в нашем исследовании не произошло существенного снижения СЛЦ- $\lambda$ , которая не была ассоциирована с опухолевым клоном и по существу отражала состояние нормальных антителопродуцентов. Падение концентрации опухолевой СЛЦ- $\kappa$  в группе больных, получавших ИХТ про-

изошло на 37,4%, а нормальной  $\lambda$ -цепи на 11,5% (таблица 3; 4). Это соотношение может указывать на достаточно высокую степень избирательности противоопухолевого действия применяемых про-

грамм лечения.

Более доказательно эта закономерность продемонстрирована у 15 больных СЛЦ- $\kappa$  ХЛЛ, получавших курсы ХИТ.

**Таблица 5.**

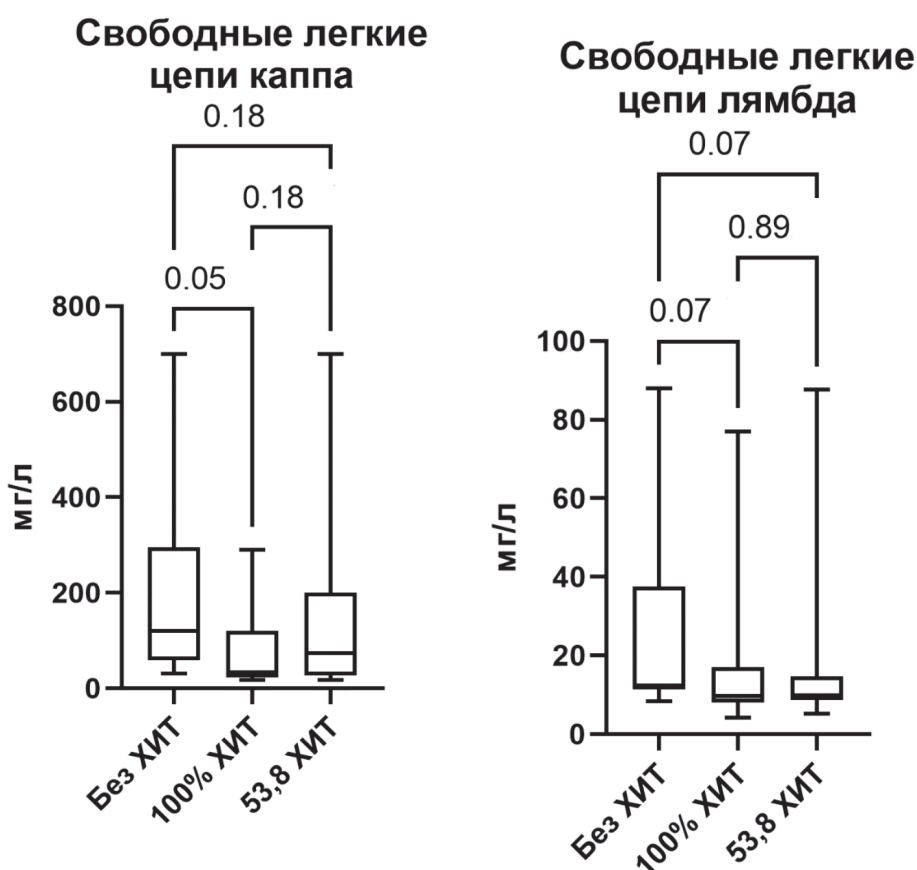
**Концентрация СЛЦ у 15 больных ХЛЛ -фенотипа, получавших курсы ХИТ**

Число больных	СЛЦ мг/л (Ме*)			
	$\kappa$	$\lambda$	$\kappa/\lambda$	% получавших ХИТ
15	30 (16,7-290)	9,01 (5,2-24,1)	3,3 (1,65-23,3)	100
Нормальные значения	7,3 (3,3-19,4)	12,7 (5,7-26,3)	0,6 (0,26-1,65)	

\*Ме-медиана

Как следует из таблицы 5, у этих больных Ме концентрации опухолевой СЛЦ- $\kappa$  составляла 30 мг/л (16,7-290). Концентрация неопухолевой  $\lambda$ -СЛЦ составляла 9,01 мг/л (5,2-24,1). Отношение  $\kappa/\lambda$  составляло 3,3 (1,65-23,3). О высокой избирательности (FCR, BR, ибрутиниб) программ лече-

ния ХЛЛ свидетельствуют (рисунок 1) достоверные снижения концентрации опухолевой СЛЦ- $\kappa$  ( $p=0,05$ ) в зависимости от химиотерапевтической нагрузки и отсутствии достоверных изменений СЛЦ нормальных антителопродукторов.



**Рисунок 1.** Сравнительный анализ концентраций СЛЦ у 26 больных ХЛЛ СЛЦ- $\kappa$  в зависимости от проводимой ИХТ

У 26 больных ХЛЛ с СЛЦ- $\kappa$  клоном опухолевых клеток была изучена кратность изменения

концентрации СЛЦ относительно нормальных их значений.

Кратность изменения концентраций СЛЦ у 26 больных с ХЛЛ СЛЦ -фенотип

Число больных	СЛЦ	
	$\kappa$	$\lambda$
26	16,5 (1,6-95,8)	0,74 (0,40-0,96) у 18 больных 1,65 (1,1-4,8) у 8 больных

Как видно из таблицы 6, в исследуемой смешанной группе больных, где у 53,8% проводили ХИТ, было превышение концентраций опухолевой СЛЦ- $\kappa$  в 16,5 раза. Кратности изменения концентраций неопухолевой  $\lambda$ -СЛЦ носили разнонаправленный характер и были снижены (0,74) у 18 и повышены (1,6) у 8 больных. Этот анализ показывает, что при повышении концентраций опухолевых СЛЦ- $\kappa$  одновременно происходило снижение не вовлечённой в опухолевый процесс  $\lambda$ -СЛЦ, что может свидетельствовать о супрессии нормальных антителопродукторов, связанных с патологией В-лимфопрролиферативного процесса или проводимой ХИТ.

Изучение концентрации СЛЦ опухолевого клона до и после ИХТ было проведено у 11 больных ХЛЛ, которых лечили по программам FCR, BR, BR+V, BR+ибрутиниб. У всех больных исходно диагностированы резистентность или прогрессия заболевания. Интервалы между исследованиями СЛЦ составляли 8 месяцев (ме) (1-10 месяцев). В этой клинической модели было обращено внимание на объективный статус, достигнутый за пери-

од лечения в сравнении с данными СЛЦ-анализа. Достигнуто совпадение результатов по указанным параметрам у 10 из 11 больных. Значения СЛЦ соответствовали прогрессии, ремиссии, резистентности, стабилизации. В одном наблюдении такого совпадения не было достигнуто. При констатации полной ремиссии, подтвержденной МОБ (3,5%), концентрация опухолевой СЛЦ- $\kappa$  снизилась с 148 до 37,6 мг/л (норма 7,3 мг/л),  $\kappa/\lambda$  отношение 4,0-4,57 (норма 0,6). Это очень важное положение свидетельствует о том, что Free Light assay обладает большей разрешительной способностью, чем иммунофенотипическое исследование и визуализирует нодальную и экстранодальную остаточную опухоль.

Дальнейший анализ касался изучения концентрации СЛЦ и  $\kappa/\lambda$  отношений у 12 больных ХЛЛ после завершения FCR, BR, FLUCAM, ибр. программ и поддерживающего лечения ритуксимабом. Одновременно проводили анализы МОБ, клинического статуса и легких цепей на мембране лимфоцитов (таблица 7).

Таблица 7

Сравнительная характеристика показателей МОБ и СЛЦ у 12 больных ХЛЛ после завершения программ ИХТ и поддерживающего лечения ритуксимабом

N исследования	Клиническая характеристика		МОБ (ИФТ) %*	СЛЦ мг/л			ИФТ ЛФ
	Статус	ХТ		$\kappa$	$\lambda$	$\kappa/\lambda^{**}$	
1	Н.О.	RB (4)	2	13,2	8,76	1,5	$\kappa$
2	ПО	FCR (6)+R	0,02	22,1	68,1	0,32	$\lambda$
3	ПО	FCR (6)+R	0,0002	1,12	7,56	0,15	$\kappa$
4	ПО	FCR (6)+R+FLUCAM	0,002	2,9	8,95	0,21	$\kappa$
5	ЧО	FCR (6)+R+RB	0,007	28	17,3	1,62	$\kappa$
6	ПО	FCR (6)+R	1	1,96	7,68	0,26	$\lambda$
7	Н.О.	BR-11	7,6	2,58	15,9	0,16	$\lambda$
8	ЧО	FCR (6)+R	0,02	15,8	19,2	0,82	$\lambda$

9	ЧО	RB (7)	0,02	12,6	7,91	1,59	<b>и</b>
10	ПО	Ибр→RC	0,56	12,5	15,9	0,79	<b>и</b>
11***	в/в Ист.	до леч.	н,д,	1,59	33,4	0,04	<b>λ</b>
12	в/в Ист.	до леч.	н,д,	30,3	8,8	3,4	<b>и</b>

\*НМОБ <0.01%; ПО- полный ответ; ЧО- частичный ответ; Н.О.- нет ответа

\*\* **и/λ**- норма 0.6 (0.26-1.65); \*\*\*в/в-первые выявленный

В исследовании №1 (таблица 7) отсутствие клинического ответа сопровождалось значительным снижением МОБ (2%), но оставалась повышенной концентрация опухолевой СЛЦ-**и** при верхней границе нормы **и/λ** отношения (1,5). В этом наблюдении можно говорить о наступлении МОБ и СЛЦ-ответов при запаздывании нодальной редукции массы опухоли, или остаточной опухоли *in situ* после лечения.

В исследовании №2 (таблица 7) достигнутый полный клинический ответ подтверждался глубоким ИФТ ответом (МОБ – 0,02%), однако оставалась значительно повышенной концентрация опухолевой СЛЦ-**λ**. При этом **и/λ** отношение оставалось в пределах нижней границе нормальных показателей, но ниже средних значений. Однако в связи с высокой концентрацией СЛЦ-**λ**, что совпадает **λ** фенотипом опухолевых В-лимфоцитов, можно предполагать наличие минимального опухолевого клона. Это означает, что СЛЦ метод оценки остаточной болезни при СЛЦ-позитивном ХЛЛ более чувствительный, чем существующие методы. Вероятно, адгезивность опухолевых лимфоцитов удерживает их остаточное количество в депо, и они не могут быть определены в циркуляции, а СЛЦ могут свободно выходить в циркуляцию и определяться в крови.

В исследовании №3 (таблица 7) можно говорить о полном клиническом ответе, подтвержденном НМОБ (<0,01%), супрессией опухолевой СЛЦ-**и** и неопухолевой СЛЦ- **λ** после курсов FCR и поддержки ритуксимабом. При этом клональное соотношение **и/λ** (0,15) **λ**-типа при -типе опухолевых лимфоцитов связано с преимущественной супрессией опухолевых СЛЦ-**и** и преобладанием **λ**-СЛЦ нормальных антителопродуцентов. В данном наблюдении совпадение результатов.

В исследовании №4 (таблица 7) получен полный клинический ответ после FCR+R+FLUCAM, подтвержденный НМОБ с супрессией опухолевых лимфоцитов типа **и** до 0,002%. Соответственно, СЛЦ-**и** была значительно ниже нормальных значений (2,9 мг/л). Очевидно, что в этом наблюдении определяется высокая избирательность противоопухолевого действия программы лечения, содержащей моноклональные антитела против В-лимфоцитов. Следует отметить, что **и/λ** отношение лимфоидной опухоли -типа соответствует **λ**-типу. Это противоречие произошло за счет относительного уве-

личения СЛЦ-**λ** при преимущественной супрессии опухолевой СЛЦ-**и**. В целом здесь можно говорить о полном совпадении клинической динамики, клеточных и гуморальных оценочных критериев.

В исследовании №5 (таблица 7) зафиксирован частичный ответ после проведенной программы лечения FCR+R+RB. Важно отметить, что это сопровождалось достижением НМОБ (0,007%). Это означает, что НМОБ не идентифицирует опухолевые клетки, которые находятся вне циркуляции. В тоже время, анализ СЛЦ показал, что концентрация опухолевой СЛЦ-**и** была значительно повышена, а **и/λ** отношение было больше нормальных средних значений и приближалась к верхней границе нормы. Полученные результаты свидетельствуют о том, что метод Free Light assay более чувствительный, чем определение НМОБ и может оценивать наличие опухолевых клеток *in situ*.

В исследовании №6 (таблица 7) достигнута полная ремиссия после проведения программы FCR и поддерживающего лечения ритуксимабом. Клинический результат соответствовал результату МОБ (1%). Анализ СЛЦ показал супрессию концентраций **и** и опухолевой **λ** СЛЦ, при снижении **и/λ** отношения ниже средних нормальных значений, но в нормальных пределах. В этом наблюдении также можно отметить совпадение клинических результатов с данными МОБ и СЛЦ.

В исследовании №7 (таблица 7) не было зафиксировано клинического ответа после проведения курсов ИХТ по программе BR. Это совпадало с результатами МОБ (7,6%). При анализе результатов исследования концентраций СЛЦ также отмечалась повышенная концентрация опухолевой СЛЦ **λ**, супрессия нормальных антителопродуцентов **и** и снижения **и/λ** отношения по **λ** типу (0,16). В этом исследовании получено подтверждение клинической оценки лечения по результатам изучения МОБ и СЛЦ.

В исследовании №8 (таблица 7) проанализированы клинические результаты после лечения по программе FCR+R. Достигнут частичный ответ, что подтверждается данными МОБ (0,02%). По экспрессии мембранных ЛЦ установлен **λ**-тип опухоли. Анализ концентрации СЛЦ показал верхние границы нормальных концентраций **и** и **λ** СЛЦ при нормальном **и/λ** отношении (0,82). В этом наблюдении клинические и лабораторные критерии (МОБ и СЛЦ) оценки лечения полностью совпали,



хотя они ближе к ПО.

В исследовании №9 (таблица 7) получен частичный ответ после проведения программы BR. При этом достигнута МОБ (0,02%). Анализ концентраций СЛЦ показал увеличение -СЛЦ выше средних значений нормы и снижение  $\lambda$ -цепи,  $\kappa/\lambda$  отношение было на верхних границах нормы. Это может свидетельствовать о существовании остаточной нодальной опухоли -типа и супрессии неопухолевых  $\lambda$  продуцентов. В данном наблюдении СЛЦ метод был более чувствительным, чем НМОБ.

В исследовании №10 (таблица 7) достигнут полный ответ после лечения ибрутинибом. При этом МОБ составляла 0,56%, а концентрация СЛЦ и  $\kappa/\lambda$  отношения были в пределах нормальных значений. В данном наблюдении имеет место совпа-

дение клинических и лабораторных результатов (МОБ, СЛЦ) в оценке эффективности проведенного противоопухолевого лечения. В исследованиях №11 и 12 (таблица 7) концентрация СЛЦ была изучена у впервые выявленных больных ХЛЛ Пст. В обоих случаях отмечены клональные изменения  $\kappa/\lambda$  отношений  $\kappa$  (3,4) и  $\lambda$  (0,04) типов. Эти данные были подтверждены ИФТ опухолевых лимфоцитов  $\kappa$  или  $\lambda$ . По результатам данного исследования следует отметить, что наряду с увеличением концентрации опухолевых СЛЦ установлено снижение СЛЦ, не вовлеченных в опухолевых процесс.

Анализ СЛЦ до и после проведения противорцидивной программы BR+ибрутиниб у 2 больных с СЛЦ- $\kappa$  фенотипом ХЛЛ представлен в таблица 8.

**Таблица 8**

**Эффективность BR + ибрутиниб терапии у 2 больных с прогрессией СЛЦ- $\kappa$  ХЛЛ.**

N исследования	ИХТ	$\kappa$	$\lambda$	$\kappa/\lambda$	Интервал	Лечение*	Статус
	до	33 мг/л	9,51 мг/л	3,47			
1	после	11,7 мг/л	13,9 мг/л	0,84			
	до	15,3 мг/л	9,83 мг/л	1,56			
2	после	7,34 мг/л	10,07 мг/л	0,68			
	до						

\*BR- бендамустин, ритуксимаб, ибрутиниб; \*\*ПО- полный ответ

Как видно из таблицы 8 через 8-10 месяцев лечения концентрация СЛЦ- $\kappa$  снизилась на 64,5% и немного превышала норму в одном наблюдении. В другом наблюдении снижение СЛЦ было на 52% вплоть до нормальных значений. Важно отметить, что концентрация нормальных антителопродуцентов повысилась практически до нормы (на 31,5% и 2,4%). Это свидетельствовало о высокой избирательности BR+ибрутиниб программы, которая снимала супрессивный эффект с нормальных антителопродуцентов, осуществляемый опухолевыми клетками. При этом  $\kappa/\lambda$  отношение оставалось немного повышенным (0,84) в первом и нормализовалось во 2 наблюдении. Сравнивая полученные результаты у двух больных, достигших ПО, можно сказать, что в первом наблюдении определялась остаточная опухоль in situ.

Обобщая результаты, представленные в таблице 7, можно обратить внимание на взаимосвязь между категорией клинического ответа на лечение, характеристикой МОБ (НМОБ), концентрацией СЛЦ,  $\kappa/\lambda$  отношением и мембранными ЛЦ на опухолевых лимфоцитах крови. Установлено, что в трех наблюдениях при констатации полного или частичного ответов на лечение (МОБ от 0,02 до 0,007) были отчетливые признаки наличия СЛЦ опухолевого клона, клетки которого практически не определялись в циркуляции, а продуци-

ровали СЛЦ in situ. По существу, речь идет о визуализации нодального пула опухоли (№2; 5 и 9).

В исследованиях №8 и 10 можно условно говорить о совпадении результатов МОБ (0,02 и 0,56%) и концентрации СЛЦ и  $\kappa/\lambda$  отношения, колебания которых не выходили за пределы нормальных значений. Однако концентрации опухолевых СЛЦ превышали средние значения нормы, а их принадлежность к опухолевому клону подтверждалась идентичным изотипом СЛЦ на мембране опухолевых лимфоцитов.

В исследованиях №3, 4 и 6 концентрации СЛЦ совпадали с категорией клинического ответа и минимальными значениями циркулирующих опухолевых лимфоцитов (МОБ и НМОБ). В этих наблюдениях следует отметить цитостатическую супрессию опухолевых и неопухолевых СЛЦ. Причем в 2 случаях (№3 и 4) это привело к искажению  $\kappa/\lambda$  отношения. Установлен  $\lambda$ -тип клональности (0→15 и 0→21) при  $\kappa$ -типе мембранных СЛЦ.

В исследованиях №1 и 7 не было клинического результата после проведенных ИХТ программ, хотя опухолевые лимфоциты в циркуляции были значительно снижены и составляли от исходных значений 2 и 7,6%, соответственно. Анализ показал, что концентрации опухолевых СЛЦ и  $\kappa/\lambda$  отношения свидетельствовали об опухолевом типе изменений. В этих наблюдениях можно говорить

о совпадении полученных результатов. Рассматривая метод СЛЦ с позиций новых оценочных критериев эффективности ХТ при ХЛЛ, следует отметить, что в нашей исследовательской модели совпадение с клиническим статусом и МОБ (НМОБ) достигнуто в 7 из 10 наблюдений. В трех наблюдениях при НМОБ от 0,02 до 0,007 (%) от исходных значений изменения СЛЦ носили опухолевый характер, что свидетельствовало о наличии остаточной опухоли *in situ*. Следовательно, метод СЛЦ в оценке остаточной болезни после ИХТ ХЛЛ был на 30% чувствительнее, чем иммунофенотипическое определение МОБ.

Выводы. Таким образом, в представленном исследовании приведены результаты анализа СЛЦ иммуноглобулинов сыворотки крови у 50 больных ХЛЛ, проведен анализ концентрации СЛЦ в зависимости от проводимой ХИТ (FCR; R; BR; ибрутиниб). При этом сравнивали показатели  $\kappa$  и  $\lambda$  СЛЦ в группе без лечения с группами, где все получали лечение. Кроме этого анализа была проведена динамическая оценка концентрации СЛЦ до и после завершения курсов ИХТ в сравнении с результатами стандартной клинической оценки. Важным этапом этой работы был сравнительный анализ МОБ, включая НМОБ и концентрации опухолевой СЛЦ после проведенного противоопухолевого лечения. Следует от-

метить, что проведенные исследования можно расценивать как иммунологический мониторинг (МОБ и СЛЦ) эффективности ХИТ. Одним из важных итогов работы следует считать установление частоты встречаемости СЛЦ патологии при ХЛЛ. Было установлено, что моноклональный характер изменений СЛЦ (повышение концентрации одной из СЛЦ и измененное  $\kappa/\lambda$  отношение) был у 32 больных (64%) и без СЛЦ патологии был у 18 больных (36%). На наш взгляд это важное положение, позволяющее использовать СЛЦ в качестве дополнительного иммунологического мониторинга ИХТ ХЛЛ.

#### **Конфликты интересов отсутствует**

Источник финансирования  
Исследование не имело источника финансирования

#### **Вклад авторов**

Концепция и дизайн: *все авторы*  
Сбор и обработка данных: *все авторы*  
Предоставление материалов исследования: *все авторы*  
Анализ и интерпретация: *все авторы*  
Подготовка рукописи: *все авторы*  
Окончательное одобрение рукописи: *все авторы*

### **БИБЛИОГРАФИЯ**

1. Hallek M., Fisher K., Fingerle-Rowson Y. et al. Addition of rituximab to fludarabine and cyclophosphamide in patients with chronic lymphocytic leukaemia: a randomised, open-label, phase 3 trial // *Lancet*. – 2010. – Vol. 376, N2. – P. 1164–1174.
2. Betteher S., Ritgen M., Fischer K. et al. Minimal residual disease quantification is an independent predictor of progression free and overall survival in chronic lymphocytic Leukemia. A multivariate analysis from the randomized GCLLSG CLL 8 trial // *J Clin Oncol*. – 2012. – Vol. 30, N9. – P. 980–988.
3. Rawstron A., Fazi C., Agathangelidis A. et al. A Complementary role of multiparameter flow cytometry and high-throughput sequencing for minimal residual disease in chronic lymphocytic Leukemia: an European Research initiative on CLL study // *Leukemia*. – 2016. – Vol. 30, N4. – P. 929–936.
4. Rowstron A., Cohen D., de Tute R. et al. Bone marrow is more sensitive than peripheral blood for detection of MDR in CLL and provides a more reliable prediction of outcome across different treatments // *Haematologica*. – 2015. – Vol. 100, (Suppl 1).–Abstract S794
5. Голенков А.К., Митина Т.А., Новиков В.В., Тагиров О.Т. и др. Клиническое значение растворимых молекул адгезии (sCD50 – ICAM – 3), апоптоза (sCD95) и sHLA класса – I при лимфолиферативных заболеваниях // *Российский Биотерапевтический журнал*. – 2002. – № 1. – С. 60–64
6. Митина Т.А. Клиническое значение линейного и адгезивного фенотипов опухолевых клеток при хроническом лимфолейкозе // *Дисс. канд. М.* – 2003. 27 с.
7. Катаева Е.В., Голенков А.К., Митина Т.А., Клинушкина Е.Ф. и др. Клинические аспекты определения свободных легких цепей иммуноглобулинов сыворотки крови у больных хроническим лимфолейкозом // *Гематология и трансфузиология*. – 2017. – Т. 62, № 3. – С. 153–157.
8. Martin W., Abraham R., Shanafelt T., Clark R. et al. Serum free light chain – a new biomarker for patients with B-cell non-Hodgkin lymphoma and chronic lymphocytic leukemia // *Translational Research*. – 2007. – Vol. 149, № 4. – P. 231–235.
9. Бессмельцев С.С. Современные методы диагностики и лечения больных хроническим лимфолейкозом. // *Вестник гематологии*. – 2011. – №1. – С. 137–156
10. Савченко В.Г. Алгоритмы диагностики и протоколы лечения заболеваний системы крови. 2018, том 2, с.323–361.
11. Hallek M., Cheson B.D., Catovsky D., Calligaris-Cappio F. et al. International workshop on chronic lymphocytic leukemia. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the international workshop on chronic lymphocytic leukemia updating the National Cancer Institute- working group 1996 guidelines // *Blood*. – 2008. – Vol. 111, № 12. – P. 5446–56
12. Rawstron A.C. International standardized approach for flow cytometric residual disease monitoring in chronic lymphocytic leukemia // *Leukemia*. – 2007. – Vol. 21, № 5. – P. 956–964.

*Савин А.О., Клинушкина Е.Ф., Седов К.В.*

*Московский областной научно-исследовательский клинический институт имени М.Ф.Владимирского*

### **ОСТРЫЙ ПРОМИЕЛОЦИТАРНЫЙ ЛЕЙКОЗ, РАЗВИВШИЙСЯ ПОСЛЕ ИЗЛЕЧЕННОГО ЛИМФОГРАНУЛЕМАТОЗА ПО ПРОГРАММЕ BEACOPP, ОСЛОЖНИВШИЙСЯ ДВС-СИНДРОМОМ С ТРОМБОЗОМ ВЕН НИЖНИХ КОНЕЧНОСТЕЙ И ТРОМБОЭМБОЛИЕЙ ЛЕГОЧНЫХ АРТЕРИЙ**

*Savin A.O., Klinushkina E.F. Sedov K.V.*

*Vladimirsky Moscow Regional Research Clinical Institute, Moscow*

### **ACUTE PROMYELOCYTIC LEUKEMIA, WHICH DEVELOPED AFTER CURED LYMPHOGRANULOMATOSIS ACCORDING TO THE BEACOPP PROGRAM, COMPLICATED BY DISSEMINATED INTRAVASCULAR COAGULATION SYNDROME WITH VENOUS THROMBOSIS OF THE LOWER ENDPOINTS AND THROMBOEMBOLISM OF THE PULMONARY ARTERIES**

**Резюме.** В статье представлены результаты клинического наблюдения больной с острым промиелоцитарным лейкозом, развившимся после излечения лимфогранулематоза по программе BEACOPP-стандартный. Клиническое течение больной характеризовалось выраженными проявлениями ДВС-синдрома с тромбозом вен нижних конечностей и подвздошной вены справа, тромбоэмболией двух ветвей легочных артерий. Избранная тактика ведения данной больной включала программу AIDA, направленную на подавление бластной инфильтрации костного мозга и в связи с этим имело не только противоопухолевый характер, но и сопровождалось антитромбогенным действием. Антикоагулянтная терапия, предпринятая после повышения уровня числа тромбоцитов с заменой инъекционной формы (эноксапарин) на таблетированные формы (апиксабан). Получена клинико-гематологическая ремиссия и значительно уменьшились проявления тромбогенных осложнений.

**Ключевые слова.** Острый промиелоцитарный лейкоз, PML-RARA, третиноин, дифференцировочный синдром, гиперкоагуляция.

**Abstract.** The article presents the results of clinical observation of a patient with acute promyelocytic leukemia (APL), which developed after the cure of lymphogranulomatosis according to the BEACOPP-standard program. The clinical course of the patient was characterized by pronounced manifestations of disseminated intravascular coagulation syndrome with thrombosis of the lower extremities and the iliac vein on the right, thromboembolism of two branches of the pulmonary arteries. The selected management tactics for this patient included the AIDA program aimed at suppressing blast infiltration of the bone marrow and, therefore, had not only an antitumor nature, but was also accompanied by an antithrombotic effect. Anticoagulant therapy undertaken after an increase in platelet count, replacing the injectable form (enoxaparin) with the tablet form (apixaban). Clinical and hematological remission was obtained and the manifestations of thrombotic complications significantly decreased.

**Keywords.** Acute promyelocytic leukemia, PML-RARA, tretinoin, differentiation syndrome, hypercoagulability.

**Введение.** Острый промиелоцитарный лейкоз (ОПЛ) относится к группе острых миелобластных лейкозов (ОМЛ) (по FAB классификации- М3 вариант) и характеризуется тяжелым течением с развитием коагуляционных нарушений за счет продукции опухолевыми клетками тромбогенных факторов, что отличает его от других вариантов ОМЛ [1]. Хорошо известна патогенетическая связь развития ОПЛ и ОМЛ после предшествующей химиолучевой терапии по поводу других онкологических или онкогематологических заболеваний. В связи с этим можно предполагать, что химиолучевая терапия повреждает геном кро-

ветворных клеток, в результате чего развивается отчетливый генетический признак ОПЛ, такой как t(15;17), с образованием онкогена PML-RARA. Достижением современной гематологии является внедрение в широкую клиническую практику таргетного препарата третиноин, который позволяет получить высокий процент полных ремиссий и предотвращает развитие тромбогенных осложнений.

**Клинический случай.** Больная Д., 31 год, 07.04.2021г. переведена из гематологического отделения МЕДСИ с диагнозом острый промиелоцитарный лейкоз в отделение клинической

гематологии и иммунотерапии ГБУЗ МО МОНКИ им. М.Ф.Владимирского.

Жалобы при поступлении на выраженную слабость, одышку в покое, болезненность, отечность в области правой нижней конечности, внутренней поверхности верхней трети бедра справа.

**Из анамнеза:** В декабре 2017 года пациентка отметила увеличение щитовидной железы, обратилась к эндокринологу по месту жительства, рекомендовано УЗИ щитовидной железы, анализ сыворотки крови на тиреодные гормоны. По данным УЗИ от декабря 2017г. диагностирован узловой зоб, ТТГ-1,37; Т4 св. 13,41; антитела к ТПО <3 от 28.12.2017г.

01.02.2018 г. при обращении к эндокринологу КДЦ МОНКИ объективно определялось увеличение щитовидной железы до 2ст. по ВОЗ, диффузно-плотноватой консистенции, с наличием узлов в обеих долях. Дано заключение: Многоузловой зоб? Аутоиммунный тиреоидит? Эутиреоидное состояние. Рекомендована тонкоигольная аспирационная пункционная биопсия под контролем УЗИ, повторная явка к эндокринологу. В гемограмме по месту жительства от 21.06.2018г. гемоглобин 128 г/л, эритроциты  $4,09 \cdot 10^{12}$ /л, тромбоциты  $179 \cdot 10^9$ /л, лейкоциты  $7,5 \cdot 10^9$ /л, СОЭ 25 мм/час. Биохимический анализ крови, общий анализ мочи- без клинически значимых изменений.

С начала июля 2018 года пациентка стала отмечать дальнейшее увеличение щитовидной железы, появились жалобы на чувство нехватки воздуха, хрип при вдохе, осиплость голоса. 02.07.2018 г. выполнено УЗИ щитовидной железы: контуры: нечеткие, неровные. В размерах значительно увеличена. Правая доля 37x35мм, левая доля 35x38 мм, в пределах видимости - спускается за грудину. Перешеек 15 мм. Эхогенность смешанная, структура неоднородная. Вся паренхима диффузно изменена и неоднородна, без четких узловых образований. Лимфатические узлы шеи не увеличены. Заключение: диффузное увеличение щитовидной железы с диффузными изменениями паренхимы. По данным цитологического исследования щитовидной железы от 02.07.2018г.: Заключение: в пунктате обеих долей щитовидной железы цитологическая картина зоба (TBSRTC – Категория "Доброкачественный процесс").

18.07.2018 г. на основании данных дообследования повторно консультирована эндокринологом КДЦ МОНКИ, дано заключение: Диффузное увеличение щитовидной железы. Эутиреоидное состояние. Рекомендована консультация хирурга-эндокринолога.

26.07.2018 г. консультирована хирургом-эндокринологом, учитывая данные объективного осмотра, результаты инструментальных методов обследования, установлен диагноз: Аутоиммун-

ный тиреоидит, гипертрофический вариант (зоб 2ст. по ВОЗ, 4ст. по классификации О.В.Николаева), шейно-загрудинное расположение, с клиническими признаками компрессии трахеи. Рекомендовано: плановое хирургическое лечение в хирургическом отделении МОНКИ.

08.08.2018 г. госпитализирована в отделение хирургической эндокринологии МОНКИ с целью оперативного лечения. Объективно определялось увеличение щитовидной железы до 2ст. по ВОЗ, плотно-эластичной консистенции, подвижная, узловые образования не пальпируются. При обследовании: в гемограмме от 09.08.2018г.: гемоглобин 143,1 г/л, эритроциты  $4,99 \cdot 10^{12}$ /л, тромбоциты  $283 \cdot 10^9$ /л, лейкоциты  $6,1 \cdot 10^9$ /л, п/я 2%, с/я 52%, эозинофилы 11%, базофилы 1%, лимфоциты 30%, моноциты 4%, СОЭ 30 мм/час. Биохимический анализ крови, коагулограмма, общий анализ мочи- без клинически значимых изменений.

20.08.2018 г. проведена субтотальная резекция щитовидной железы, при визуализации макропрепарата: вся ткань щитовидной железы представлена опухолевой тканью белесоватого цвета, каменистой плотности (лимфома? лимфосаркома?), возвратные нервы, пищевод слева, правая яремная вена, правая сонная артерия, трахея инфильтрированы опухолью, ткань отправлена на срочное гистологическое исследование: По данным срочного гистологического исследования от 22.08.2018г.: Заключение: в препаратах гистологического исследования малоклеточная фиброзная ткань с наличием очаговых лимфоидных скоплений с примесью крупных клеток и эозинофилов. Изменения подозрительны в отношении лимфогранулематоза.

24.08.2018 г. пациентка выписана из отделения хирургической эндокринологии, назначена гормон заместительная терапия L-тироксином в дозировке 100 мкг в сутки, даны рекомендации: консультация патоморфологического материала в НМИЦ "Гематологии", консультация гематолога КДЦ МОНКИ для определения тактики дальнейшей терапии по результатам дообследования. По данным консультации патоморфологического материала в НМИЦ "Гематологии" от 24.08.2018г.: Заключение: морфологическая картина соответствует лимфоме Ходжкина, вариант нодулярный склероз II типа, с умеренной эозинофильной инфильтрацией, вращением в ткань щитовидной железы.

30.08.2018 г. пациентка госпитализирована в отделение клинической гематологии и иммунотерапии МОНКИ с диагнозом: Лимфома Ходжкина, нодулярный склероз II тип, с поражением щитовидной железы.

При обследовании: Рентгенография органов грудной клетки от 30.08.2018г.: Тень средостения

в верхних и средних отделах расширена в обе стороны, с четкими полициклическими контурами. На боковой рентгенограмме переднее средостение негетомогенно затемнено. Заключение: рентгенологическая картина образования переднего средостения.

В гемограмме от 31.08.2018г.: гемоглобин 134,8 г/л, эритроциты  $4,78 \cdot 10^{12}$ /л, тромбоциты  $342 \cdot 10^9$ /л, лейкоциты  $7 \cdot 10^9$ /л, п/я 3,5%, с/я 50%, эозинофилы 11%, лимфоциты 30,5%, моноциты 5%, СОЭ 30 мм/час.

Биохимический анализ крови, общий анализ мочи, коагулограмма-без клинически значимых изменений.

РКТ исследование органов грудной клетки, брюшной полости от 03.09.2018 г.: в передне-верхнем средостении, центрально, и больше справа, определяется неправильной формы объемное образование с нечеткими неровными контурами, распространяющееся в среднее и заднее средостение больше справа, а также межсосудистое пространство шеи на уровне нижних отделов, выполняет область щитовидной железы, нормальная ткань последней достоверно не визуализируется. Данное образование окружает крупные сосуды средостения (ВПВ, восходящий отдел и дугу аорты, брахиоцефальные сосуды, правую легочную артерию), а также трахею и оба главных бронха, широко прилежит к перикарду, к правым камерам сердца. Передней поверхностью тесно прилежит к грудины и грудной стенке справа от грудины, с утолщением мягких тканей, без признаков костной деструкции на этом уровне. Верхний полюс образования проекционно располагается на уровне подъязычной кости, нижний - на уровне левого предсердия. В корне правого легкого визуализируются лимфатические узлы, максимальными размерами до 11x11мм. Печень увеличена в размерах (краниокаудальный размер правой доли - до 195 мм, левой до 96 мм). Заключение: объемное образование средостения и нижних отделов шеи справа, внутригрудная лимфаденопатия, вероятнее всего проявление гистологически верифицированной лимфомы Ходжкина. Гепатомегалия.

Верифицирован диагноз: Лимфома Ходжкина IV ст., нодулярный склероз II типа, bulky-disease, с поражением щитовидной железы, лимфоузлов средостения. В сентябре 2018г. инициирован курс полихимиотерапии по стандартному протоколу BEACOPP.

С сентября 2018 г. по октябрь 2019г. в отделении клинической гематологии и иммунотерапии МОНИКИ проведено 8 курсов полихимиотерапии по протоколу BEACOPP, суммарная доза антрациклинов 400 мг. Во время проведения 3-го курса полихимиотерапии диагностирована первая ранняя беременность, 4 недели. Курс полихимиоте-

рапии приостановлен, по заключению консилиума акушеров и гематологов, в связи с тяжелым течением лимфогранулематоза и наличием факторов плохого прогноза, принято решение об искусственном прерывании беременности по медицинским показаниям.

По данным контрольного ПЭТ-КТ от октября 2019 г.: Заключение: в клетчатке переднего средостения зона уплотнения с диффузной умеренной повышенной фиксацией ФДГ. В связи с диффузным распределением остаточной опухоли в ткани средостения, принято решение, вместо проведения локальной лучевой терапии на вовлеченные зоны, пролонгировать курсы BEACOPP без антрациклина, учитывая лимиты по кумулятивной дозе препаратов антрациклинового ряда.

В результате проведения 8 курсов BEACOPP отмечалась положительная динамика по шкале ECOG с 3 до 1, нормализация гемограммы. С октября 2019 г. по апрель 2020 г. проведено 4 курса полихимиотерапии по стандартному протоколу BEACOPP. При контрольном ПЭТ-КТ от апреля 2020 г.: полный метаболический ответ с остаточным уплотнением паренхимы в средостении. Достигнута полная клинико-гематологическая ремиссия с достижением полного метаболического ответа по данным ПЭТ-КТ. Пациентка динамически наблюдалась у гематолога по месту жительства, сохранялась клинико-гематологическая ремиссия. По данным ПЭТ-КТ от августа 2020г., сохранялось остаточное уплотнение паренхимы в средостении.

В начале февраля 2021 г. на фоне 2 беременности сроком 10 недель, отметила появление тянущих болей в области нижних отделов живота.

С 09.02.2021 г. по 22.02.2021 г. находилась на стационарном лечении в гинекологическом отделении ГБ г. Истра с диагнозом: Замершая беременность, срок 10 недель. Для сохранения беременности был назначена гормональная терапия дидрогестероном в дозировке 20 мг, 2 раза в день, в течение 10 дней. Однако, на фоне проводимой гормональной терапии сохранить беременность не удалось и 19.02.2021 г. произведено искусственное прерывание беременности. 22.02.2021 г. пациентка выписана из гинекологического отделения Истринской ГБ. 25.02.2021 г. отметила появление болей в икроножных мышцах левой голени. Также отмечались эпизоды выраженной одышки, спонтанно возникающие и самостоятельно купирующиеся. В начале марта у пациентки появились жалобы на зубную боль, в связи с чем, 05.03.2021г. выполнена экстракция зуба, после чего сохранялась длительная кровоточивость. В течение марта в связи с выраженным болевым синдромом по поводу удаленного зуба длительно принимала нестероидные противовоспалительные препараты в больших количествах. В конце марта ухуд-

шение состояния в виде появления болевого синдрома в области правой голени, который к концу марта распространился на правое бедро. К врачу самостоятельно не обращалась.

В начале апреля 2021 г. отметила появление отека правой нижней конечности, распространяющегося до области паха, затем появилась одышка постоянного характера. Однократно присутствовал кратковременный эпизод гипотонии с коллапсом (АД ниже 70/40 мм.рт.ст), самостоятельно купировавшийся.

04.04.2021 г. доставлена бригадой скорой медицинской помощи в ОРИТ МЕДСИ. Объективно геморрагический синдром отсутствует, температура тела на момент осмотра 36.7С. В гемограмме: гемоглобин 92 г/л, тромбоциты  $26 \cdot 10^9$ /л, лейкоциты  $0,8 \cdot 10^9$ /л, нейтрофилы  $0,17 \cdot 10^9$ /л. По данным КТ ОГК с болюсной ангиопульмонографией от 04.04.2021 г.- Заключение: ТЭЛА нижедолевых легочных артерий обоих легких. По данным дуплексного сканирования нижней полой вены и подвздошных вен, нижних конечностей от 04.04.2021 г.: Заключение: распространенный тромбоз глубоких вен правой нижней конечности. Илеофemorальный тромбоз справа. Тромбоз глубокой вены левой голени. В ОРИТ установлен диагноз: ТЭЛА, тромбоз глубоких вен нижних конечностей, тромбоз глубокой вены левой голени, в связи с этим проводилась антикоагулянтная терапия эноксапарином 0,6 мг 2 раза в день. В стабильном состоянии переведена в отделение гематологии.

При обследовании в гематологическом отделении МЕДСИ: Гемограмма от 04.04.2021 г.- гемоглобин 97 г/л, эритроциты  $2,55 \cdot 10^{12}$ /л, тромбоциты  $26 \cdot 10^9$ /л, лейкоциты  $0,8 \cdot 10^9$ /л, нейтрофилы 21%, лимфоциты 63%, моноциты 16%, эозинофилы 0%, базофилы 0%.

Коагулограмма от 04.04.2021 г.- протромбиновое время 14,6(9-14) секунд, АЧТВ 26,6 (24-40) секунд, фибриноген 0,77(1,8-4) г/л, тромбиновое время 17,7(15-21) секунд, D-димер 19296(0-55) нг/мл.

В миелограмме от 05.04.2021г. выявлялся бластоз 77%, что позволяло диагностировать острый лейкоз.

Объективный статус: Общее состояние тяжелое, тяжесть обусловлена проявлением основного заболевания. ECOG 3. Площадь поверхности тела 1.8 м<sup>2</sup>. Сознание ясное, кожные покровы и видимые слизистые бледноваты. На коже нижних конечностей с обеих сторон экхимозы различной степени давности. При пальпации правой голени определяется локальная болезненность. Отечность голеней с обеих сторон. Температура тела на момент осмотра 36.70 С. При пальпации периферические группы лимфоузлов не увеличены. Дыхание через нос свободное. ЧДД 20 в мину-

ту. Аускультативно дыхание жесткое, хрипов нет. Тоны сердца приглушены. ЧСС 102 в минуту АД 110/70 мм.рт.ст. PS 102 в минуту. Язык влажный, обложен белесоватым налетом. Живот мягкий, при пальпации безболезненный. Перитонеальных симптомов, свободной жидкости в брюшной полости нет. Печень, селезенка достоверно не пальпируются. Физиологические отправления в норме. Очаговой неврологической симптоматики нет.

По данным лабораторных методов обследования:

Гемограмма от 07.04.2021 г.: гемоглобин 73,4 г/л, эритроциты  $2,11 \cdot 10^{12}$ /л, тромбоциты  $16 \cdot 10^9$ /л, лейкоциты  $1,32 \cdot 10^9$ /л, лейкоцитарная формула: бласты 44%, миелоциты 7%, п/я 1%, с/я 4%, лимфоциты 35%, моноцитоподобные элементы 9%, анизоцитоз+, пойкилоцитоз+, СОЭ 170 мм/час.

Коагулограмма от 07.04.2021 г.: АЧТВ 70,1 (25,4-39,9) секунд, протромбиновое время 14,7 (9,4-12,5)секунд, тромбиновое время- нет коагуляции, фибриноген 3,08 (2,8-4,7)г/л. Изменения в коагулограмме связаны с предшествующей терапией антикоагулянтами.

Миелограмма от 07.04.2021 г. (пересмотр препаратов с мазками костномозгового пунктата из грудины от 05.04.2021 г.): клеточность в препаратах от скудной до небольшой. Имеется выраженная бластная метаплазия (бласты 79,4%). Бластные клетки небольшой средней и крупной генерации, с выраженным полиморфизмом ядер (округлые, складчатые, дольчатые, бобовидные), с небольшой и умеренной цитоплазмой с азурофильной зернистостью во многих из них, в части бластов обильной и расположенной как в цитоплазме, так и на ядрах клеток, есть бласты с полиморфной грубой зернистостью; имеются бластные клетки с множеством палочек Ауэра; встречаются единичные клетки, по морфологическим признакам которые вероятнее всего можно отнести к созревающим формам гранулоцитарного ряда, в цитоплазме которых имеются также множественные палочки Ауэра. Гранулоцитарный ряд значительно редуцирован (5,8%), эритрокариоцитарный сужен (7,2%). Эритропоэз нормобластического типа. Мегакариоциты в препаратах не обнаружены; имеются единичные тромбоциты. Учитывая особенности морфологии бластных клеток и данные их цитохимического исследования, изменения в костном мозге соответствуют морфоцитохимической картине острого промиелоцитарного лейкоза.

Цитохимическое исследование бластов костного мозга от 07.04.2021 г.: миелопероксидаза резко положительная в 100% бластов.

Цветовое дуплексное сканирование вен нижних конечностей от 07.04.2021г.: Заключение: ок-

## СЛУЧАЙ ИЗ ПРАКТИКИ

клязирующий тромбоз наружной подвздошной вены, с распространением на дистальный отдел общей подвздошной вены, бедренных, подколенной, суральных вен справа, без признаков флотации верхнего полюса тромба.

Эхо-КГ от 07.04.2021 г.: Заключение: аорта не расширена. Камеры сердца не расширены. Глобальная сократительная способность миокарда ЛЖ удовлетворительная (ФВ 69%). Зон нарушения локальной сократимости миокарда ЛЖ не выявлено. Митральная регургитация 0-1 ст. Трикуспидальная регургитация 1 ст. Расчетное систолическое давление в правом желудочке 30 мм.рт.ст., среднее давление в ЛА 19 мм.рт.ст. (не повышено). ЛА не расширена, скорость кровотока в ветвях не снижена.

Биохимический анализ крови, общий анализ мочи-без клинически значимых изменений.

Верифицирован диагноз: Острый промиелоцитарный лейкоз. Иницирован курс полихимиотерапии по протоколу AIDA- третиноин 80 мг перорально, доксорубин 20 мг внутривенно 2,4,6,8 дни на фоне антибактериальной, гемоконпанентной (трансфузия СЗП №4, эритроцитарной взвеси №3), антиэметической, сопроводительной терапии. Консультирована сердечно-сосудистым хирургом: назначение антикоагулянтной терапии показано при отсутствии противопоказаний со стороны основного заболевания.

Контроль лабораторных анализов в динамике:

Гемограмма от 09.04.2021 г.: гемоглобин 79,6 г/л, эритроциты  $2,38 \cdot 10^{12}/л$ , тромбоциты  $13 \cdot 10^9/л$ , лейкоциты  $2,23 \cdot 10^9/л$ , лейкоцитарная формула: бласты 78%, с/я 3%, лимфоциты 19%, анизоцитоз+, пойкилоцитоз+, СОЭ 100 мм/час.

Гемограмма от 14.04.2021 г.: гемоглобин 70,6 г/л, эритроциты  $2,13 \cdot 10^{12}/л$ , тромбоциты  $43 \cdot 10^9/л$ , лейкоциты  $1,7 \cdot 10^9/л$ , лейкоцитарная формула: бласты 6%, миелоциты 5%, с/я 10%, лимфоциты 78%, анизоцитоз+, пойкилоцитоз+, СОЭ 170 мм/час.

Гемограмма от 20.04.2021 г.: гемоглобин 81,5 г/л, эритроциты  $2,48 \cdot 10^{12}/л$ , тромбоциты  $53 \cdot 10^9/л$ , лейкоциты  $459 \cdot 10^9/л$ , лейкоцитарная формула: бласты 7%, мелоциты 15,5%, метамиелоциты 0,5%, п/я 4,5%, с/я 26%, лимфоциты 35%, моноциты 11,5%, анизоцитоз+, пойкилоцитоз+, СОЭ 150 мм/час.

Гемограмма от 27.04.2021 г.: гемоглобин 96,4 г/л, эритроциты  $2,91 \cdot 10^{12}/л$ , тромбоциты  $90 \cdot 10^9/л$ , лейкоциты  $13,64 \cdot 10^9/л$ , лейкоцитарная формула: миелоциты 1%, п/я 4,5%, с/я 69,5%, лимфоциты 17%, моноциты 7,5%, анизоцитоз+, пойкилоцитоз+, СОЭ 140 мм/час.

Качественное определение химерного онкогена PML-RARA тип bcr 1-2-3- t(15;17) от 15.04.2021 г.: обнаружен химерный онкоген PML-RARA тип bcr 1-2- t(15;17); тип bcr 3- t(15;17) не обнаружен.

12.04.2021 г. повторно консультирована сердечно-сосудистым хирургом, иницирована антикоагулянтная терапия эноксапарином в половинной терапевтической дозировке (0,8 мл 2 раза в день подкожно). 14.04.2021г. отмечалась положительная динамика в виде исчезновения болевого синдрома в области правой голени, отсутствие отечности. С 19.04.2021г.- эскалация дозы до полной терапевтической: 1,2 мл 2 раза в день подкожно.

Контроль уровня D-димера в динамике: 12.04.2021г.- 4371 нг/мл, 14.04.2021г.- 3655 нг/мл, 19.04.2021г.-1764 нг/мл, 26.04.2021г.-885 нг/мл

УЗДС вен нижних конечностей в динамике:

13.04.2021 г.: Заключение: окклюзирующий тромбоз глубоких вен правой нижней конечности, наружной подвздошной вены справа с распространением головки тромба в ОПВ без признаков флотации. В сравнении с исследованием от 07.04- без существенной динамики.

20.04.2021 г.: Заключение: окклюзирующий тромбоз наружной подвздошной вены справа с распространением головки тромба в ОПВ без признаков флотации. В сравнении с предыдущим исследованием отмечается незначительная организация тромботических масс с тенденцией к формированию начальной реканализации.

27.04.2021 г.: Заключение: хорошо выраженная частичная реканализация тромбоза глубоких вен нижних конечностей. Начальная реканализация окклюзирующего тромбоза наружной подвздошной вены справа с распространением головки тромба в ОПВ без признаков флотации. В сравнении с предыдущим исследованием отмечается значительная положительная динамика, организация тромботических масс с формированием начальной реканализации.

В начале курса приема третиноина у пациентки отмечалась кратковременная побочная реакция в виде головной боли.

Контрольная миелограмма от 29.04.2021 г.: клеточность в препаратах скудная. Бласты 0%. Клетки гранулоцитарного ряда и моноциты составляют 94,8%; отмечается их уродливость; часть гранулоцитов с пельгероидностью ядер. Эритрокарициты и мегакарициты в препаратах не обнаружены; имеются единичные свободнолежащие тромбоциты и в отдельных препаратах единичные небольшие скопления тромбоцитов.

29.04.2021 г. пациентка выписана из отделения клинической гематологии и иммунотерапии в относительно удовлетворительном состоянии, отмечается положительная динамика в виде отсутствия одышки, болевого синдрома в правой нижней конечности, уменьшение слабости. Даны рекомендации дальнейшего амбулаторного приема третиноина согласно клиническим реко-

мендациям НМИЦ гематологии, продолжение антикоагулянтной терапии с переходом на новые оральные антикоагулянты.

30.04.2021 г. амбулаторно появилась клиника развития дифференцировочного синдрома в виде фебрильной лихорадки, клиники левостороннего плеврита, перикардита. Назначена пульс-терапия дексаметазоном 40 мг внутривенно в течение 4 дней, дифференцировочный синдром купирован.

**Заключение.** Таким образом, представленный случай убедительно продемонстрировал вторичный характер развития ОПЛ после излеченного лимфогранулематоза по стандартной программе ВЕАСОРР. Следует отметить, что лимфогранулематоз имел тяжелое течение (IV стадия с тотальным поражением щитовидной железы, с развитием компрессии дыхательных путей), что потребовало субтотальной резекции с гистологическим подтверждением диагноза. Особенностью лечения данного больного было проведение 12 курсов ВЕАСОРР, т.к. после стандартных 8 курсов не было получено полной метаболической ремиссии. В этом случае ВЕАСОРР был программой выбора, по сравнению с локальной лучевой терапией на вовлеченную зону [2]. После завершения 12 курсов ВЕАСОРР была достигнута полная метаболическая ремиссия по данным ПЭТ-КТ. Вторичная опухоль (ОПЛ) развилась через 6 месяцев после констатации полной метаболической ремиссии лимфогранулематоза.

Осложняющим фактором явилось наличие патологически протекающей беременности (замерший плод), по поводу чего было сделано искусственное прерывание беременности. В данном наблюдении ОПЛ проявил себя тяжелым гиперкоагуляционным синдромом, связанным с тром-

богенной активностью бластных клеток (77% бластов в костном мозге), наличием беременности и ее прерыванием. Тактика лечения заключалась в применении цитостатической терапии для снижения количества бластных клеток и исключения главной причины нарушений тромбогенных осложнений и тяжелых последствий ее развития, проведении антикоагулянтной терапии после повышения количества тромбоцитов со сменой инъекционных прямых антикоагулянтов на таблетированные формы.

В результате проведенного лечения была получена полная ремиссия после проведения первого курса противоопухолевой терапии по программе AIDA, значительной положительной динамикой тромботического синдрома в виде купирования ТЭЛА, реканализации тромбов и уменьшения концентрации D-димеров с 1926 нг/мл до 885 нг/мл. Развитие дифференцировочного синдрома было купировано назначением дексаметазона в течение 4 дней. В настоящее время больная находится в программе лечения ОПЛ.

#### **Конфликты интересов отсутствует**

Источник финансирования

Исследование не имело источника финансирования

#### **Вклад авторов**

Концепция и дизайн: *все авторы*

Сбор и обработка данных: *все авторы*

Предоставление материалов исследования: *все авторы*

Анализ и интерпретация: *все авторы*

Подготовка рукописи: *все авторы*

Окончательное одобрение рукописи: *все авторы*

### **СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Савченко В.Г. Алгоритмы диагностики и протоколы лечения заболеваний системы крови. Том 1. – М.: Практика, 2018-1008с.
2. Бессмельцев С.С., Абдулкадыров К.М. Современная терапия больных неходжкинскими лимфомами // Вестник гематологии – 2006 – Т.2. №1- с.10-21.



Дудина Г.А.<sup>1</sup>, Мабудзаде Ч.К.<sup>2</sup>, Глуценко Д.Ю.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Московский клинический научный центр им. А.С. Логинова

<sup>2</sup>Кафедра госпитальной терапии с курсом эндокринологии, гематологии и клинической лабораторной диагностики медицинского института РУДН

## ИСТОРИЯ ИЗУЧЕНИЯ КЛАССИФИКАЦИИ И ТЕРАПИИ МИЕЛОДИСПЛАСТИЧЕСКОГО СИНДРОМА (ЛЕКЦИЯ)

*Dudina G.<sup>1</sup>, Mabudzada C.K.<sup>2</sup> Glushchenko D. Yu<sup>1</sup>.*

<sup>1</sup>Loginov Moscow Clinical Scientific center

<sup>2</sup>Department of hospital therapy with endocrinology and hematology courses and clinical laboratory diagnostics RUDN's medical institute

### HISTORY OF THE STUDY CLASSIFICATION AND THERAPY OF MYELOYDYSPLASTIC SYNDROME (LECTURE)

**Резюме.** В лекции представлена история изучения диагностики и терапии миелодиспластического синдрома. Описана хронология сообщений о данном заболевании, включая первое потенциальное описание в литературе, эволюция классификаций, а также терапевтической тактики, включая перспективные современные медикаментозные опции. Актуальность работы обоснована недостатком статей, широко освящающих историю миелодиспластического синдрома на русском языке.

**Ключевые слова:** миелодиспластический синдром, стратификация риска, рефрактерная анемия, гипометилирующая терапия

**Summary.** This lecture represents historical references to the study of the diagnosis and treatment of myelodysplastic syndrome. The chronology of reports of this disease is described, including the first potential description in the literature, the evolution of classifications, as well as therapeutic tactics, including promising modern drug options. The relevance of the work is justified by the lack of articles that broadly sanctify the history of myelodysplastic syndrome in Russian.

**Key words:** myelodysplastic syndrome, risk stratification, refractory anemia, hypomethylation therapy

**Миелодиспластические синдромы (МДС)** – гетерогенная группа клональных гематологических опухолей, объединяемых общим происхождением из стволовой гемопоэтической клетки, которые характеризуются неэффективным кроветворением в результате избыточного апоптоза созревающих гемопоэтических клеток костного мозга. Ключевую роль в возникновении патологического клона клеток при МДС играют эпигенетические изменения.

Большой вклад в понимание патогенеза и объединение вариантов МДС внесла эпигеномная концепция, описывающая роль гиперметилирования ДНК и нарушения ацетилирования гистонов в выключении функции генов онкосупрессоров.

МДС характеризуется гетерогенными клиническими проявлениями с развитием мультилинейной дисплазии, неэффективного гемопоэза и трансформацией в острый лейкоз. Появление названия «миелодиспластический синдром» датируется 1982 годом, когда была представлена первая общепринятая классификация данного заболевания, разработанная Франко-Американо-Британской группой (FAB).

За годы до классификации, утвержденной FAB, было предложено множество различных терминов, описывающих МДС. Такое разнообразие терминологии и отсутствие определенного консенсуса относительно МДС можно объяснить несколькими причинами. Первая причина: отсутствие какой-то единой и мобильной базы данных, позволявшей аккумулировать знания и опыт исследователей, врачей и патологов из разных уголков планеты в единую нозологическую концепцию со своей общепринятой номенклатурой, классификацией, диагностическими критериями, прогнозом и т.д. Вторая причина – отсутствие технических возможностей для изучения и верификации состояний, которые сейчас именуется как миелодиспластические синдромы. Вплоть до 1920-х годов исследование костного мозга не было рутинной процедурой. Так как МДС является в первую очередь диагнозом морфологическим, для его установления необходимо наличие возможности стандартизированной техники забор биоматериала, его изучения и описания. Множество клинических случаев, датируемых началом XX века, некоторые из которых мы обсудим под-

робнее ниже, вполне могли быть случаями МДС, однако в силу отсутствия должных методик исследования, включая заготовку, окрашивание и, собственно, микроскопирование – не верифицировали диагноз окончательно, сейчас мы лишь можем с той или иной вероятностью предполагать миелодиспластический синдром в описанных случаях.

Первым сообщением, с наибольшей вероятностью являющимся МДС, считается клинический случай, описанный von Leube в 1900 году. Von Leube описывает пациента, имеющего следующие клиничко-лабораторные данные: анемия (гемоглобин менее 100 г/л, RBC не более  $2,5 \times 10^{12}$ ) с мегалобластическим типом кроветворения, сопровождающаяся фебрильной лихорадкой. Несмотря на типичные, хоть и не специфичные для МДС признаки, в сообщении имеются данные, противоречащие, или, точнее, заставляющие усомниться в МДС у описанного больного. В первую очередь внимания заслуживает возраст больного – 10 лет. Хоть и развитие МДС у молодых пациентов имеет место быть, все же вероятность этого достаточно низка, а молодой возраст скорее служит контраргументом в гипотезе о наличии у этого пациента МДС. Так же к этой категории показателей относятся практически нормальные значения показателей лейкоцитов, спленомегалия, иктеричность кожных и слизистых покровов больного и наличие данных, свидетельствующих о гемолизе. Не характерным для МДС в том числе является быстрое прогрессирование заболевания: летальный исход наступил через несколько недель от начала симптомов и в течение нескольких дней после госпитализации. В целом данный случай рассматривается как МДС с развитием острого миелоидного лейкоза, приведшего к смерти пациента. Потенциальным сообщением о МДС можно рассматривать случаи «псевдо-апластической анемии», описанные итальянским врачом Luzzatto в 1907 году. С некоторыми допущениями, можно предположить, что по крайней мере часть из описанных пациентов могла иметь МДС. Giovanni di Guglielmo в 1926 году описал ряд пациентов, у которых был диагностирован введенный самим же автором диагноз острой эритремии, позже переименованный D.Dameshek в 1950 годах в синдром di Guglielmo. Несмотря на то, что в череде описанных случаев можно обнаружить различные гематологические состояния, часть из них можно классифицировать как МДС.

Позже, в 1938 году, С. Rhoads и W.Barker описали 100 случаев анемии, названной ими «рефрактерной» в связи с неэффективностью терапии железом и вытяжкой из печени скота, которая была популярным методом антианемического лечения в то время. Данная анемия сопровождалась макроцитозом, лейкопенией, тромбоцитопенией, лихорадкой и тенденцией к развитию некротических

очагов слизистых. Из 100 описанных случаев, в 40 случаях анемия была признана вторичной вследствие различных установленных причин. Остальные 60 кейсов именовались как «первичная рефрактерная анемия». Исследование костного мозга данных пациентов выявило следующую картину: 12 препаратов, свидетельствующих об «активном костном мозге с нормальным созреванием», 27 с «почти тотальной аплазией, 3 со «склерозом» и 18 случаев с гипоцеллюлярным костным мозгом, «плотно инфильтрированным однотипными незрелыми клетками». Сорок пять процентов из пациентов с первичной рефрактерной анемией имели анамнез воздействия миелотоксичных соединений. Учитывая данные картины костного мозга и факт воздействия ксенобиотиков с гематологической токсичностью, можно сделать вывод, что, по крайней мере, некоторая часть из описанных пациентов могла иметь миелодиспластический синдром, причем ассоциированный с предыдущей терапией, если говорить языком современной классификации ВОЗ.

В 1942 году французский гематолог P. Chevallier ввел термин «одо-лейкоз» для описания случаев поражения костного мозга, приводящих в итоге к развитию острого лейкоза. Этимология слова «одо-лейкоз» восходит к греческому слову *ὁδός*, означающему «путь», «дорога». Данный термин был выбран P. Chevallier, чтобы непосредственно подчеркнуть высокую предрасположенность пациентов с данным диагнозом к лейкемизации, отражая как бы промежуточность данного состояния и высокий риск развития острого лейкоза. Позже, в 1949 английский патолог J.L. Hamilton-Paterson использует термин «прелейкемическая анемия» («preleukaemic anemia») для описания анемии, рефрактерной к терапии и ассоциированной с дальнейшей лейкемизацией. О связи анемии с конечным развитием лейкоза в дальнейшем сообщали L. O. Jacobsen (1953, «прелейкемический острый человеческий лейкоз»), а также новозеландские врачи F. W. Gunz и R.F. Hough (1956).

В 1956 году S.F. Björkman, исследователь из Мальмо, описал 4 случая идиопатической сидеробластической анемии. При описании данных пациентов исследователь использует такие фразы, как «предшествующее лейкозу состояние», «рефрактерная анемия», «сидероахрестическая анемия», «панцитопения с гиперпластическим костным мозгом», что укладывается в довольно типичную для МДС картину. Так же Björkman описывает эритроциты из биоптата пациентов как содержащие железо в виде гранул, расположенных в перинуклеарной зоне в виде темно-синего ободка по 40-50 гранул в каждой клетке («the iron is in granular form and is found in the perinuclear zone as a dark blue rim... each cell contains 40-50 grains»). Очевидно, что молодой ученый из Швеции наблюдал

клетки, ныне именуемые кольцевыми сидеробластами, а сама морфологическая картина костного мозга могла соответствовать МДС с кольцевыми сидеробластами. При этом у одного из 4 описанных пациентов в дальнейшем развился острый миелоидный лейкоз.

В 1970 году парижский гематолог Dreyfus обнаружил, что пациенты с анемией, в миелограмме которых имелось большее количество бластов, чаще были подвержены более быстрому развитию острого миелоидного лейкоза, нежели пациенты с меньшим бластозом в костном мозге, и предложил использовать термин «рефрактерные анемии с избытком миелобластов» («les anémies réfractaires avec excès de myeloblasts»). В этом же году Н. Gilbert впервые ввел термин «миелодиспластическая болезнь», используя который акцентировал внимание на диспластических изменениях в костном мозге, тем самым заочно выступая против предложения Dameshek о расширении его классификации миелопролиферативных заболеваний, в том числе за счет включения в нее «прелейкоза» (как именовался тогда МДС). С его точки зрения в приведенной классификации Dameshek клетки обнаруживали цитологическую зрелость, чем принципиально отличались от клеток при МДС.

В 1973 М. Saarni и J. Linman обнаружили лишь 143 опубликованных сообщения о прелейкозе, собрав данные в литературном обзоре. В том же году Fisher W.B., Armentrout S.A., Weisman Jr R., отмечая необлигаторность лейкоемизации всех пациентов с прелейкозом, вслед за Н. Gilbert, так же предложили делать акцент больше на морфологической картине костного мозга и определять данное явление как «миелодисплазия», выделяя тем самым обязательность дисплазии и необязательность дальнейшего развития лейкоза при данном состоянии.

Таким образом, можно отметить, что на протяжении XX века появлялись сообщения о случаях анемии, имеющие характерные для современной классификации МДС особенности. С. Rhoads и W.Barker описали МДС, ассоциированный с предшествующей терапией, S.F. Björkman описал то, что сейчас, в рамках последней классификации ВОЗ, отнесли бы к МДС с кольцевыми сидеробластами, а Dreyfus стал по сути создателем словосочетания, которое в современной классификации звучит почти так же, как впервые употребил его французский гематолог в 1970 году – рефрактерная анемия с избытком бластов. Наблюдалась эволюция клинических данных о миелодисплазии. Изначально описываемое лишь как явление, выражающееся в анемии, в дальнейшем была обнаружена важная ее особенность – рефрактерность к терапии. Последней чертой, дополнившей концепцию миелодисплазии, стало обнаружение высокого риска развития острого миелоидного лей-

коза. Аккумуляция клинических и лабораторных данных на протяжении 80 лет XX века, наконец позволила прийти к первой стройной классификации МДС в 1982 году.

**История классификации МДС.** В 1976 году Франко-Американо-Британская группа, состоящая на тот момент из 7 человек (John M. Bennett из Рочестера, Marie-Thérèse Daniel, Georges Flandrin, Claude S. Sultan из Парижа, Harvey Galnick из Бетесды, David Galton и Daniel Catovsky из Лондона) представила классификацию, в которой выделялось две большие группы «дисмиелопоэтических синдромов»: рефрактерная анемия с избытком бластов (РАИБ) и хронический миело-моноцитарный лейкоз (ХММЛ). Целью данной работы стала необходимость внести ясность в дифференциальную диагностику между описанными диспластическими изменениями костного мозга и острым миелоидным лейкозом. Авторы в работе также привели диагностические критерии, необходимые для установления соответствующей формы дисмиелопоэтического синдрома. Так, для постановки диагноза хронического миело-моноцитарного лейкоза необходима была детекция абсолютного моноцитоза в периферической крови (более 1 тыс. моноцитов на микролитр крови). Для верификации же рефрактерной анемии с избытком бластов требовалось обнаружение 10–29% бластов в гиперцеллюлярном костном мозге вкуче с диспластическими изменениями в миелограмме. Бластоз свыше 30% рассматривался как диагностический критерий острого лейкоза.

Через 6 лет, в 1982 году, эта же группа предложила новую классификацию МДС, применив данный термин, заменив им «дисмиелопоэтические синдромы». В этот раз классификация увеличилась более чем в два раза: были внесены дополнительные три категории помимо описанных в классификации от 1976 года. Список дополнили: рефрактерная анемия (РА), рефрактерная анемия с кольцевыми сидеробластами (РАКС) и рефрактерная анемия с избытком бластов в процессе трансформации (РАИБ-т). Как и в прошлый раз, авторы представили диагностические критерии, позволявшие определить с какой именно формой МДС имеет дело цитолог. Для установления диагноза рефрактерной анемии необходимо наличие менее 5% бластов и менее 15% кольцевых сидеробластов в миелограмме. Рефрактерная анемия с кольцевыми сидеробластами для верификации требовала наличия  $\geq 15\%$  кольцевых сидеробластов и бластоз менее 5% в костном мозге, а для постановки диагноза рефрактерной анемии с избытком бластов в процессе трансформации необходимо было обнаружение бластов от 20 до 29% в костном мозге или же бластоза в периферической крови более 5%. Недостатком этой классификации было отсутствие интегральных факторов,

позволяющих объединить подварианты МДС, за исключением неуклонного прогрессирования болезни с развитием терминального бластоза, что характерно и для всех лейкоэмических процессов.

Описанной классификацией FAB пользовались почти в течение 20 лет, пока в 2001 году Всемирная организация здравоохранения не предложила новую. Стоит отметить, что основой для классификации ВОЗ послужила классификация FAB. Можно даже сказать, что первое является результатом модернизации второго. В отличие от работы 1982 года, были описаны такие категории, как рефрактерная цитопения с мультилинейной дисплазией (РЦМД), рефрактерная цитопения с мультилинейной дисплазией с кольцевыми сидеробластами (РЦМД-КС), миелодиспластический синдром с делецией 5q, миелодиспластический синдром неклассифицируемый. Также были добавлены такие формы, как МДС, ассоциированный с предшествующей терапией алкилирующими агентами и МДС, ассоциированный с предшествующей терапией ингибиторами топоизомеразы. Рефрактерная анемия с избытком бластов была разделена на две группы в зависимости от количества бластов в костном мозге – РАИБ-1 и РАИБ-2. Хронический миело-моноцитарный лейкоз перемещен в другую классификацию, описывающую перекрестные случаи МДС и миелопролиферативных заболеваний. Таким образом, разработанная новая классификация МДС (ВОЗ) в значительной степени освобождена от недостатков FAB классификации. Она представлена в более консолидированном виде за счет удаления из нее РАИБ-Т, ХММЛ и большей детализации, собственно, миелодиспластических проявлений. В новой редакции полностью отсутствовала рефрактерная анемия с избытком бластов в процессе трансформации в связи с уменьшением порога бластоза в костном мозге для постановки диагноза острого миелоидного лейкоза (ОМЛ) с 30%, предложенного FAB, до 20%. Данный шаг объясняется одинаковым прогнозом у пациентов с РАИБ-т и ОМЛ и определяет необходимость начала активной терапии на более

раннем этапе, не дожидаясь увеличения количества бластов в костном мозге до 30%. Соответственно, все пациенты, имевшие диагноз РАИБ-Т, отныне рассматривались как пациенты с ОМЛ.

Особенно важным для прогноза выживаемости пациентов с МДС оказалось добавление и в дальнейшем вынесение в отдельную форму МДС с делецией 5q. Основанием для этого послужило наличие достаточно специфической для данной хромосомной аберрации морфологической картины костного мозга и прогноза, а также хорошего ответа на специфическую терапию леналидомидом. Данное явление своего рода ознаменует смену сугубо морфологической парадигмы рассмотрения МДС на более комплексную, обязательной частью которой теперь становится рассмотрение МДС через призму конкретных цитогенетических изменений, оценку их значимости в клинико-лабораторной картине и прогнозе, а также открывает возможности для будущей специфической терапии.

Примечательным событием в истории МДС стало введение классификации МДС у детей, что стало результатом работы двух международных конференций, отметивших необходимость такой классификации. Все имевшие на тот момент классификации были основаны на изучении миелодиспластического синдрома у взрослых, что объясняется в том числе эпидемиологической характеристикой МДС – данное состояние характерно для людей старшей возрастной группы. По данным Sekeres и др., медиана возраста установки диагноза МДС в США составляет 71 год, а возникновение МДС ранее 50 лет маловероятно (за исключением случаев наличия анамнеза химиотерапии или лучевой терапии). Вероятность же развития МДС у детей от 5 до 15 лет оценивается как 1:1 000 000 в год. В итоге, в 2003 году была предложена классификация МДС у детей, состоящая из 3 категорий: 1) миелодиспластические/миелопролиферативные заболевания 2) миелодисплазия синдрома Дауна 3) миелодиспластический синдром (таблица 1).

**Таблица 1**

**Диагностические категории миелодиспластических и миелопролиферативных заболеваний у детей**

Миелодиспластические/миелопролиферативные заболевания
Ювенильный миеломоноцитарный лейкоз Хронический миеломоноцитарный лейкоз Хронический миелоидный лейкоз, РН-негативный
Синдром Дауна
Транзиторное нарушение миелопоэза Миелодиспластический синдром/острый миелоидный лейкоз
Миелодиспластический синдром
Рефрактерная цитопения Рефрактерная анемия с избытком бластов (5–20% бластов) Рефрактерная анемия в процессе трансформации (20–29%)

В 2008 года в рамках 4-й классификации опухолей гемopoэтической и лимфоидной тканей ВОЗ, была предложена новая редакция классификации МДС. Расширена концепция однолинейной дисплазии, что выразилось во внесении в классификацию рефрактерной нейтропении и рефракторной тромбоцитопении. Помимо этого, подтип «рефрактерная анемия с мультилинейной дисплазией с кольцевыми сидеробластами» в новой редакции отсутствовал в связи с отсутствием какой-либо клинической значимости данной категории.

Наконец, в 2016 году была представлена актуальная на сегодняшний день классификация МДС. Введенные в предыдущей редакции «рефрактерная анемия», «рефрактерная нейтропения» и «рефрактерная тромбоцитопения» в новом варианте были заменены на формулировки «МДС с однолинейной дисплазией» и «МДС с мультилинейной дисплазией». Ключевым изменением

классификации 2016 года стала новая интерпретация тяжести и специфичности отдельных цитопений. Выделение отдельных вариантов цитопений для определения отдельных форм МДС, как было ранее, не имеет принципиального значения, поскольку морфологические признаки дисплазии не коррелирует с тем, в каком ростке кроветворения возникают клинически значимые цитопении. По этой причине термины «Рефрактерная анемия» или «Рефрактерная цитопения» были заменены определением «Миелодиспластический синдром» с соответствующим уточнением, в частности МДС с однолинейной или мультилинейной дисплазией, с кольцевыми сидеробластами, с избытком бластов или делецией длинного плеча хромосомы. При этом рефрактерная анемия детского возраста без изменений перешла из предыдущей классификации. Классификацией МДС ВОЗ от 2016 представлена в таблице 2.

Таблица 2

Классификация МДС согласно ВОЗ, 2016 г.

Подтип	Периферическая кровь	Костный мозг
МДС с однолинейной дисплазией (МДС-ЛД)	Моно- или бицитопения	Дисплазия $\geq 10\%$ клеток, $< 5\%$ бластов
МДС с мультилинейной дисплазией (МДС-МД)	Цитопения(-ии), Моноциты $< 1$ млрд/л	Дисплазия $\geq 10\%$ клеток в $\geq 2$ гемopoэтических ростках, $\leq 15\%$ кольцевых сидеробластов (или $< 5\%$ кольцевых сидеробластов при мутации SF3B1), $< 5\%$ бластов
МДС с кольцевыми сидеробластами (МДС-КС)	Анемия, бласты отсутствуют	$\geq 15\%$ кольцевых сидеробластов (или $< 5\%$ кольцевых сидеробластов при мутации SF3B1)
МДС с избытком бластов -1(МДС-ИБ-1)	Цитопения(-ии), $\leq 2-4\%$ бластов, моноциты $< 1$ млрд/л	Одно- или двухлинейная дисплазия 5-9% бластов, палочки Ауэра отсутствуют
МДС с избытком бластов -2(МДС-ИБ-2)	Цитопения(-ии), 5-19% бластов, моноциты $< 1$ млрд/л	Одно- или двухлинейная дисплазия 10-19% бластов, палочки Ауэра $\pm$
МДС неклассифицируемый (МДС-Н)	Цитопении, $\pm 1\%$ бластов как минимум в двух исследованиях	Однолинейная дисплазия или ее отсутствие, но наличие характерной для МДС цитогенетики, $< 5\%$ бластов
МДС с изолированной делецией длинного плеча 5 хромосомы (МДС-5q-)	Анемия, тромбоцитоз( $\pm$ )	Эритроидная дисплазия, изолированная del(5q), $< 5\%$ бластов, +/-1 добавочная аномалия за исключением -7/del(7q)
Рефрактерная цитопения у детей (предварительный вариант)	Цитопении, $< 2\%$ бластов	Моно-, би- или пандисплазия, $< 5\%$ бластов

Значительной модификации подверглись критерии диагностики миелоидных опухолей, характеризующихся расширением эритроидного ростка ( $> 50\%$  всех клеток костного мозга). В настоящее время при подсчете процентного содержания бластов при всех миелоидных опухолях расчет рекомендуется на общее число всех ядродержащих клеток, без исключения клеток эритроидного ряда как делалось ранее. Это исключает гипердиагностику острого эритроидного лейкоза в ущерб части очевидных случаев МДС

с избытком бластов.

Выявление характерных генетических поломок является важным критерием при постановке диагноза МДС, даже если не выполняются морфологические критерии диагностики. В таких случаях генетическая поломка должна быть обнаружена при стандартном цитогенетическом исследовании, а не при FISH исследовании или секвенировании ДНК. При этом минимальное количество диспластических клеток, необходимых для постановки диагноза МДС и определения

конкретной формы, осталось то же – десять или более процентов.

Еще одной важной особенностью последней классификации МДС является добавление предварительной формы МДС, обозначенной как

рефрактерная цитопения у детей, что позволяет унифицировать имеющую классификацию для всех возрастных групп. В таблице 3 представлена сравнительная характеристика классификаций ВОЗ от 2008 и 2016 гг.

**Таблица 3**

**Соответствие вариантов МДС по классификации ВОЗ 2008 г. вариантам МДС по классификации ВОЗ 2016 г.**

2008 г	2016 г
Рефрактерная цитопения с линейной дисплазией: РА, РТ, РН	МДС с линейной дисплазией
Рефрактерная анемия с КС	МДС с КС и линейной дисплазией
Рефрактерная цитопения с мультилинейной дисплазией	МДС с мультилинейной дисплазией МДС с КС и мультилинейной дисплазией МДС с изолированной делецией 5q МДС неклассифицируемый
Рефрактерная анемия с избытком бластов-1	МДС с избытком бластов-1
Рефрактерная анемия с избытком бластов-2	МДС с избытком бластов-2
МДС с изолированной делецией 5q	МДС с изолированной делецией 5q МДС неклассифицируемый
МДС неклассифицируемый	МДС неклассифицируемый

Все большее место в диагностике, прогнозе и определении терапевтической тактики играют цитогенетические изменения. Данное явление нашло отражение и в последней классификации: мутации в гене фактора сплайсинга SF3B1 несут отныне четкий диагностический потенциал в определении МДС с кольцевыми сидеробластами и МДС с мультилинейной дисплазией. Так, если в классификации от 2008 года для верификации МДС с кольцевыми сидеробластами необходимо было обнаружение в костном мозге  $\geq 15\%$  кольцевых сидеробластов, то согласно последней классификации, наличие кольцевых сидеробластов  $\geq 5\%$  совместно с мутацией в гене SF3B1 так же является диагностическим критерием МДС-КС наравне с критериями, введенными в предыдущей редакции. Аналогичное правило действует и при диагностике МДС с мультилинейной дисплазией: одновременное наличие мутации в указанном гене и количество кольцевых сидеробластов менее 5% является основанием для постановки диагноза. При отсутствии данной мутации критерий остается аналогичным, описанным в 2008 году – наличие кольцевых сидеробластов менее 15% с дисплазией  $\geq 10\%$  клеток в  $\geq 2$  гемопоэтических ростках. На данный момент это единственная мутация, нашедшая место в диагностике и прогнозировании МДС, однако очевидно, что в будущем все большую значимость будут приобретать именно цитогенетические аномалии. К настоящему времени описано большое количество цитогенетических изменений, которые особенно часто встречаются при МДС. К их числу относятся мутации в генах TET2,

DNMT3A, ASXL1, SRSF2, RUNX1, U2AF1, TP53, EZH2 и многие другие. Вполне возможно, что в следующем пересмотре МДС данные цитогенетические находки найдут такое же место, какое уже нашла мутация в SF3B1.

После верификации диагноза МДС для принятия решения о проведении лечения важно точно оценить прогноз. С этой целью в 1997 году Гриндерг и соавт. предложили международную прогностическую систему оценок (IPSS) течения МДС. Данная система оценки учитывает количество бластов костного мозга, оценку кариотипа, количества клинически значимых цитопений и позволяет надежно оценить выживаемость и риск трансформации в ОМЛ (четыре группы риска) у пациентов с впервые выявленным МДС и всеми морфологическими вариантами, за исключением CMML. В IPSS под цитопениями понималось снижение концентрации гемоглобина  $< 1,8 \times 10^9$ /л и тромбоцитов  $< 100 \times 10^9$ /л. Также во внимание принимают следующие цитогенетические категории: (1) хорошую (норма, -Y, del (20q), del 26 (5q)); (3) плохую (аномалии с вовлечением 7 пары хромосом, комплексные поломки из 3 или более аномалий) и (2) промежуточную (все остальные аномалии). Низкая, промежуточная-1 и промежуточная-2 группы по IPSS были еще больше конкретизированы в отношении определения прогноза с использованием гистологических параметров костного мозга, таких как наличие аномального расположения незрелых предшественников (ALIPs) и наличия зависимости от гемотрансфузий. Последние вместе с подтипами ВОЗ и цитогенетическими категориями IPSS были

включены в систему прогностической оценки ВОЗ (WPSS) в 2007. В 2012 г. IPSS была пересмотрена в работе с участием более 7000 пациентов с впервые выявленным МДС. IPSS-R учитывает тяжесть цитопении, долю бластов и пересмотренную цитогенетическую классификацию. Последняя включает пять цитогенетических категорий, которые были определены в анализе, проведенном с 2000 пациентами. Были выделены следующие цитогенетические прогностические группы: (1) очень хорошая (-Y, del(11q); (2) хорошая (норма, del(5q), del(20q), del(12p)); (3) промежуточная (трисомия 8, del(7q)); (4) плохая (моносомия хромосомы 7, inv3, комплексный кариотип с 3 аномалиями) и (5) очень плохая (комплексный кариотип с более, чем 3 аномалиями). Стоит отметить, что пороговые значения числа бластных клеток в костном мозге, используемые в IPSS-R, а именно меньше 2, больше 2-х, но меньше 5 - сложно определить на практике.

Серьезное ограничение применения IPSS, WPSS и IPSS-R в клинической практике заключается в том, что эти шкалы разрабатывались исключительно для пациентов с впервые диагностированным МДС. Только IPSS-R дополнительно включала случаи вторичного МДС и пациентов, получавших болезнь-модифицирующую терапию. Для устранения данного ограничения в 2008 г. группа из MD Anderson Cancer Center разработала очень практичную шкалу MDAS, которую можно применять у пациентов, получавших химиотерапию. Предложенная система учитывает 27 функциональных характеристик, а также возраст пациента, тяжесть цитопений, степень бластоза костного мозга, наличие аномалий 7 пары хромосом или комплексных аномалий, а также потребность в трансфузиях донорских эритроцитов или тромбоцитов. Кроме того, имеется отдельная шкала MDAS для пациентов низкого риска (LR-MDAS) с учетом возраста, уровня гемоглобина, тромбоцитов, числа бластных клеток костного мозга и наличия неблагоприятных цитогенетических аберраций.

**История терапевтического подхода к МДС.** Вплоть до настоящего времени лечение МДС остается актуальной, нерешенной проблемой. Единственным методом полного излечения является аллогенная трансплантация костного мозга. Однако, в силу сложности данной процедуры, наличия часто большого количества противопоказаний и не всегда значимой клинической эффективности данного метода лечения, основной терапией МДС остаются медикаментозные препараты в сочетании с адекватной симптоматической терапией, которая, чаще всего, подразумевает гемотрансфузии. Учитывая развитие, достаточно часто, цитопении тяжелой степени, применение колониестимулирующих факторов является нередко необходимой опцией с целью предотвращения септических состояний на фоне глубокой нейтропении у паци-

ентов с МДС. Первое в литературе упоминание о применении таких агентов приходится на 1987 год, когда был описан опыт использования ГМ-КСФ. Позже, в 1990 году, появляются данные об использовании препаратов эритропоэтина (эпоэтин альфа), как метода возможного влияния на восстановление эритроидного ростка. Применение агонистов тромбопоэтиновых рецепторов при глубокой тромбоцитопении, осложненной геморрагическим синдромом, также часто бывает необходимо по жизненным показаниям.

Таким образом, при лечении МДС часто приходится сталкиваться со следующими клиническими трудностями:

- 1) анемия с зависимостью от гемотрансфузий,
- 2) трансфузионная перегрузка железом (вторичный гемосидероз),
- 3) аллоиммунизация с рефрактерностью к трансфузиям,
- 4) прогрессирование заболевания и/или лейкемическая трансформация.

Проведение цитостатической терапии пациентам с МДС, как правило, сопровождается высокой токсичностью, ранней летальностью и непродолжительным эффектом от проведенного лечения. Выбор оптимальной терапии определяется морфологическим вариантом МДС, степенью риска трансформации в ОМЛ, возрастом и общим состоянием пациента.

Цели терапии и варианты лечения различаются в зависимости от группы риска. Для пациентов с МДС низкого риска цель лечения – уменьшить симптомы, улучшить качество жизни и отложить прогрессирование до МДС высокого уровня риска и ОМЛ. Лечение симптомов начинается после выявления клинически значимой цитопении. Анемия, как правило, является наиболее часто диагностируемым клеточным дефицитом периферической крови среди пациентов с МДС низкого риска.

**Терапия МДС низкого риска.** Анемия встречается более чем у 90% пациентов с МДС и, чаще всего, обнаруживается при верификации диагноза. Заместительная терапия препаратами крови остается основным методом коррекции рефрактерных анемий, при этом становится причиной посттрансфузионной перегрузки железом. Хелаторная терапия (деферазирокс) – один из ключевых элементов сопроводительной терапии пациентов, получивших большое количество трансфузий донорских эритроцитов.

**Трансфузионная перегрузка железом.** Каждая доза перелитой пациенту эритроцитарной массы содержит 200–250 мг железа и механизма выведения его из организма не существует. Кроме того, у пациентов с МДС отмечается склонность к повышению всасывания железа на фоне неэффективного эритропоэза. Вследствие этого в печени, эндокринных органах и сердце со временем скапливается из-

быточное количество железа. Отложения железа в сердце могут предрасполагать к кардиомиопатии, аритмии и внезапной смерти. По результатам многих исследований доказано снижение общей выживаемости пациентов с МДС, в организме которых обнаружен высокий уровень железа. Продолжительность же жизни пациентов с МДС и посттрансфузионным гемосидерозом, которые получали хелаторную терапию, значительно превосходит продолжительность жизни пациентов с МДС, которые такую терапию не получали. Хелаторы железа назначаются пациентам при повышении уровня ферритина выше 1000 нг/мл, либо после переливания более 20 доз эритроцитарной взвеси.

Применительно к МДС низкого риска (очень низкий, низкий и промежуточный риск по IPSS-R) одной из опций лечения рефрактерных анемий является назначение препаратов эритропоэтина (дарбэпоэтин альфа, эпоэтин альфа). Частота ответа на эритропоэтины при МДС составляет около 20%. Предикторами ответа является уровень эндогенного эритропоэтина  $\leq 500$  МЕ/мл и отсутствие высокой гемотрансфузионной зависимости. Из методов лекарственной терапии пациентов с анемией использовался анаболический стероид даназол. В двойном слепом рандомизированном исследовании, где 51 пациент получал даназол в дозе 600 мг/день или плацебо, у 6 из 23 пациентов (26%) в группе даназола достигнут полный ответ на терапию, в то время как в группе плацебо ответов не было. В исследовании клиники Мейо, где оценивалась терапия даназолом в дозе 800 мг/день в течение 3 мес., напротив, получен ответ на даназол лишь в 6% случаев. Иммуносупрессивная терапия (ИСТ) антиtimoцитарным глобулином (АТГ) и циклоспорином А может быть эффективной для пациентов моложе 60 лет, с высоким уровнем эндогенного эритропоэтина ( $>500$  МЕ/мл), гипоклеточной морфологией костного мозга, в случае экспрессии антигена HLA-DR15 или обнаружения клона пароксизмальной ночной гемоглобинурии (ПНГ). Именно в случае гипопластических форм МДС особенно важно рассмотреть проведение ИСТ. Гипоплазия костного мозга имеет место у 10-20% пациентов с МДС (клеточность костного мозга  $<30\%$  у пациентов моложе 70 лет и  $<20\%$  – старше 70 лет). Данный подтип МДС характеризуется значительной дисрегуляцией иммунной системы и похож на апластическую анемию. Вероятность ответа на терапию антиtimoцитарным глобулином (АТГ) и циклоспорином А при наличии клона клеток ПНГ и положительного результата по HLA-DRB1-15, т.е. предикторов благоприятного ответа на иммуносупрессивную терапию, может достигать 50%.

Следующим препаратом, нашедшим свое применение в контексте лечения МДС низкого риска, стал леналидомид. В исследовании, проведенном List в 2005 году, данный препарат показал высокую

эффективность у пациентов с делецией длинного плеча 5 хромосом (del(5q)). Леналидомид является препаратом, одобренным во многих странах, включая США и страны Евросоюза для лечения МДС с изолированной аномалией del5q по критериям ВОЗ. Доказан его механизм действия при МДС посредством ингибирования казеинкиназы (CSK1A1 серин/треонин-киназа 5q32). Гаплонедостаточность CSK1A1 приводит к накоплению бета-катенина и апоптозу. Леналидомид связывается с цереблосомом и убиквитинирует CSK1A1, восстанавливая таким образом кроветворение. В случае МДС с del(5q) применение леналидомида является самой эффективной терапевтической опцией. В исследовании MDS-004 (фаза 3) по оценке эффективности леналидомида было включено 205 трансфузионно-зависимых пациентов (потребность  $\geq 2$  ед. эритроцитарной массы за 8 недель) с МДС низкого риска с del(5q). Независимость от трансфузий была документирована в 56%, 43% и 6% случаев для дозы леналидомида 10 и 5 мг/день и плацебо соответственно ( $p < 0,001$  по сравнению с плацебо). Частота цитогенетических ответов также напрямую зависела от дозы леналидомида: 50%, 25% и 0% ( $p < 0,001$  по сравнению с плацебо). Медиана времени до трансформации (ВДТ) в ОМЛ не была достигнута ни в одной группе, а медиана ОВ не различалась. Негативное прогностическое значение имели высокая исходная потребность в гемотрансфузиях и наличие дополнительных хромосомных аберраций помимо del(5q). Схема лечения пациентов с МДС низкого риска представлена на рисунке 1.

**Терапия МДС высокого риска.** Эпигенетическая терапия гипометилирующими препаратами в настоящее время является основной патогенетической опцией лечения МДС. Пациенты старше 55-60 лет, составляющие основную популяцию больных с МДС, как правило, не рассматриваются в качестве кандидатов для аллогенной трансплантации. При невозможности проведения алло-ТГСК стандартом является эпигенетическая терапия. Азацитидин (5-азацитидин) и децитабин (5-аза-2'-дезоксцитидин) относятся к классу гипометилирующих агентов или ингибиторов ДНК-метилтрансферазы (DNMT), фермента, отвечающего за метилирование вновь синтезируемой ДНК. Инкорпорирование 5-азануклеотидов в ДНК приводит к разрыву её связей с DNMT и по следующему протеосомному расщеплению фермента. Угнетение активности DNMT вызывает понижение степени метилирования ДНК в дочерних клетках, образующихся в результате деления исходной клетки-мишени. Обработка клеток азацитидином *in vitro* может привести к гипометилированию ДНК и реактивации экспрессии гена. Клиническая эффективность данного препарата изучена в рамках многочисленных международных многоцентровых исследований.



**Алгоритм принятия терапевтических решений у больных МДС из группы низкого риска по IPSS**



**Рисунок 1.** Схема лечения пациентов с МДС низкого риска

Таким образом, Азацитидин, один из базисных препаратов современной терапии МДС, показал свою эффективность еще в 1980-х годах, а исследование, опубликованное 2002 году, подтвердило эффективность такого терапевтического подхода. Через 7 лет азацитидин доказал свою эффективность в улучшении выживаемости пациентов высокого риска, что было отражено в исследовании AZA-001. Это клиническое исследование до настоящего времени остается, пожалуй, самым значимым в изучении эпигеномной терапии. В него было включено 358 пациентов с МДС преимущественно промежуточного-2 и высокого риска по IPSS (89%). Дизайн протокола предусматривал рандомизацию пациентов на две группы: 1 группа азацитидином в дозе 75 мг/м<sup>2</sup> подкожно в течение 7 дней каждые 28 дней (n = 179) или на один из трех методов стандартного лечения (n = 179). Ключевым выводом исследования стало значимое улучшение ОВ, которое ассоциировалось с применением азацитидина: медиана ОВ 24,5 мес. против 15,0 мес. (p=0,0001); 2-летняя ОВ – 50,8% против 26,2% (p<0,0001). Наиболее частыми нежелательными явлениями 3-4 степени в группе азацитидина были периферические цитопении (нейтропения 91%, тромбоцитопения 85%, анемия 57%), однако не было никаких различий по сравнению с низкими дозами цитарабина (89, 96 и 77%, соответственно) или схемой «7+3» (90, 95 и 58% соответственно). Согласно результатам еще одного крупного исследования CALGB9221, в которое был включен 191 пациент со всеми морфологическими вариантами МДС, включая промежуточный-2 и высокий риск по IPSS (46%), на те-

рапию азацитидином ответили 60% пациентов, из них полной ремиссии (ПР) достигли 7%, частичной ремиссии (ЧР) – 16% и гематологического улучшения (ГУ) – 37%. В группе ЛСТ только у 5% было документировано лишь ГУ. Прогрессирование в ОМЛ, как первое неблагоприятное событие, имело место в 15% случаев на азацитидине против 38% на традиционном лечении (p=0,001). Медиана времени до трансформации (ВДТ) в ОМЛ также оказалась лучше в группе азацитидина: 21 мес. против 13 мес. (p=0,007). Основная схема лечения азацитидином, применяемая в практике, остается: Aza 75мг/м<sup>2</sup> с 1 по 7 день с интервалом в 21 день.

Несколько позже была доказана эффективность децитабина, последнего из современной триады «классической» медикаментозной терапии МДС.

**Клинические данные по применению децитабина.** Децитабин (5-аза-2'-дезоксцитидин) является гипометилирующим агентом, аналогом нуклеотида пиримидина, ингибирующим активность ДНК-метилтрансферазы. Предполагается, что в малых дозах децитабин подавляет метилирование за счет связывания и инактивации DNMT, что приводит к восстановлению экспрессии генов и к дифференцировке клеток. В исследование D-0007 (фаза 3) было включено 170 пациентов с МДС (промежуточный-2 и высокий риск по IPSS – 70%). Децитабин назначался в дозе 15 мг/м<sup>2</sup> 3 раза в сутки в дни 1-3 каждые 6 недель. Полной ремиссии и ЧР достигли 9 и 8% пациентов в группе децитабина. В контрольной группе ответов не было. Медиана ВДТ в ОМЛ или смерти оказались лучше для группы децитабина по сравнению с группой контро-

ля. (12,0 мес. против 6,8 мес.;  $p=0,03$ ). Преимущество по медиане ОВ не было (14,0 мес. против 14,9 мес.;  $p=0,636$ ). В другое исследование 06011 (фазы) включили 233 пациента со всеми вариантами МДС (промежуточный-2 и высокий риск по IPSS – 93%), которых также рандомизировали на те же самые группы. Применение децитабина сопровождалось значимым улучшением медианы выживаемости, свободной от прогрессирования (6,6 мес. против 3,0 мес.,  $p=0,004$ ) и снижением риска трансформации в ОМЛ в течение первого года (22% против 33%,  $p=0,036$ ). Вместе с тем, не было получено улучшения ни в отношении медианы ОВ (10,1 мес. против 8,5 мес.,  $p=0,38$ ), ни в отношении ВДТ в ОМЛ (8,8 мес. против 6,1 мес.,  $p=0,24$ ). Наиболее частыми нежелательными явлениями 3-4 степени были фебрильная нейтропения (25 и 7%) и инфекционные осложнения (58 и 50%). Целью еще одного исследования, проведенного китайскими учеными, стала оценка сравнительной эффективности и безопасности децитабина у пациентов с (МДС) при применении 3 и 5-дневных схем терапии. В это исследование включались больные как с первичным, так и вторичным МДС. В ходе исследования 35 из 132 (26,5%) пациентов из группы, получавшей целевое лечение, достигли значительного ( $P<0,001$ ) общего ответа, в том числе 29,4% для 3-дневной и 25,5% для 5-дневной схем. Показатель гематологического улучшения был аналогичным: 47,1% и 48,0% соответственно. Цитогенетический ответ был достигнут у 20 из 30 (66,7%) пациентов с исходными цитогенетическими аномалиями. Произошло 35 (40,2%) трансформаций в ОМЛ или смертей от ОМЛ, а среднее время выживания без ОМЛ составляло 23,8 месяца для всех пациентов из набора; 24-мес. ОВ составила 48,9%. Сообщалось о нежелательных явлениях, связанных с миелосупрессией (85,6%) и инфекциями (43,2%). Таким образом, лечение децитабином у китайских пациентов с МДС имело профиль безопасности, сопоставимый с глобальными исследованиями децитабина. С целью накопления кумулятивного эффекта, при контролируемой токсичности, предпочтительна для лечения пациентов МДС высокого и промежуточного 2 риска, схема использования децитабина в дозе  $15 \text{ мг/м}^2$  3 раза в сутки в дни 1-3 каждые 6 недель.

Метилирование аберрантной ДНК идентифицировано как ключевое молекулярное событие, регулирующее патогенез МДС и ОМЛ. В настоящее время ДНК-гипометилирующие агенты (НМА) наиболее широко используются для лечения МДС и ОМЛ, особенно у пожилых пациентов и у тех, кому не показана алло-ТГСК. Мета-анализ рандомизированных клинических исследований, посвященный сравнению клинической эффективности азацитидина и децитабина, продемонстрировал, что гипометилирующие агенты децитабин и азацитидин улучшают исход пациентов с МДС, однако выбор

между ними остается спорным. Одиннадцать исследований с 1392 пациентами с МДС (децитабин,  $n=768$ ; азацитидин,  $n=624$ ) были включены для анализа. Объединенные оценки частичного ответа, гематологического улучшения и общих показателей ответа для азацитидина были значительно выше, чем для децитабина. Между этими двумя препаратами не было различий относительно полного ответа, коэффициентов трансфузионной трансцендентности эритроцитов и гематологической токсичности 3-4 степени. По сравнению с лучшей симптоматической терапией азацитидин значительно улучшал ОВ (отношение рисков [HR], 0,69; 95% ДИ, 0,54-0,87) и время до развития ОМЛ (HR, 0,51, 95% ДИ, 0,35-0,74). К сожалению, эти преимущества у децитабина не были выявлены. Среди пациентов с более высоким риском по IPSS или старше 75 лет, лечение азацитидином показало более благоприятный исход по сравнению с децитабином. У пациентов, получавших децитабин, наблюдались более частые эпизоды цитопении и инфекций 3-4 степени. Таким образом, согласно последним исследованиям, несмотря на более длительный опыт применения децитабина, в связи с более высокими показателями общего ответа и лучшими показателями ОВ, азацитидин рекомендуется как приоритетный гипометилирующий агент для лечения МДС, особенно у пожилых пациентов и высоком риске трансформации.

Схема лечения пациентов с миелодиспластическим синдромом высокого риска и промежуточного 2 риска по шкале прогноза IPSS отражена на рисунке 2. Принимая во внимание ограниченное преимущество выживаемости при лечении гипометилирующими препаратами, в настоящее время по-прежнему рекомендовано включать пациентов в клинические исследования МДС промежуточно-2/высокого риска по IPSS-R, которые не являются кандидатами для трансплантации аутологичных стволовых клеток.

**Роль трансплантации стволовых клеток в лечении МДС.** Первый случай успешной аллогенной трансплантации костного мозга в качестве лечебной тактики при МДС датирован 1973 годом Bhaduri S, Kubanek B, Heit W, и др. ТКМ может потенциально излечить МДС, но несет значительные риски летальности, связанные с инфекциями, реакцией «трансплантат против хозяина», и рецидива болезни. Кроме того, подавляющее большинство пациентов с МДС, возраст которых более 70 лет, не являются кандидатами на трансплантацию. Тем не менее, для пациентов моложе 70 лет с доступным донором и приемлемым гемопозитическим индексом коморбидности следует рассмотреть возможность трансплантации. Проблеме времени трансплантации (на раннем этапе постановки диагноза или поздняя трансплантация во время прогрессирования болезни) уделил внимание Катлер

Алгоритм принятия терапевтических решений МДС  
в группе промежуточного-2 и высокого риска по IPSS



**Рисунок 2.** Схема лечения пациентов с миелодиспластическим синдромом высокого риска и промежуточного 2 риска по шкале прогноза IPSS

с коллегами, проведя анализ принятия решения с использованием перспективно собранных данных о регистрации пациентов с МДС. В результате исследования было найдено преимущество выживаемости для пациентов с поздней трансплантацией с низким/промежуточным-1 риском по IPSS, тогда как пациенты с промежуточным-2/высоким риском получили преимущество выживаемости на ранней стадии трансплантации при постановке диагноза. Следовательно, оптимальным временем трансплантации для пациентов с низким/промежуточным-1 риском являются момент развития новой цитогенетической аномалии, выраженные цитопении или прогрессирование болезни до более высокой группы риска. В другом исследовании Корет с коллегами изучил роль кондиционирования сниженной интенсивности (КСИ) в сравнении с нетрансплантационными подходами у пожилых пациентов с МДС в возрасте 60–70 лет. Среди пациентов с низким/промежуточным-1 риском по IPSS выживаемость при трансплантации КСИ составила 38 месяцев против 77 месяцев при нетрансплантационных подходах в отличие от пациентов с МДС промежуточного-2/высокого риска по IPSS, у которых выживаемость при трансплантации КСИ была 36 месяцев против 28 месяцев в случае нетрансплантационных терапий.

На основе изучения результатов вышеуказанных исследований рекомендуется рассмотреть предварительную ТКМ (myeloablative для пациентов младше 55 лет и трансплантацию КСИ для пациентов старше 55 лет) для всех пациентов с промежуточным-2/высоким риском по IPSS-R младше 70 лет при условии наличия донора и приемлемого индекса коморбидности. И наоборот, рекомендовать использовать подход поздней трансплантации при очевидном развитии болезни для пациентов с МДС пониженного риска по IPSS младше 70 лет. В случае отсутствия донора с подходящим HLA-генотипом использовать альтернативные подходы с применением гаплоидентичных и двойных пуповинных трансплантатов.

Таким образом, несмотря на то, что аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток является единственным способом лечения данного заболевания с курабельным потенциалом, в реальности она выполняется крайне ограниченно вследствие пожилого возраста пациентов, высокой коморбидности сопутствующих заболеваний. Рецидивы МДС и смертность, связанная непосредственно с процедурой трансплантации, включая острую и хроническую реакцию трансплантат против хозяина, являются факторами, ограничивающими ее применение.

Единого правильного метода терапии пациентов с высоким индексом коморбидности, после неудачной трансплантации, не существует. Выбор паллиативного лечения зависит от клинической ситуации.

**Лечение в случае прогрессирования заболевания.** Только около половины пациентов с МДС отвечают на гипометилирующие препараты с медианой времени до ответа, равной 3-4 циклам, с частотой ПО около 7-17%. Как правило, ответы являются непродолжительными более чем у половины пациентов, с максимальной продолжительностью от 1 года до 1,5 лет. Как только у пациентов развивается рецидив, их прогноз становится крайне неблагоприятным с медианой выживаемости менее 4,1 мес. Следовательно, необходимо искать альтернативные стратегии лечения. Лучшим вариантом является интенсивная терапия, аналогичная таковой при ОМЛ с последующей алло-ТГСК. К сожалению, интенсивная терапия подавляющему большинству пациентов не подходит, и при таком сценарии заболевания рекомендовано включать их в клинические исследования с использованием новых препаратов, таких как ингибиторы деацетилазов гистона (моцетиностат, працинонат), киназы (ригосертиб, воласертиб), ферменты, задействованные в клеточном метаболизме (изоцитратдегидрогеназы 1 и 2-ИДГ 1/2), ингибиторы иммунных контрольных точек (PD-1/PD-L1) и химиотерапия (клофарабин/сапацитабин).

Перспективными новыми препаратами в клинических исследованиях гемотрансфузионно зависимой анемии стали активаторы TGF-бета/SMAD сигнального пути. К ним относятся TGF-бета-адrenomиметики – сотатерцепт (ACE-011)

и луспатерцепт (ACE-536). Сотатерцепт – активатор рецептора типа IIА, способствующего высвобождению зрелых эритроцитов в циркуляцию. Результаты исследования 2 фазы сотатерцепта, вводимого 54 пациентам с МДС низкого и промежуточного-1 риска и трансфузионно-зависимой анемией, показали, что у 21 (40%) из 53 оцениваемых пациентов было отмечено гематологическое улучшение.

Заканчивая обзор данных по лечению МДС, важно отметить препараты, представляющие интерес для лечения МДС в будущем:

1) ингибиторы UTX/JMJ3D3 на этапе доклинической разработки,

2) малый молекулярный ингибитор EZH2-EPZ 6438 (тазаметостат), проходящий фазу 1 испытаний при неходжкинских лимфомах,

3) лизин-специфический ингибитор деметилазы-1 GSK 2879552,

4) ингибитор DOT1L – первый ингибитор метилтрансферазы гистона (HMT), нацеленный на DOT1L, в фазе 1 испытаний у пациентов с рецидивирующим/рефрактерным острым лейкозом, с рекомбинацией гена MLL, включая 11q23 или частичные тандемные дубликации, и

5) бромодоменные и экстратерминально-доменные (BET) ингибиторы TEN-010, проходящие фазу 1 испытаний при солидных опухолях.

В последнее десятилетие отмечен значительный прогресс в понимании молекулярно-генетических событий в патогенезе МДС. В настоящее время эти молекулярные открытия соответствующим образом используются для совершенствования подхода к постановке диагноза, оценке прогноза и терапии и рассматриваются как потенциальные терапевтические мишени (таблица 3).

**Таблица 3**

**Использование исследования соматических мутаций для создания таргетной терапии**

Мутация	Препарат	Механизм действия	Пациенты	Название исследования, фаза	НСТ-идентификатор
SF3B, SRSF2, U2AF1 или ZRSR2	НЗВ-8800 (per os)	Ингибитор фактора сплайсинга SF3B1	ОМЛ: пациенты, которым не планируется проводить индукцию МДС: без ответа на гипометилирующую терапию при МДС высокого риска или зависимые от трансфузий при МДС низкого риска ХММЛ: не отвечающие на лечение	Исследование безопасности, фармакокинетики и фармакодинамики модулятора сплайсинга НЗВ-8800 у пациентов с МДС, ОМЛ, ХММЛ 1 фазы.	NCT02841540
TET2	Витамин С (в\в)	Имитирует исправление ошибок в TET2 через запуск деметилирования ДНК и остановку самообновления aberrантных стволовых клеток	Пациенты с МДС с бластами <20% и тромбоцитами >20000 (может проводиться одновременно с гипометилирующей терапией (ГМА))	Исследование переносимости витамина С у пациентов с МДС промежуточного или высокого риска и мутацией TET2 фазы 1b/2a	NCT03433781

## ГЕМАТОЛОГИЯ: ВЧЕРА, СЕГОДНЯ, ЗАВТРА

TET2	Аскорбиновая кислота (per os)	Аналогично выше (в комбинации с АЗА)	МДС, МДС/МПЗ или пациенты с ОМЛ, которым не проводилось лечение ГМА	Исследование эффективности АЗА+аскорбиновой кислоты у пациентов с МДС с мутацией TET2 и ОМЛ фазы 2	NCT03397173
TP53	APR-246 (в\в)	Реактивация мутантной p-53 индуцированной программируемой клеточной смерти	Пациенты с миелоидными неоплазиями, не получавшими лечение раньше, и бластами <30%.	Исследование безопасности и эффективности APR-246 с азациитидином в лечении миелоидных неоплазий с мутациями TP53 фазы 1b/2a	NCT03072043
IDH2	Энасидениб (per os)	Снижает количество онкометаболита 2-HG через ингибирование синтеза белка мутантной IDH2	Пациенты с МДС (бласты <30%), не получавшие лечение ГМА (arm A), или пациенты с рецидивом или не ответившие на 6 курсов ГМА	Исследование эффективности таргетной терапии IDH2-ингибитором Энасиденибом (AG221) у пациентов с МДС высокого риска и мутацией IDH2 фазы 2	NCT03383575
IDH1	FT-2102 (per os)	Механизм неизвестен	ОМЛ или МДС (промежуточного, очень высокого риска или IPSS-R), при рецидиве или отсутствии ответа на предыдущее лечение	Многоцентровое открытое исследование эффективности FT-2102 как монотерапии или в комбинации с азациитидином или цитарабином у пациентов с ОМЛ или МДС с мутацией IG11 фазы 1\2	NCT02719574
IDH1 R132	Ивосидениб (per os)	Снижает количество онкометаболита 2-HG через ингибирование синтеза белка мутантной IDH1	Пациенты, больные тяжелыми онкогематологическими заболеваниями, с рецидивом или не ответившие на предыдущее лечение	Исследование эффективности AG-120 в пероральной форме в лечении пациентов, больных тяжелыми онкогематологическими заболеваниями с мутацией IDH1 фазы 1	NCT02074839
IDH2	Энасидениб (per os)	Снижает количество онкометаболита 2-HG через ингибирование синтеза белка мутантной IDH2	Пациенты, больные тяжелыми онкогематологическими заболеваниями, с рецидивом или не ответившие на предыдущее лечение (группа, не получавшая лечение, если пациенты потенциально не могли перенести лечение)	Исследование эффективности AG-221 в лечении пациентов, больных тяжелыми онкогематологическими заболеваниями с мутацией IDH2, фазы 1\2	NCT01915496
IDH1 или IDH2	AG-881 (per os)	Низкомолекулярный ингибитор белков мутантных IDH1 и IDH2, снижает количество онкометаболита 2-HG	Пациенты, больные тяжелыми онкогематологическими заболеваниями, с рецидивом или не ответившие на предыдущее лечение	Исследование эффективности AG-881 перорально в лечении пациентов, больных тяжелыми онкогематологическими заболеваниями, с мутациями IDH1 или IDH2	NCT02492737
IDH1 R132	Венетоклак+ Ивосидениб (per os)	Ингибирование BCL2 в сочетании с ингибированием синтеза белка мутантной IDH1	Пациенты с ОМЛ с рецидивом или не ответившие на предыдущее лечение; пациенты с МДС или МПЗ высокого риска ( $\geq 10\%$ бластов в КМ) также могут быть включены в исследование после одобрения исследователя	Исследование эффективности Венетоклакса с ингибитором мутантной IDH1 (AG120) Ивосиденибом в лечении онкогематологических заболеваний с мутацией IDN1	NCT03471260

Исследования большинства находятся на ранних стадиях, в них принимают участие пациенты с рефрактерным или рецидивирующим течением. Луспатерцепт пока единственный препарат, изучение эффективности которого заканчивается в исследовании 3 фазы в России. Данный препарат демонстрирует высокую эффективность в терапии МДС низкого риска с кольцевыми сидеробластами, заметно снижая зависимость пациентов от гемотрансфузионной терапии, а значит, и уменьшая связанные с ней риски развития гемосидероза и аллоиммунизации. Из предложенных комбинаций, с нашей точки зрения, достаточно перспективным является программа «азациитидин плюс ниволумаб».

Иммуноонкологический препарат ниволумаб является человеческим моноклональным антителом, которое блокирует взаимодействие между рецептором программируемой смерти (PD-1) и его лигандами (PD-L1 и PD-L2). PD-1 рецептор является негативным регулятором активности Т-клеток. Связывание PD-1 с лигандами PD-L1 и PD-L2, которые способны экспрессироваться клетками опухолей или иными клетками микроокружения опухолей, приводит к ингибированию пролиферации Т-клеток и секреции цитокинов. Ниволумаб потенцирует иммунный ответ посредством блокады связывания PD-1 с лигандами PD-L1 и PD-L2. Потенцирование гипометилирующего действия азациитидина иммунокорректирующим препаратом возможно окажет влияние как на получение противоопухолевого ответа, так и на продолжительность жизни пациентов. Исследования ранних фаз всех перечисленных препаратов продолжаются. Это вселяет надежду, особенно с учетом того, что для лечения МДС высокого риска с прогрессированием на фоне прие-

ма или недостаточным ответом на лечение гипометилирующими агентами (ГМА) не одобрено ни одного препарата. Принципиально помнить, что у пациентов с неэффективностью стандартной гипометилирующей терапии медиана выживаемости составила 5,6 месяца, вероятность выживания через 2 года – 15%. Эти цифры справедливы для первичной и вторичной потери ответа на ГМА, а также для пациентов, не переносящих такое лечение.

**Заключение.** В последнее десятилетие обнаружился значительный прогресс в разгадке и понимании молекулярно-генетических aberrаций при МДС. В настоящее время эти молекулярные открытия соответствующим образом используются для совершенствования подхода в постановке диагноза, прогнозированию и терапии на основе того или иного механизма патогенеза. Одновременно ожидаются результаты продолжающихся клинических исследований, связанных с новыми препаратами для лечения МДС низкого и высокого риска.

Тем не менее, в силу редкости мутаций, приводящих к повышенной активности киназ, разработка таргетной терапии является главной задачей, так как именно данная группа молекул традиционно является мишенью для препаратов нового поколения. Усложняют задачу к тому же ограниченные в настоящее время знания о вкладе конкретных мутаций в развитие МДС, в частности неизвестно, какие из них являются непосредственно драйверными, какая часть из них играет роль в выживаемости клона, а как часть не имеет какой-либо клинической значимости. Большинство мутаций, описанных при МДС, часто обнаруживаются у пожилых людей без МДС, что требует дальнейших научных поисков.

**ВСЕРОССИЙСКАЯ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ  
С МЕЖДУНАРОДНЫМ УЧАСТИЕМ «ПРОБЛЕМЫ ИММУНОГЕНЕТИКИ  
В ТРАНСПЛАНТАЦИИ ОРГАНОВ, ТКАНЕЙ  
И ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК»,  
САНКТ-ПЕТЕРБУРГ  
17-18 ИЮНЯ 2021 Г.**

*Бубнова Л.Н., Павлова И.Е., Глазанова Т.В.*

**ОБ ИСТОРИИ КОНФЕРЕНЦИЙ ПО ИММУНОГЕНЕТИКЕ В ФЕДЕРАЛЬНОМ  
ГОСУДАРСТВЕННОМ БЮДЖЕТНОМ УЧРЕЖДЕНИИ «РОССИЙСКИЙ НАУЧНО-  
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ГЕМАТОЛОГИИ И ТРАНСФУЗИОЛОГИИ  
ФЕДЕРАЛЬНОГО МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКОГО АГЕНТСТВА»**

Первая Всероссийская с международным участием конференция, проведенная в 2009 году в ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России, была посвящена 50-летию открытия главного комплекса гистосовместимости человека – системы HLA. Это открытие обеспечило научный прорыв как в фундаментальной иммуногенетике и иммунологии, так и во многих клинических дисциплинах. Жан Доссэ, французский академик, описавший первый лейкоцитарный антиген, был удостоен в 1980 г. Нобелевской премии.

Эта область науки является образцом гуманитарного сотрудничества, в котором не принято даже патентование результатов исследования. Жан Доссэ говорил, что хотел бы, чтобы его вспоминали следующими четырьмя словами: трансплантация, клеточная иммунология, предикативная медицина и антропология. И действительно, за истекшие годы результаты работы по изучению главного комплекса гистосовместимости человека нашли широкое применение именно в этих областях биологии и медицины: это, прежде всего, трансплантационный иммунитет и трансплантация органов и тканей; в области клеточной иммунологии – это генетический контроль иммунного ответа; это также использование в прогностической медицине (HLA и заболевания), и в огромном числе антропологических исследований.

С 2009 года на базе Российского НИИ гематологии и трансфузиологии было проведено 6 конференций, в которых приняли участие около 700 специалистов различных регионов России, стран Европы и Америки. Конференции проводились в тесном сотрудничестве и с участием специалистов Европейской федерации иммуногенетиков (EFI). В работе первой конференции приняли участие специалисты из 17 городов России, а также из Белоруссии, Узбекистана, Таджикистана, Германии. Тематика пленарных и секционных заседаний была посвящена обсуждению итогов и перспектив работы по тканевому типированию в различных учреждениях, популяционным исследованиям, вопросам контроля качества иммуногенетического типирования, связи HLA с заболеваниями, и, конечно, развитию регистров доноров

костного мозга/гемопоэтических стволовых клеток и подбору доноров для аллогенных трансплантаций.

Учитывая, что создание национального донорского регистра, входящего во всемирную базу, требует повышения качества работы всех лабораторий, участвующих в реализации этого проекта, и внедрения современных методов обследования, в 2011 году была проведена обучающая конференция по аккредитации лабораторий типирования Европейской федерации иммуногенетиков. Поскольку наша лаборатория – Республиканский центр иммунологического типирования тканей ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России – первой в России получила аккредитацию в 2010 году – мы смогли пригласить членов аккредитационного комитета, которые ознакомили участников конференции с требованиями, предъявляемыми к лабораториям Европейской федерацией иммуногенетиков.

Следующая конференция, в 2012 году, была посвящена организации и роли донорских регистров в трансплантации гемопоэтических стволовых клеток. Основной целью конференции было ознакомление ее участников с работой ведущих зарубежных регистров доноров костного мозга и клиник, связанных с трансплантацией стволовых клеток, состоянием вопроса об организации национального донорского регистра России и современными методами тканевого типирования. В работе конференции приняли участие специалисты из 14 городов Российской Федерации, а также из Армении, Белоруссии, Казахстана, Украины.

В качестве докладчиков из зарубежных стран выступили: заведующая отделом поиска и подбора доноров регистра Энтони Нолан (Великобритания) Ирина Евсеева, профессор отделения гематологии, онкологии и опухолевой иммунологии клиники Шарите Берлинского Университета Игорь Вольфганг Блау, профессор лаборатории трансплантационной иммунологии Королевского госпиталя Ливерпульского университета Дерек Миддлтон, доктор наук Ольга Блау из отдела молекулярной генетики «Labor Berlin» клиники Шарите Берлинского университета, медицинский директор Армянского регистра доно-

ров костного мозга М. К. Назаретян.

Конференция 2013 года по актуальным вопросам иммуногенетики и тканевого типирования была посвящена современным методам и стратегии HLA-типирования в лабораториях Европы; международному контролю качества тканевого типирования; вопросам аккредитации лабораторий в России. В работе конференции приняли участие президент EFI проф. Г. Фишер (Австрия), заместитель директора по научным исследованиям регистра Энтони Нолан проф. Стивен Марш (Великобритания, Лондон), член исполнительного комитета EFI проф. Б. Видан-Йерас (Словения), член аккредитационного комитета EFI проф. Энтони Славчев (Чехия).

В докладах были представлены новые научные данные о генетическом разнообразии населения Европы, о необходимости координации усилий по внедрению единых требований к выполнению научных и практических исследований в области иммуногенетики. Обсуждались вопросы организации регистров доноров гемопоэтических стволовых клеток/костного мозга.

Пятая традиционная конференция, посвященная актуальным иммунологическим аспектам трансплантации аллогенных гемопоэтических клеток, как теоретическим проблемам, так и практическому приложению этих знаний, состоялась 24-25 июня 2015 г. В ней традиционно приняли участие специалисты из России и других государств Евразийского сообщества: Армении, Белоруссии и Казахстана, а также ведущие ученые Европы, среди которых – президент Европейской федерации иммуногенетики проф. Е. Наумова, и представители научных учреждений Англии, Германии, Чехии, Словении, Болгарии, Турции, США.

В программу конференции были включены 27 докладов, посвященных наиболее важным вопросам, касающимся проблемы трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ГСК): современная стратегия поиска оптимального донора, развитие регистров доноров ГСК и банков пуповинной крови в мире, сотрудничество этих регистров.

Доклад президента EFI профессора Е. Наумовой (София, Болгария) был посвящен актуальным вопросам стратегии поиска совместимого донора гемопоэтических стволовых клеток. Этой же проблеме – селекции доноров для трансплантации ГСК – был посвящен доклад Анн-Маргарет Литтл из Глазго (Великобритания).

Ряд докладов были посвящены исследованиям в области популяционной генетики разных стран: России, Армении, Белоруссии. В этих сообщениях были представлены национальные особенности распределения HLA-специфичностей, типичные и уникальные для представителей различных национальностей HLA-гаплотипы (Г.В. Семенов, г. Минск, Т.А. Сулова, г. Челябинск, М.К. Назаретян, г. Ереван, А.А. Чумак, г. Москва).

Большое внимание было уделено аккредитации лабораторий типирования Европейской федерацией иммуногенетики (EFI), организации внешней системы контроля качества, что имеет решающее значение для осуществления сотрудничества при поиске совместимых доноров ГСК как внутри страны, так и за рубежом.

Конференция 2018 года собрала специалистов России, Республики Беларусь, Республики Казахстан, Австрии, Болгарии, Германии, Словении, Чехии. Участники из России представляли города: Москва, Санкт-Петербург, Петрозаводск, Ростов-на-Дону, Киров, Самара, Новосибирск, Ханты-Мансийск, Челябинск, Казань, Иваново, Нижний Новгород, Тольятти.

Пленарное заседание докладом «40-летие службы иммунологического типирования тканей в ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России» открыла Л.Н. Бубнова. Президент EFI Е. Наумова (София, Болгария), рассказала об иммуногенетике трансплантации гемопоэтических стволовых клеток в эру NGS, когда стало возможным более точно и подробно изучать иммуногенетические характеристики как реципиента, так и донора. Доклад И. Фаэ (Вена, Австрия), был посвящен стратегии поиска доноров в Венском университете, а Е.Г. Хамагановой из Москвы – HLA-генетическим дистанциям между донорами регистра «НМИЦ гематологии», российскими и некоторыми зарубежными популяциями. Профессор И.-В. Блау (Берлин), рассказал о работах по генетической модификации Т-клеток, направленных против опухолевого антигена MAGEA1.

Сегодня мы открываем седьмую Всероссийскую научно-практическую конференцию с международным участием на тему «Проблемы иммуногенетики в трансплантации органов, тканей и гемопоэтических стволовых клеток».

Тематика конференции:

- Популяционное разнообразие HLA-генотипов, стратегия и проблемы выбора оптимального донора
- Роль трансплантации гемопоэтических стволовых клеток в лечении онкогематологических и других заболеваний, значение различных факторов в исходе трансплантации
- Регистры доноров гемопоэтических стволовых клеток и организация их взаимодействия с центрами трансплантации
- Значение иммуногенетических факторов для трансплантации почки и других органов
- Связь системы HLA с различными заболеваниями и гиперчувствительностью к лекарственным препаратам
- Международный контроль качества и аккредитация лабораторий иммуногенетики и тканевого типирования
- Заготовка и консервирование крови, ее компонентов, гемопоэтических стволовых клеток контроль качества, вопросы стандартизации
- Новые направления и методы иммуногенетических исследований.



*Ананьева А.В.<sup>1</sup>, Лексина Я.А.<sup>1</sup>, Андрюшкина А.В.<sup>2</sup>, Шагимарданова Е. И.<sup>1</sup>*

**АНАЛИЗ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ЧАСТОТ HLA-АЛЛЕЛЕЙ И ГАПЛОТИПОВ У ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ДОНОРОВ НАЦИОНАЛЬНОГО РЕГИСТРА ДОНОРОВ КОСТНОГО МОЗГА ИМЕНИ ВАСИ ПЕРЕВОЩИКОВА**

<sup>1</sup>Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет», Казань, Россия

<sup>2</sup>Национальный регистр доноров костного мозга имени Васи Перевощикова, Москва, Россия

**Введение.** Несмотря на то, что гены HLA являются самыми полиморфными в геноме человека, HLA-аллели являются стабильными для популяций и сохраняются в ряду поколений. Оценка частот встречаемости HLA гаплотипов в популяции необходима для оценки вероятности обнаружения подходящего донора, может использоваться для различных популяционных исследований.

**Цель.** Цель настоящего исследования – определение встречаемости аллелей генов гистосовместимости у жителей РФ.

**Материалы и методы.** ДНК выделяли из 200 мкл крови набором QIAamp 96 DNA QIAcube HT с помощью QIAcube HT System (Qiagen, Германия), автоматической станции выделения нуклеиновых кислот. Подготовка библиотеки осуществлялась с помощью набора Nulotype kit (Omixon, Венгрия). Секвенирование проводили с использованием набора реагентов MiSeq v.2 и прибора MiSeq (Illumina, США). Файлы FASTQ были собраны с использованием программного обеспечения HLA Twin (версия 4.1.0, Omixon, Inc., Будапешт, Венгрия) с базой данных IPD - IMGT / HLA версии 3.37.0.

**Результаты.** Объектом данного исследования явились образцы венозной крови потенциальных доноров гемопоэтических стволовых клеток (n=10747) Национального регистра доноров костного мозга имени Васи Перевощикова. Среди выявленной когорты были определены 86 HLA-A, 135 HLA-B, 64 HLA-C, 35 HLA-DQB1, 88 HLA-DRB1 аллелей. Наиболее частыми среди HLA-A аллели

являются HLA-A\*02:01:01G (26,9%), A\*03:01:01G (13,8%), A\*24:02:01G (11,2)%, A\*01:01:01(10,9)%. Для локуса HLA-B с распространёнными вариантами были B\*07:02:01G (11,5%), B\*18:01:01G (7,7%), B\*13:02:01(6,2%), B\*08:01:01G (5,8%). Наиболее частыми аллелями локуса HLA-C являются C\*07:02:01G (13,3%), C\*04:01:01G (13,1%), C\*06:02:01G и C\*07:01:01G по 11,6%, кроме того часто встречался вариант C\*12:03:01G (10,1%). Наиболее частыми аллелями HLA-DQB1 были определены, как DQB1\*03:01:01G (20%) и DQB1\*02:02:01G (18,8%), другие варианты встречались чуть реже DQB1\*05:01:01G (13,6%), DQB1\*06:02:01G (11,1%). В локусе HLA-DRB1 наиболее часто встречался DRB1\*07:01:01G (14,4%), и чуть реже DRB1\*15:01:01G (12%) и DRB1\*01:01:01G (11,5%). Выявлена тенденция более высокой частоты гаплотипа HLA-A\*01:01:01 ~ B\*08:01:01 ~ C\*07:01:01 ~ DQB1\*02:01:01 ~ DRB1\*03:01:01, он определен для 10,5% исследованных объектов, также у 4,7% распространенным гаплотипом являлся A\*01:01:01 ~ B\*08:01:01 ~ C\*06:02:01 ~ DQB1\*02:01:01 ~ DRB1\*03:01:01.

**Выводы.** Анализ полученных данных выявил сходство иммуногенетического профиля HLA-аллелей и пятилокусных гаплотипов у жителей РФ с некоторыми европейскими популяциями. Данные о частоте встречаемости могут быть использованы в качестве основы для дальнейших генетических исследований и изучения предрасположенности к заболеваниям среди населения РФ.

*Ананьева А.В.<sup>1</sup>, Сергеева Ю.П.<sup>1</sup>, Осипова Н.Р.<sup>1</sup>, Гайфуллина Р.Ф.<sup>1,2</sup>, Шагимарданова Е. И.<sup>1</sup>*

**РЕДКИЕ HLA-АЛЛЕЛИ СРЕДИ КОГОРТЫ НАЦИОНАЛЬНОГО РЕГИСТРА ДОНОРОВ КОСТНОГО МОЗГА ИМЕНИ ВАСИ ПЕРЕВОЩИКОВА**

<sup>1</sup>Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет», Казань, Россия

<sup>2</sup>Приволжский регистр доноров костного мозга, Казань, Россия

**Введение.** Гены HLA являются наиболее полиморфными в геноме человека. Благодаря внедрению метода секвенирования нового поколения (Next Generation Sequencing — NGS) в типирование HLA генов появилась возможность разрешать аллельные неоднозначности и обеспечивать наивысшую степень разрешения. Высокая пропускная способность и относительно низкая стоимость способствуют росту количества выявленных редких и

новых аллелей HLA.

**Цель.** Цель настоящего исследования – выявление редких аллелей потенциальных доноров гемопоэтических стволовых клеток Национального регистра доноров костного мозга имени Васи Перевощикова в Московском регионе.

**Материалы и методы.** В работе использовано 7230 образцов венозной крови потенциальных доноров гемопоэтических стволовых клеток Нацио-

нального регистра доноров костного мозга имени Васи Перевощикова. Тотальная ДНК выделялась из 200 мкл крови с использованием автоматизированной станции QIAcube HT System (Qiagen, Германия). Концентрация и качество выделенной ДНК оценивалась с помощью спектрофотометра Implen NanoPhotometer NP 80 (Implen). Для дальнейшей подготовки библиотек были использованы наборы двух производителей: NGSgo (GenDX, Нидерланды) и Holotype (Omixon, Венгрия). Секвенирование проводили с использованием MiSeq reagent kit v.2 и секвенатора MiSeq (Illumina, США). Анализ результатов проводили с использованием программного обеспечения, предоставляемого производителями наборов для подготовки библиотек: NGSengine и HLA Twin.

**Результаты.** Среди 7230 потенциальных доноров гемопоэтических стволовых клеток всего было обнаружено 18 редких и 15 очень редких аллелей HLA. Редкие аллели: A\*11:72, A\*02:01:71, A\*02:188,

B\*44:27:01, B\*15:01:10, B\*07:252, C\*03:54, C\*14:25, C\*03:02:02, C\*02:16:02, DQB1\*02:17, DRB1\*14:12:01, DRB1\*13:26:01, DRB1\*13:15, DRB1\*14:54:01, DRB1\*08:03:03, DRB1\*14:89, DRB1\*13:26:01. Очень редкие аллели: A\*11:83, A\*30:01:04, B\*13:45, B\*35:15:01, B\*27:133, B\*27:148, C\*07:308, C\*07:303, C\*03:143, C\*06:143, C\*07:02:32, C\*04:105N, DQB1\*06:02:04, DRB1\*09:20, DRB1\*11:04:07. Кроме того были выявлены новые аллели HLA, которые получили официальные названия A\*11:362 и B\*44:493, согласно классификации Комитета ВОЗ по номенклатуре факторов HLA системы.

**Выводы.** Выполненная работа позволила определить редкие аллели, представленные в Национальном регистре доноров костного мозга имени Васи Перевощикова. Такие исследования актуальны для дальнейшего изучения разнообразия HLA-аллелей у представителей различных российских популяций, что позволит увеличить эффективность подбора доноров ГСК.

*Беркос А.С., Терентьева М.А., Табак М.В., Беляева Е.В.*

## **ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПОДБОРА ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ДОНОРОВ РЕГИСТРА, ТИПИРОВАННЫХ ПО ТРЕМ ЛОКУСАМ HLA**

*ФГБУ «Российский НИИ гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург*

**Введение.** Одним из важных факторов, влияющих на успех трансплантации ГСК, является скорость подбора донора, поскольку клиническое состояние реципиента может достаточно быстро измениться. Известно, что наиболее благоприятным моментом для выполнения трансплантации является первая ремиссия, достигнутая в ходе терапии. В последние годы типирование потенциальных доноров ГСК в РФ, в том числе и в нашем институте, в основном выполняется методом молекулярного типирования по пяти локусам HLA: A, B, C, DRB1, DQB1, однако часть доноров типирована по трем (A, B, DRB1), или четырем (A, B, C, DRB1). Такие не полностью типированные доноры обычно имеются в базах регистров с длительной историей существования. Максимально полное типирование доноров, выполненное по пяти локусам, включая типирование на высоком уровне разрешения, обеспечивает наибольшую эффективность и скорость подбора, однако, поскольку лишь малая часть доноров, входящих в регистр, окажется совместимой с пациентом и будет востребована для заготовки ГСК, «дотипирование» доноров в отсутствие заявки представляется недостаточно обоснованным.

**Цель исследования.** Анализ вероятности и скорости нахождения HLA-A, B, C, DRB1, DQB1 идентичного донора, первоначально типированного по антигенам трёх локусов - A, B, DRB1, и совпадающего с пациентом по этим специфичностям.

**Материалы и методы.** 171 донор из регистра ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России, типированный по трехлокусному фенотипу, совпадающий с реципиен-

том из центра трансплантации ГСК в соответствии с полученной заявкой. Молекулярное типирование локусов A, B, C, DRB, DQB1 выполняли методами PCR-SSP и SSO (базовый уровень разрешения). Высоко разрешающее типирование было проведено 31 донору.

**Результаты.** При «дотипировании» локусов C и DQB1у 171 донора нашего регистра, совпавшего с реципиентом по A, B, DRB1 фенотипу, было установлено, что 74 (43,3%) донора полностью совпали с пациентом по 5 локусам HLA. Остальные 97 (56,7%) доноров в подавляющем большинстве случаев 71 (41,5%) не совпали с пациентом по локусу C: 63 (36,8%) имели расхождение по одному C антигену, 8 (4,7%) - по двум. Расхождения по антигенам локуса DQB1 обнаружены только в 7,6% случаев. Необходимо подчеркнуть, что время, в течение которого проводилось «дотипирование» доноров, как правило, не превышало 3 дней. Типирование проводилось из образцов донорской крови, хранящихся в банке лаборатории. Следует отметить, что в большинстве случаев перед проведением C и DQB1 типирования проводилась «активация» доноров: выясняли состояние здоровья донора для выявления возможных противопоказаний к донорству ГСК и получали подтверждение согласия на возможную донацию. Только при готовности донора проводилось C и DQB1 «дотипирование». Результаты направлялись в трансплантационную клинику и вносились в базу данных регистра, соответственно увеличивая долю доноров, типированных по пяти локусам. Высоко разрешающее типирование проводилось из вновь

взятого образца крови донора, при этом было установлено 11(6,4%) полностью совместимых пар донор-реципиент.

**Выводы.** Полученные данные свидетельствуют о том, что наличие в регистре доноров, типированных по трём локусам, не снижает эффективности

подбора, и способствует увеличению числа доноров, типированных по пяти локусам, в том числе на уровне высокого разрешения, в соответствии с заявками трансплантационных клиник, что позволяет более рационально использовать дорогостоящие реагенты.

**Бубнова Л.Н.<sup>1</sup>, Павлова И.Е.<sup>1</sup>, Беркос А.С.<sup>1</sup>, Терентьева М.А.<sup>1</sup>, Глазанова Т.В.<sup>1</sup>, Ерохина Л.В.<sup>1</sup>,  
Беляева Е.В.<sup>1</sup>, Чечеткин А.В.<sup>1</sup>, Башкетова Н.С.<sup>2</sup>, Чхинджерия И.Г.<sup>2</sup>, Кожемякина М.А.<sup>3</sup>,  
Азаров Д.В.<sup>3</sup>, Кузнецова Р.Н.<sup>4</sup>, Толоян А.А.<sup>4</sup>.**

### ИММУНОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ ВОСПРИИМЧИВОСТЬ ИЛИ РЕЗИСТЕНТНОСТЬ К РАЗВИТИЮ ИНФЕКЦИИ, ВЫЗВАННОЙ ВИРУСОМ SARS-COV-2

*1 ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии ФМБА России»,*

*2 Управление Роспотребнадзора по городу Санкт-Петербургу*

*3 ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в городе Санкт-Петербург»*

*4 ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера»*

**Введение.** Главный комплекс гистосовместимости человека является одним из важнейших генетических факторов в ответе на инфекцию. Ключевая роль, которую молекулы HLA играют в иммунном ответе, осуществляя презентацию пептидов инфекционных патогенов, и огромная молекулярная вариабельность аллелей HLA в человеческих популяциях, стали основанием для проведения многочисленных исследований, направленных на изучение роли HLA-генотипов в индивидуальных особенностях ответа на новую инфекцию, вызванную вирусом SARS-CoV-2. При этом исследование связи индивидуального HLA-генотипа и возникновения и/или характера течения SARS-CoV-2 инфекции должно выполняться в сравнении с распределением генов HLA среди жителей соответствующего региона.

**Целью** настоящего исследования явилось определение предрасполагающих и протективных иммуногенетических факторов, определяющих восприимчивость и/или резистентность к инфекции, вызванной вирусом SARS-CoV-2, у жителей Северо-Западного региона России.

**Материалы и методы.** В исследование были включены жители Северо-западного региона РФ (г. Санкт-Петербург). Из них – 138 человек, перенесших новую коронавирусную инфекцию – COVID-19, среди них 61 мужчина (44,2%) и 77 женщин (55,8%), в возрасте от 20 до 65 лет. Заболевание было подтверждено регистрацией в Системе автоматизированного учета инфекционных и паразитарных заболеваний в Санкт-Петербурге "CAU "Инфекция" (рег. № 2008615797 от 04.12.2008г.) с получением эпидномера. Группу популяционного контроля составили 1456 добровольцев в возрасте от 20 до 60 лет (871 мужчина (59,8%) и 585 женщин 40,2%).

HLA-типирование проводили при помощи молекулярно-генетических методов на уровне базового разрешения, выполняя определение групп аллелей HLA-генов локусов А, В, DRB1 с помощью полимеразной цепной реакции с сиквенс-специфичными праймерами (PCR-SSP) производства "Protrans" (Германия) и с помощью полимеразной цепной реак-

ции с олигонуклеотидными сиквенс-специфичными пробамми (PCR-SSOP) производства BAG HEALTH CARE (Германия). Оба использованных метода HLA-типирования позволяли выявить 21 группу аллелей локуса HLA-A (\*01, \*02, \*03, \*11, \*23, \*24, \*25, \*26, \*29, \*30, \*31, \*32, \*33, \*34, \*36, \*43, \*66, \*68, \*69, \*74, \*80); 36 групп аллелей локуса HLA-B (\*07, \*08, \*13, \*14, \*15, \*18, \*27, \*35, \*37, \*38, \*39, \*40, \*41, \*42, \*44, \*45, \*46, \*47, \*48, \*49, \*50, \*51, \*52, \*53, \*54, \*55, \*56, \*57, \*58, \*59, \*67, \*73, \*78, \*81, \*82, \*83); 13 групп аллелей локуса HLA-DRB1 (\*01, \*03, \*04, \*07, \*08, \*09, \*10, \*11, \*12, \*13, \*14, \*15, \*16).

Статистическую обработку результатов выполняли с помощью методов популяционной генетики с использованием программ: Microsatellite Tools for Excel и Arlequin 3.5.1.3.

**Результаты.** Среди лиц, перенесших COVID-19, статистически значимо снижена частота HLA-A\*02 – 39,86 % и HLA-A\*26 – 4,35 % по сравнению с контрольной группой (51,72 %,  $\chi^2=7,58$ , и 9,07 %,  $\chi^2=4,17$ , соответственно). Одновременно более чем в 2 раза увеличена частота HLA-A\*29 (5,80 % у перенесших COVID-19, и 2,47 % в контрольной группе,  $\chi^2=4,03$ ). Это позволяет считать, что группы аллелей HLA-A\*02 и HLA-A\*26 ассоциированы со сниженным риском развития заболевания, в то время как HLA-A\*29, ассоциирован с высоким риском заболевания.

В локусе HLA-B у лиц, перенесших COVID-19 (таблица 2), также как и в контроле, чаще всего определялись следующие группы HLA-аллелей: В\*07 (21,01% и 25,9%), В\*44 (13,77 % и 18,54 %), В\*18 (9,42 % и 13,7 %). Наиболее редкие группы HLA-аллелей контрольной группы – В\*53, В\*59, В\*67, В\*73, В\*81 – среди перенесших COVID-19 не выявлены. Группа HLA-аллелей В\*35, вторая по частоте в группе популяционного контроля (20,88%), у перенесших COVID-19 встречается реже (16,67%), однако значимых различий в локусе HLA-B сравниваемых групп не установлено. В локусе HLA-DRB1 также не выявлено какие-либо значимых различий частот групп HLA аллелей у лиц, перенесших COVID-19, по

сравнению с контролем.

**Вывод.** Группы HLA-аллелей A\*02 и A\*26 являются протективными иммуногенетическими факторами в отношении развития заболевания, вызванного

вирусом SARS-CoV-2, среди жителей Северо-запада России, в то время как группа аллелей HLA-A\*29 является предрасполагающим иммуногенетическим фактором в отношении данного заболевания.

*Бутина Е.В., Йовдий А.В., Попонина Е.А., Утемов С.В.*

## **ИММУНОГЕМАТОЛОГИЧЕСКИЕ ПРИНЦИПЫ ФОРМИРОВАНИЯ РЕЗЕРВА КРИОКОНСЕРВИРОВАННЫХ ЭРИТРОЦИТОВ**

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

**Введение.** Потребность в использовании криоконсервированных эритроцитов существует при отсутствии в центре крови нативных эритроцитов с необходимым фенотипом и дефиците времени для приглашения совместимых доноров. Такая ситуация может возникнуть у реципиентов, в фенотипе которых отсутствуют часто встречающиеся антигены/антигенные сочетания; у пациентов, нуждающихся в подборе доноров по широкому спектру антигенов; у больных с алло- и аутоантителами, в том числе с панагглютинирующими антителами. Функционирование криобанка требует эффективной организационной структуры и стратегии оптимального управления запасами крови, ухода от политики пассивного хранения компонентов крови. При формировании резерва долгосрочного хранения крови необходимо соблюдать равновесие, при котором обеспечивается высокая вероятность нахождения эритроцитов с запрашиваемым фенотипом и не происходит избыточного накопления эритроцитов, невостребованных в период хранения.

**Цель.** Рациональное комплектование банка криоконсервированных компонентов крови, основанное на анализе фенотипов эритроцитов.

**Материалы и методы.** Аналитическое исследование выполнено на основании результатов иммуногематологического обследования 90 пациентов гематологической клиники и 796 доноров компонентов крови, из которых 63 больных и 469 доноров были типированы по 10 антигенам эритроцитов (ABO (A, B), Rh (D, C, c, E, e, Cw), Kell (K, k) и 27 пациентов и 327 доноров – по 18 антигенам эритроцитов (ABO (A, B), Rh (D, C, c, E, e, Cw), Kell (K, k), Kidd (Jka, Jkb), Duffy (Fya, Fyb), MNS (M, N, S, s). Исследование проведено в 2020 г. с использованием оборудования и реактивов фирм BioRad (USA), DiaMed GmbH (Switzerland), Ortho-Clinical Diagnostics (UK), Antitoxin GmbH (Germany).

**Результаты.** В соответствии с иммуногематологическими параметрами фенотип каждого донора отнесен к одной из четырех категорий: «особенный», «вы-

соко востребованный», «универсальный», «обычный».

Эритроциты с «особенным» фенотипом экспрессируют только один антиген в парах C/c, E/e, Fya/Fyb, Jka/Jkb, M/N, S/s и не обладают антигенами A, B системы ABO, K (Kell) и Cw (Rh). Пример «особенного» фенотипа: A-, B-, D-, C-, c+, E-, e+, Cw-, K-, k+, Jk(a-b+), Fy(a+b-), M- N+, S-, s+. В нашем исследовании 15 из 327 доноров, типированных по 18 антигенам эритроцитов, имели «особенный» фенотип.

Высоко востребованными как при плановых, так и при экстренных переливаниях крови являются фенотипы CCDeeK- O, A, B групп крови и фенотип ccDEEK-O группы крови. В нашем исследовании 112 из 469 доноров обладали «высоко востребованными» фенотипами. «Универсальный» фенотип O ccddeeK- имели 58 доноров. «Обычный» фенотип – 299 доноров.

Мы проанализировали результаты сопоставления фенотипов 27 пациентов и 327 доноров эритроцитов, типированных по 18 антигенам. Установили достоверные различия в количестве реципиентов, совместимых с донорами, чей фенотип является «особенным» (me = 9 совместимых пациентов; min = 3; max = 12), и донорами, имеющими «обычный» фенотип (me = 4; min = 0; max = 12) (p ≤ 0,01).

На основании результатов исследования фенотипической совместимости 63 больных и 469 доноров, типированных по 10 антигенам эритроцитов, выявлены достоверные различия в количестве реципиентов, совместимых с донорами, фенотипы которых входят в группы «высоко востребованных» (me = 40; min = 17; max = 40), «универсальный» (me = 48; min = 48; max = 48) и «обычных фенотипов» (me = 17; min = 0; max = 24) (p ≤ 0,01).

**Выводы.** При формировании резерва долгосрочного хранения целесообразно отдавать предпочтение эритроцитам, обладающим «особенными», «универсальными» и «высоко востребованными» фенотипами.

Высочин И.В.<sup>1</sup>, Кван О.К.<sup>2</sup>, Смелянец С.В.<sup>2</sup>, Находкин Д.А.<sup>3</sup>, Судакова Л.В.<sup>3</sup>, Гаврилей А.В.<sup>4</sup>, Гончарская Г.С.<sup>4</sup>, Кочеткова М.А.<sup>4</sup>, Зараев А.А.<sup>5</sup>, Широков Д.В.<sup>5</sup>, Тураев Р.Г.<sup>6</sup>, Бачерикова Н.А.<sup>6</sup>, Хамитов Р.Г.<sup>7</sup>, Аюпова Р.Ф.<sup>7</sup>, Стрельникова Е.В.<sup>7</sup>, Павлова Е.А.<sup>7</sup>, Сухарева А.С.<sup>8</sup>, Власова Е.В.<sup>8</sup>, Никишина Т.А.<sup>9</sup>, Журавлев Д.М.<sup>9</sup>, Тюриков Ю.М.<sup>10</sup>, Силинг Е.В.<sup>10</sup>, Орлов А.М.<sup>11</sup>, Козлова Е.В.<sup>11</sup>, Чемакин Ю.А.<sup>12</sup>, Горячкина Т.А.<sup>12</sup>, Хватов В.Б.<sup>13</sup>

### ОПЫТ ПРОИЗВОДСТВА И КЛИНИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ КРИОКОНСЕРВИРОВАННЫХ ТРОМБОЦИТОВ В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

<sup>1</sup> ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России, Москва

<sup>2</sup> НМИЦ нейрохирургии им. академика Н.Н. Бурденко, Москва

<sup>3</sup> Владимирская ОСПК, Владимир

<sup>4</sup> Тюменская ОСПК, Тюмень

<sup>5</sup> «Республиканская станция переливания крови МЗ УР», Ижевск

<sup>6</sup> ГАУЗ «Республиканский центр крови МЗ РТ», Казань

<sup>7</sup> ГБУЗ «Республиканская станция переливания крови», Уфа

<sup>8</sup> БУ «Окружная клиническая больница», Ханты-Мансийск

<sup>9</sup> ЛПУ ГУ «РСПК», Сыктывкар

<sup>10</sup> «Ивановская областная станция переливания крови», Иваново

<sup>11</sup> ГАУЗ СО «ОСПК», Екатеринбург

<sup>12</sup> «Станция переливания крови», Сургут

<sup>13</sup> ГБУЗ «НИИ СП им. Н.В. Склифосовского ДЗМ»

**Введение.** Разработанная и запатентованная в РФ технология криоконсервирования тромбоцитов внедрена в производство в одиннадцати регионах РФ. По этой технологии двенадцать ЛПУ заготавливают и используют криоконсервированные тромбоциты (КТК) с 2012 года: НМИЦ нейрохирургии им. академика Н.Н. Бурденко (НХ), Владимирская ОСПК (Владимир), Тюменская ОСПК (Тюмень), «Республиканская станция переливания крови МЗ УР» (Ижевск), ГАУЗ «Республиканский центр крови МЗ РТ» (Казань), ГБУЗ «Республиканская станция переливания крови» (Уфа), БУ «Окружная клиническая больница» (Ханты-Мансийск), ЛПУ ГУ «РСПК» (Сыктывкар), «Ивановская областная станция переливания крови» (Иваново), ГАУЗ СО «ОСПК» (Екатеринбург), «Станция переливания крови» (Сургут), ГБУЗ «НИИ СП им. Н.В. Склифосовского ДЗМ» (Склиф).

**Цель работы.** Сравнить качество и клиническую эффективность криоконсервированных тромбоцитов, полученных на станциях и отделениях переливания крови одиннадцати регионов РФ с использованием единой технологии криоконсервации.

**Материалы и методы.** Заготовку и клиническое применение КТК проводили в двенадцати ЛПУ. Концентраты тромбоцитов (КТ) получали методом афереза. Криоконсервирование тромбоцитов проводили по единой запатентованной технологии в течение 24 часов с момента заготовки. Хранили размороженные тромбоциты при температуре от 20 до 240С и постоянном перемешивании не более 6 часов до трансфузии и переливали больным для коррекции тромбоцитопении.

**Результаты.** Качество КТ значительно не отличалось ни по объему, ни по количеству тромбоцитов. Объем КТ составил  $250 \pm 20$  мл, а количество тромбоцитов –  $255 \pm 30 \times 10^9$ /дозе. Объем заготовки КТК в разных ЛПУ значительно отличался и зависел от давности внедрения технологии криоконсервирования тромбоцитов и их потребности в ЛПУ. В НХ с 2020 по 2021 гг. получено 134 дозы КТК. Разморожено и перелито больным

42 дозы. Во Владимире с 2017 по 2020 гг. получено 1701 доза КТК. Разморожено и перелито больным 1505 доз. В Тюмени с 2017 по 2020 гг. получено 1194 дозы КТК. Разморожено и перелито больным 957 доз. В Ижевске с 2017 по 2020 гг. получено 121 доза КТК. Разморожено и перелито больным 81 доза. В Казани в 2020 гг. получено 193 дозы КТК. Разморожено и перелито больным 88 доз. В Уфе с 2018 по 2021 гг. получено 51 доза КТК. Разморожено и перелито больным 25 доз. В Ханты-Мансийске с 2018 по 2020 гг. получено 262 дозы КТК. Разморожено и перелито больным 206 доз. В Сыктывкаре с 2018 по 2021 гг. получено 79 доз КТК. Разморожено и перелито больным 36 доз. В Иваново с 2020 по 2021 гг. получено 60 доз КТК. Разморожено и перелито больным 20 доз. В Екатеринбурге с 2017 по 2020 гг. получено 183 доз КТК. Разморожено и перелито больным 128 доз. В Сургуте с 2020 по 2021 гг. получено 66 доз КТК. Разморожено и перелито больным 49 дозы. В Склифе с 2013 по 2020 гг. получено 1700 доз КТК. Разморожено и перелито больным 550 доз. Итого, за семь лет работы двенадцати ЛПУ, заготовлено 5744 лечебных дозы, а разморожено и перелито больным 3687 лечебных доз КТК. Сохранность тромбоцитов после размораживания во всех ЛПУ значительно не отличалась и составила  $85 \pm 5\%$ . Потребность в КТК значительно отличалась. В НХ, Склифе, Казани, Уфе и Ханты-Мансийске трансфузии КТК проводили больным хирургического профиля (90-100%). Напротив, в Иваново, Владимире, Ижевске основными потребителями КТК были онкогематологические больные (54-75%). В Екатеринбурге, Сургуте и Тюмени лечебные трансфузии КТК проведены больным как хирургического, так и онкогематологического профиля в равном объеме. После трансфузии КТК больным геморрагический синдром скорректирован, а посттрансфузионных осложнений не выявлено во всех ЛПУ. При этом скорректированный прирост тромбоцитов составил: через 1 час более 7500  $\text{м}^2/\text{мкл}$  и через 24 часа более 4500  $\text{м}^2/\text{мкл}$ .

**Заключение.** Показана высокая клиническая эф-

фективность КТК во всех ЛПУ. Выраженный клинический эффект обусловлен высоким качеством КТК. Высокие значения СПТ через 24 часа после окончания трансфузии позволяют судить о продолжении цир-

куляции донорских тромбоцитов в крови больных в течение суток.

*Глаз Е.В., Искров И.А., Усс А.Л.*

## **АНТИГЕННОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ГЛАВНОГО КОМПЛЕКСА ГИСТОСОВМЕСТИМОСТИ СРЕДИ РЕЦИПИЕНТОВ, РОДСТВЕННЫХ ДОНОРОВ И ДОНОРОВ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЦЕНТРАЛЬНОГО РЕЕСТРА**

*Государственное учреждение «Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии», Минск*

**Введение.** Современные тенденции в области трансплантации гемопоэтических стволовых клеток с высокими требованиями к донору (10/10 HLA-совместимость донора и реципиента, инфекционный статус, молодой возраст донора) требуют новых подходов к работе регистров. Существуют различные стратегии для привлечения не только большего числа потенциальных доноров гемопоэтических стволовых клеток (ГСК), но и увеличения разнообразия HLA-фенотипов. Частоты аллелей HLA-системы имеют специфичность для популяций, что ограничивает количество различных фенотипов, которые мы получаем при типировании новых потенциальных доноров.

**Цель:** провести анализ антигенного разнообразия в популяции доноров ГСК Центрального реестра, родственных доноров, пациентов.

**Материалы и методы.** В исследование были включены результаты HLA-типирования 216 пациентов, имеющие показания к проведению аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток, 289 родственных доноров, 27885 фенотипов доноров ГСК Центрального реестра Республики Беларусь.

Тканевое типирование по HLA-системе пар донор-реципиент выполнялось на базе лаборатории HLA-типирования ГУ «Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии». Первичное типирование сиблинга и пациента проводилось по A, B и DRB1 локусам, при совпадении антигенов данных локусов пациента и родственного донора проводилось дополнительное типирование по локусам C и DQB1. Подтверждающее типирование пары донор-реципиент осуществлялось высоким разрешением. Учитывая широкий полиморфизм генов главного комплекса гистосовместимости, нами было принято, что при частоте встречаемости антигена менее 1,0% антиген относился к редким.

**Результаты.** По результатам проведенного анализа в Республике Беларусь для потенциальных доноров гемопоэтических стволовых клеток Центрального реестра редкими антигенами являются:

1- для локуса A: A\*34, A\*36, A\*39, A\*43, A\*66, A\*68, A\*69, A\*74, A\*80;

2- для локуса B: B\*37, B\*42, B\*45, B\*46, B\*47, B\*48, B\*50, B\*53, B\*54, B\*55, B\*58, B\*63, B\*64, B\*67, B\*70, B\*72, B\*73, B\*75, B\*78;

3- для локуса DRB1: DRB1\*9 и DRB1\*10.

Для пациентов редкими антигенами являются:

1- в локусе A: A\*66;

2- в локусе B: B\*37, B\*45, B\*47, B\*48, B\*50, B\*55, B\*58, B\*64;

3- для локуса DRB1: DRB1\*9 и DRB1\*10.

В фенотипах родственных доноров редкие антигены представлены:

1- для локуса A: A\*66;

2- для локуса B: B\*37, B\*45, B\*47, B\*48, B\*49, B\*50, B\*55, B\*58, B\*64;

3- для локуса DRB1: DRB1\*9 и DRB1\*10.

**Выводы.** 1. Выявленные нами редкие антигены в фенотипах доноров ГСК Центрального реестра встречаются в 14,39% случаев и распределение этих антигенов внутри структуры фенотипа различно. 2. В группе из 216 пар донор (сиблинг)-реципиент идентичность по системе HLA определялась в 38,4% (83 пары) случаев. 3. Частота совпадений пациента и сиблинга в паре, где имеется только один потенциальный родственный донор, составила 36,2%, в то время как в парах, где имеется более одного потенциального родственного донора - 45,2%. 4. В ходе сравнительного анализа пациентов и сиблингов было выявлено, что различия в частоте встречаемости антигенов в фенотипах между пациентами и сиблингами статистически незначимые. Различия в фенотипах пациентов и доноров ГСК Центрального реестра выявлены в частоте встречаемости следующих антигенов: A33 ( $p=0,001$ ), A68 ( $p<0,001$ ), B15 ( $p<0,001$ ), B40 ( $p<0,001$ ). Среди сиблингов и доноров ГСК Центрального реестра антигенные различия в частоте выявлены по A26 ( $p=0,045$ ), A68 ( $p<0,001$ ), B14 ( $p=0,026$ ), B15 ( $p<0,001$ ), B40 ( $p<0,001$ ). Наличие данных фенотипических различий подтверждает обоснованность включения сиблингов в базу Центрального реестра с целью увеличения антигенного разнообразия доноров.

*Головкина Л.Л., Каландаров Р.С., Пшеничникова О.С., Сурин В.Л., Стремоухова А.Г.,  
Пушкина Т.Д., Атрощенко Г.В., Хасигова Б.Б.*

### ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ СИСТЕМЫ АВО У РОССИЯН

*Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения России, Москва*

**Введение.** Существующий полиморфизм клинически значимых антигенов эритроцитарных систем, в том числе системы АВО, обусловлен многообразными мутациями генов (миссенс-мутации, делеции и др.). Знание молекулярных основ формирования и распределения аллельных вариантов генов системы АВО, как и других антигенных систем эритроцитов, необходимо для прогнозирования характера и частоты возникновения потенциальных проблем в практической трансфузиологии и иммуногематологии.

**Цель.** Описать варианты аллелей генов системы АВО у россиян и дать серологическую характеристику кодируемых ими антигенов.

**Материалы и методы.** Материалом исследований являлись эритроциты 175 человек с проблемами в определении группы крови системы АВО, которым было проведено молекулярное исследование генов системы АВО. Группу крови определяли методом агглютинации на плоскости с применением цоликлонов анти-А, анти-АсЛ, анти-В и лектина (анти-А1), а также гелевым методом с применением гелевых карт. Генетическое типирование проводилось методом прямого секвенирования по Сэнгеру и методом полимеразной цепной реакции с секвенс-специфическими праймерами (ПЦР-ССП).

**Результаты.** Исследование на молекулярном уровне было выполнено 175 индивидуумам: 105 – прямое секвенирование гена АВО, 70 – только полимеразной цепной реакцией с секвенс-специфическими праймерами (ПЦР-ССП), 49 из 105 – двумя методами. Генотипы обследованных лиц с группами крови А и АВ (151 человек) без расшифровки аллелей были такими: А1А1 – у 6 человек, А1А2 – у 1, А1О – у 17, А1В1 – у 10, А2О – у 83, А2В1 – у 27, Аw.06О – у 4, Аw.06В – у 1, АхО – у 1 и АхО – у 1. У 14 обследованных была определена группа крови В: В1В1 – у 1 человека и В1О – у 13 человек. Группу крови О выявили у 10 человек.

О-аллели были идентифицированы у 128 человек, в том числе у гетерозигот в сочетании с разными вариантами антигена А (106 человек) и антигена В (13 человек), а также у 9 человек с группой крови О (18 аллелей), т. е. всего 137 аллелей. Обнаружено 13 вариантов О-аллеля, из них десять делеционных аллелей и три недеletionные аллеля из группы О.02: АВО\*О.02.01, АВО\*О.02.02 и АВО\*О.02.03. Наиболее часто встречался

референсный аллель АВО\*О.01.01 (94, или 68,61 %), реже аллели АВО\*О.01.02 (8, или 5,84 %), АВО\*О.01.11 и АВО\*О.01.26 (по 7, или по 5,11 %), АВО\*О.01.12 и недеletionный аллель АВО\*О.02.01 (по 6, или по 4,38 %), АВО\*О.01.13 и АВО\*О.01.44 (по 2 или по 1,46 %). Остальные аллели с характерной делецией (АВО\*О.01.05, АВО\*О.01.46 и АВО\*О.01.68), а также два недеletionных аллеля (АВО\*О.02.02 и АВО\*О.02.03) были выявлены каждый в одном случае (по 0,73 %).

У 151 человека с учетом гомозигот идентифицированы 157 А-аллелей, при этом обнаружены 8 различных А-аллелей. По результатам прямого секвенирования определили 34 референсных аллеля АВО\*А1.01 и 6 аллелей АВО\*А1.02. Самым частым из аллелей, ослабляющих экспрессию антигена А, оказался классический аллель АВО\*А2.01: 102 из 117 (87,18 %). Остальные аллели встречались значительно реже: АВО\*А2.06 – 6 (5,14 %), АВО\*Аw.06 – 5 (4,27 %), АВО\*А2.05 и АВО\*А2.09 – по 1 (по 0,85 %). В 2 случаях в реакции полимеразной цепной реакции с секвенс-специфическими праймерами (ПЦР-ССП) был идентифицирован аллель АВО\*Ах. Аллели АВО\*А1.01 и АВО\*А1.02 фенотипически проявлялись как антиген А1 (в двух случаях при генотипе АВО\*А1.01 В.01.01 определялся антиген А2). Аллели АВО\*А2.01 и аллель АВО\*А2.09 серологически проявлялись как А2. При аллеле АВО\*А2.05 выявлен А3. Из 6 случаев с аллелем АВО\*А2.06 в 1 случае определен А1, в 2-х случаях – А3, в 3-х случаях – А2. У обследованных с аллелями АВО\*Аw.06 и АВО\*Ах экспрессия антигена А была очень слабой.

У 51 человека были определены 52 В-аллеля, выявлено 3 различных В-аллеля: АВО\*В.01.01 – 50, АВО\*В.01.02 и АВО\*В.01.08 – по 1. Экспрессия антигена В во всех случаях была одинаковой.

**Выводы.** Доказана значительная выраженность полиморфизма генов системы АВО среди россиян. В практической работе заподозрить присутствие антигена А с ослабленной экспрессией можно в серологических методах при появлении мелкой или смешанной агглютинации с цоликлонами или при расслоении эритроцитов в геле, что может стать поводом для генетического типирования. Современные молекулярные методы позволяют идентифицировать редкие аллели генов и генотипы.

*Головкина Л.Л., Каландаров Р.С., Пшеничникова О.С., Сурин В.Л., Стремоухова, Т.Д.,  
Пушкина А.Г., Атрощенко Г.В., Хасигова Б.Б.*

### ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ СИСТЕМЫ РЕЗУС У РОССИЯН

*Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения России, Москва*

**Введение.** Система Резус – вторая по значимости для практической трансфузиологии антигенная си-

стема эритроцитов. Изучение существующих аллелей генов системы Резус позволит успешно выявлять ва-

рианты резус-антигенов с ослабленной экспрессией и предупреждать посттрансфузионные осложнения, связанные с несовместимостью по данной системе.

**Цель.** Исследовать полиморфизмы генов RHD и RHCE и дать серологическую характеристику ослабленных вариантов кодируемых ими антигенов.

**Материалы и методы.** Материалом исследований являлись эритроциты 213 человек с ослабленным антигеном RhD, которым было выполнено генетическое типирование, и 9 человек, у которых определяли полиморфизмы гена RHCE. Серологическое определение слабых и парциальных вариантов антигена RhD проводили 5 методами: метод агглютинации на плоскости с Цоликлоном анти-D супер, реакция агглютинации в солевой среде, гелевый метод с Цоликлонами, непрямой антиглобулиновый тест, непрямой антиглобулиновый тест в гелевом методе с применением гелевых карт. Определение других антигенов системы Резус проводили методом агглютинации на плоскости с Цоликлонами анти-C супер, анти-Cw супер, анти-c супер, анти-E супер, анти-e супер и в гелевом методе с гелевыми картами. Молекулярное исследование осуществляли методом полимеразной цепной реакции (с секвенс-специфическими праймерами (ПЦР-ССП) для гена RHD и с аллель-специфическими праймерами (ПЦР-АСП) для гена RHCE) и методом прямого секвенирования по Сэнгеру.

**Результаты.** У двух человек со слабым антигеном RhD были обнаружены аллели RHD\*DNB и RHD\*DVII, кодирующие парциальные варианты RhD – RhDNB (серологически определенный фенотип – CCDwee) и RhDVII (серологически был установлен редкий фенотип CCDwEe, в сыворотке крови обнаружены антитела анти-D). Заподозрить присутствие парциальных антигенов RhD можно по расхождению результатов двух серологических методов: слабая агглютинация или химера с Цоликлоном на плоскости и сильная реакция в гелевом методе.

У 211 человек были определены 12 различных аллелей гена RHD, кодирующих ослабленные варианты антигена RhD: RHD weak type 1 (54 случая), RHD weak type 2 (25 случаев), RHD weak type 3 (119 случаев), RHD weak type 4.2 (DAR) (2 случая), RHD weak type 6 (1 слу-

чай) RHD weak type 15 (3 случая), RHD weak type 67 (1 случай), RHD weak type G255R (1 случай), RHD weak type 122 (1 случай), RHD weak type IVS5-38del4 (1 случай), RHD\*Dpxi (2 случая) и новый ген RHD\*423delGAT (1 случай). В серологических исследованиях слабый антиген RhD weak type 1 во всех случаях сочетался с фенотипом CcDwee, как и варианты RhD weak type G255R, RhD weak type 122 и RhD weak type IVS5del4; вариант RhD weak type 3 в 17 из 19 случаев также сочетался с этим фенотипом (в 2 случаях выявлены фенотипы ccDwee и CCDwee). Антигены RhD weak type 2, RhD weak type 15 и RhD weak type 67 сочетались с фенотипом CcDwEe, антиген RhD weak type 4.2 (DAR) – с фенотипом ccDwee. Варианты RhD weak type 2, RhD weak type 15, RhD weak type 67, RhD weak type G255R и RhD weak type IVS5del4 не реагировали с Цоликлоном анти-D на плоскости (RhD weak type 15 выявлялся только в классическом непрямом антиглобулиновом тесте и в гелевом непрямом антиглобулиновом тесте), RhD weak type 122 показывал мелкую пылевидную агглютинацию. Наиболее эффективными методами определения слабых вариантов антигена RhD были классическая непрямо-проба Кумбса и непрямо-проба Кумбса в геле. Антиген, кодируемый геном RHD\*423delGAT, серологически не выявляется ни в одном методе (фенотип Ccdee).

Из 9 человек, у которых изучали полиморфизмы гена RHCE, у пятерых был обнаружен ген RHCE\*Cw (в 3 случаях фенотипы CwCDee, в 2 случаях фенотипы CwCDee). У 2 человек прямым секвенированием был выявлен аллель RHCE\*Ce.09, кодирующий антиген RhCx (при этом методом ПЦР-ССП был определен обычный ген RHCE\*C), серологически были установлены фенотипы CcDee и CcDEe (но эритроциты не реагировали с Цоликлоном анти-C на плоскости). Еще у 2 человек с фенотипами CucDEe (экспрессия RhC ослаблена) и Ccdee молекулярное исследование определило обычный ген RHCE\*C.

**Выводы.** Полиморфизм генов RHD и RHCE среди россиян значительно выражен. Варианты слабых и парциальных вариантов антигенов RhD и RhC могут быть установлены только при молекулярно-генетическом исследовании.

*Киселева А.Н., Бутина Е.В., Исаева Н.В.*

## **АССОЦИАЦИЯ ГЕНОВ СИСТЕМЫ HLA КЛАССА II С ПАТОЛОГИЕЙ СПЕРМАТОГЕНЕЗА**

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

**Введение.** Бесплодие является одной из нерешенных проблем современной медицины и характеризуется снижением или отсутствием способности к воспроизведению потомства. Бесплодный брак – ненаступление беременности в течение одного года регулярной половой жизни без применения контрацептивных средств. В настоящее время доля бесплодных супружеских пар достаточно стабильна и не имеет тенденции к снижению. Внимание врачей и научного сообщества сосредоточено на углубленном изучении множества факторов,

вызывающих нарушение фертильности. Особое место среди них занимают гены системы HLA. Одной из ее важнейших функций, которая тесно связана с контролем иммунного ответа, является участие в репродуктивных процессах. Мужское бесплодие может быть связано с патоспермией, эякуляторными, сексуальными, анатомическими, эндокринными, воспалительными, иммунологическими и другими причинами. В структуре бесплодного брака оно составляет до 40%, и ему необходимо уделять такое же пристальное внимание, как



и женскому.

**Цель.** Изучить частоту распределения аллельных вариантов генов системы HLA класса II у мужчин с патологией сперматогенеза.

**Материалы и методы.** Определение генов системы HLA класса II осуществлено у 29 мужчин с астенозооспермией (снижение концентрации подвижных сперматозоидов), 7 – с олигоастенозооспермией (снижение подвижности и концентрации сперматозоидов) и у 50 – с нормальной фертильностью (группа сравнения). Идентификация аллельных вариантов генов системы HLA класса II (DRB1\*, DQA1\*, DQB1\*) выполнена методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с использованием реактивов и оборудования

фирмы «ДНК-Технология», Россия.

**Результаты.** Установлено, что у мужчин с астенозооспермией ген DRB1\*04 выявлялся достоверно чаще, чем в группе сравнения (37,9% (11/29) против 16,0% (8/50);  $\chi^2=4,8$ ;  $p<0,05$ ). Ген DRB1\*13 характерен для мужчин с олигоастенозооспермией (57,1% (4/7) против 18,0% (9/50);  $\chi^2=5,3$ ;  $p<0,05$ ). Достоверных различий в частотах распределения других генов системы HLA класса II не получено.

**Выводы.** Таким образом, на основании анализа результатов проведенного исследования можно заключить, что наличие в генотипе мужчины DRB1\*04 и DRB1\*13 коррелирует с нарушением сперматогенеза.

*Киселева А.Н., Бутина Е.В., Исаева Н.В., Попонина Е.А.*

### СВЯЗЬ HLA-ГЕНОВ С ПРИВЫЧНЫМ НЕВЫНАШИВАНИЕМ БЕРЕМЕННОСТИ

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

**Введение.** Система антигенов главного комплекса гистосовместимости человека (HLA) обеспечивает контроль, запуск и реализацию иммунного ответа, взаимодействие всех иммунокомпетентных клеток организма, распознавание своих и чужеродных элементов, а также измененных собственных клеток. Полиморфизм генов главного комплекса гистосовместимости играет важную роль в нормальном течении беременности. Риск ранних потерь плода и бесплодие, возможно, ассоциированы с присутствием определенных аллелей HLA, а также с совпадением супругов по нескольким генам HLA. В литературе имеются сведения о возможной корреляции между невынашиванием беременности и аутоиммунными процессами, связанными со специфическими HLA-аллелями.

**Цель.** Изучить частоту встречаемости генов системы HLA класса II у женщин и мужчин из супружеских пар с привычным невынашиванием беременности.

**Материалы и методы.** Идентификация генов системы HLA класса II выполнена у 24 женщин и 24 мужчин в супружеских парах с привычным невынашиванием беременности (3 и более самопроизвольных прерывания беременности), 50 женщин и 50 мужчин с нормальной фертильностью (группа сравнения). Типирование аллельных вариантов генов системы HLA класса II (DRB1\*, DQA1\*,

DQB1\*) осуществляли методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с наборами для молекулярно-генетического тестирования «HLA-DRB1», «HLA-DQA1», «HLA-DQB1» («ДНК-Технология», Россия).

**Результаты.** Определены ассоциативные связи HLA-специфичностей с фертильными нарушениями. В группе сравнения достоверно чаще, чем в группе женщин с привычным невынашиванием беременности, выявлялись гены DRB1\*08 (18,0% против 0%;  $\chi^2=4,9$ ;  $p<0,05$ ), DQA1\*04:01 (16,0% против 0%;  $\chi^2=4,3$ ;  $p<0,05$ ) и DQB1\*04:01/04:02 (16,0% против 0%;  $\chi^2=4,3$ ;  $p<0,05$ ). У мужчин из группы с репродуктивными нарушениями статистически чаще, чем в группе сравнения, регистрировался ген DQB1\*03:02 (33,3% против 12,0%;  $\chi^2=4,8$ ;  $p<0,05$ ). Достоверных различий в частоте встречаемости гомологичных аллелей у супругов с репродуктивными нарушениями и в группе сравнения не установлено.

**Выводы.** Таким образом, наличие у женщин HLA-генов DRB1\*08, DQA1\*04:01, DQB1\*04:01/04:02 ассоциировано с нормальным гестационным процессом, присутствие у мужчин гена DQB1\*03:02 предрасполагает к привычному невынашиванию беременности в супружеской паре.

*Ключников Д.Ю.<sup>1</sup>, Вавилов М.Н.<sup>2</sup>, Макаренко О.А.<sup>3</sup>, Логинова М.А.<sup>4</sup>, Трусова Л.М.<sup>1</sup>, Волчков С.Е.<sup>5</sup>, Сулова Т.А.<sup>2</sup>, Тюмина О.В.<sup>1,6</sup>, Гайфуллина Р.Ф.<sup>7,8</sup>*

### РАЗЛИЧИЯ В ПРОФИЛЯХ АЛЛЕЛЕЙ HLA-A, -B, -DRB1 У ТАТАР РОССИИ

<sup>1</sup>Государственное бюджетное учреждение здравоохранения «Самарский областной медицинский центр Династия», г.Самара

<sup>2</sup>Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Челябинский государственный университет», Челябинск

<sup>3</sup>Благотворительный фонд «Национальный регистр доноров костного мозга имени Васи Перевощикова», г.Москва

<sup>4</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г.Киров

<sup>5</sup>Некоммерческое партнерство «Регистр доноров кроветворных клеток и публичных банков пуповинной крови», г.Самара

<sup>6</sup>Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Самарский

государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Самара  
<sup>7</sup>Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет», г. Казань  
<sup>8</sup>Автономная некоммерческая организация «Приволжский регистр доноров костного мозга», г. Казань

**Введение.** Российская Федерация – многонациональное государство, на территории которого проживает более 146 млн человек, представляющие более 200 различных национальностей. Около 80% всего населения составляют русские, на втором месте по численности находятся татары (>3%). Этническая группа татары включает в себя два субэтноса: Казанские (Волжские татары) и Уральские татары (Татары-мишари). Согласно данным переписи населения 2010 года татары составляют 4,1% жителей Самарской области, 5,4% жителей Челябинской области, 53,2% жителей Татарстана, 2,7% жителей Кировской области и 25,4% жителей республики Башкортостан.

**Цель.** Целью настоящего исследования является изучение частот встречаемости аллелей HLA-A, -B, -DRB1 у татар Самарской, Челябинской, Кировской областей, республик Татарстан и Башкортостан.

**Материалы и методы.** В анализ были включены данные HLA-типирования по локусам HLA-A, B, DRB1 в низком разрешении 200 доноров ГСК регистра Челябинской областной станции переливания крови, 59 единиц пуповинной крови и 110 доноров ГСК Самарского регистра, 119 доноров Приволжского регистра доноров костного мозга, проживающих в Казани, 205 доноров из Кировской области и 374 донора из республики Башкортостан регистра КНИИГиПК ФМБА России, самоопределившихся как татары и постоянно проживающих в указанных регионах. Частоты встречаемости HLA-аллелей были рассчитаны с использованием ПО Arlequin 3.5. Для оценки достоверности различий был использован метод оценки критерия Пирсона  $\chi^2$  ( $p < 0.05$ ) с поправкой Йейтса.

**Результаты.** В ходе исследования были выявлены достоверные отличия в частотах встречаемости некоторых аллелей. Частота встречаемости HLA-A\*02 в популяциях татар Самарской области (21,2%), Татарстана (23,4%) и Башкортостана (24,7%) достоверно ниже, чем в популяциях Челябинской (29,6%) и Кировской областей (31,6%). Частота встречаемости HLA-A\*23 (4,2%) Самарской

области достоверно выше, чем у татар Челябинска (1,3%), Башкортостана (2,3%) и Кировской области (1,2%).

Среди аллельных вариантов локуса В достоверные отличия в частотах встречаемости выявлены в отношении HLA-B\*27 между популяциями татар Татарстана и Кировской области (7,0% против 3,0%); в отношении HLA-B\*38 – между татарами Самарской области (1,5%) и татарами Татарстана и Башкортостана (4,3% и 4,5%, соответственно). Аллельный вариант HLA-B\*40 встречается чаще у татар Татарстана (7,0%), Башкортостана (6,1%) и Кировской области (6,0%), чем у татар Самарской области (3,0%), а HLA-B\*44 наоборот встречается чаще у татар Самарской области (14,0%), чем у татар Татарстана (8,3%), Челябинской (8,1%) и Кировской областей (7,1%). Достоверно частота встречаемости HLA-B\*58 выше у татар Самарской области (3,9%), чем у татар Кировской области (1,0%).

Среди аллельных вариантов локуса DRB1 достоверно значимые отличия в распределении частот встречаемости выявлены для HLA-DRB1\*04 – частота встречаемости у татар Башкортостана составляет 13,5%, в то время как у татар Кировской области – 9,2%; для HLA-DRB1\*07 – частота встречаемости у татар Кировской области составляет 22,5%, а у татар Башкортостана и Самарской области – 15,2% и 15,0%, соответственно. HLA-DRB1\*11 встречается достоверно чаще у татар Татарстана (16,5%), чему у татар Челябинской области (8,1%), Башкортостана (10,0%) и Кировской области (8,1%). HLA-DRB1\*14 встречается достоверно реже у татар Самарской области (0,6%), чем у татар Татарстана (3,4%), Челябинской области (3,0%), Башкортостана (2,2%) и Кировской области (4,2%).

**Выводы.** В ходе анализа татарских популяций Самарской, Челябинской, Кировской областей, республик Татарстан и Башкортостан выявлены достоверные отличия в частотах встречаемости аллельных групп HLA-A\*02, HLA-A\*23, HLA-B\*27, HLA-B\*38, HLA-B\*40, HLA-B\*44, HLA-B\*58, HLA-DRB1\*04, HLA-DRB1\*07, HLA-DRB1\*11, HLA-DRB1\*14.

**Кутявина С., Махова О.А., Смирнова Д.Н., Обухов И.П., Логинова М.А., Парамонов И.В.**

## **ИДЕНТИФИКАЦИЯ ДВУХ НОВЫХ HLA-АЛЛЕЛЕЙ – HLA-DRB1\*14:223 И HLA-DQB1\*03:01:49 У ОДНОГО ИНДИВИДУМА**

ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови ФМБА России»

**Введение.** Человеческие лейкоцитарные антигены являются наиболее полиморфными локусами в геноме человека. По данным международного Комитета по номенклатуре факторов HLA-системы ВОЗ, на декабрь 2020 года HLA-локусы представлены 28 938 аллелями. Что в последние несколько лет увеличение

количества известных аллелей HLA-локусов носит лавинообразный характер, что связано не только с увеличением числа изученных мировых популяций, но и с развитием методов HLA-типирования, позволяющих выявлять единичные нуклеотидные замены в различных структурных элементах HLA-генов.

**Цель.** Идентификация двух новых HLA-аллелей, выявленных у бурята, рекрутированного в Иркутской области.

**Материалы и методы.** В исследование включено 956 образцов цельной крови, полученных от взрослых индивидуумов, идентифицирующих себя бурятами, рекрутированных на территории Иркутской области.

Препараты ДНК выделены из замороженных образцов цельной крови (антикоагулянт – К3EDTA в концентрации 2 мг/мл) методом колоночной фильтрации с применением наборов QIAamp DNA Blood Mini Kit («QIAGEN GmbH», Германия). Концентрацию ДНК измеряли на амплификаторе нуклеиновых кислот QuantStudio 5 («Life Technologies», Сингапур), затем образцы нормализовали деионизированной водой до концентрации 10 нг/мкл.

HLA-типирование по локусам HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1, HLA-DQB1 проводили в разрешении 2-field по технологии NGS с использованием набора реагентов VariFind™ HLA Solution IL-v2 (ООО «ПАРСЕК ЛАБ», Россия), массовое параллельное секвенирование проводили на приборе MiSeq™ System («Illumina Inc.», США). Анализ полученных данных осуществляли с использованием программного обеспечения PARAllele™ HLA Software v.1 (ООО «ПАРСЕК ЛАБ», Россия) в автоматическом режиме.

Подтверждение выявленных новых аллелей выполнено по технологии SBT с использованием наборов реагентов HLAAssure SE SBT Kit (TBG Diagnostics Limited, Тайвань). Экзоны 1-3 локуса HLA-DRB1 и экзоны 2-3 локуса HLA-DQB1 амплифицировали с помощью полимеразной цепной реакции и секвенировали на генетическом анализаторе 3730 (Thermo Fisher Scientific, США). Полученные последовательности анализировали в программном обеспечении AccuType™ (Texas Bio GeneInc, США).

**Результаты.** В результате проведенного исследования 956 образцов геномной ДНК, полученных от бурят, рекрутированных на территории Иркутской об-

ласти, в образце № 54107 выявлены сразу два аллеля по локусам HLA-DRB1 и -DQB1, ранее не зарегистрированных международным Комитетом по номенклатуре факторов HLA-системы ВОЗ.

Нуклеотидная последовательность аллеля HLA-DRB1\*14:223 отличается от аллеля DRB1\*14:03:01 одной нуклеотидной заменой в позиции 508 экзона 3, что приводит к несинонимичной замене кодона 141 с глицина (GGG) на триптофан (TGG). Последовательность аллеля HLA-DQB1\*03:01:49 отличается от HLA-DQB1\*03:01:01 одной однонуклеотидной заменой (G → A) в экзоне 2 в положении 315.

Полный HLA-генотип индивидуума 54107 с двумя новыми аллелями следующий: HLA-A\*02:01, 03:01; -C\*03:04, 12:02; -B\*40:02, 52:01; -DRB1\*14:223, 15:02/15:140/15:149; -DQB1\*03:01:49, 06:01. Номера данным аллелям присвоены в мае 2020 года международным Комитетом по номенклатуре факторов HLA-системы ВОЗ.

Для установления принадлежности обоих аллелей одному гаплотипу проведено HLA-типирование двух сиблингов индивидуума № 54107, один № 64225 из которых имел генотип, полностью совпадающий с генотипом донора № 54107, второй № 64531 – был гаплотидентичен. Полный HLA-генотип индивидуума № 64531: HLA-A\*03:01, 68:01; -C\*07:68, 12:02; -B\*44:02, 52:01; -DRB1\*11:01, 15:02/15:140/15:149; -DQB1\*03:01, 06:01. Это позволило отнести оба новых аллеля одному гаплотипу.

**Выводы.** Выявление двух новых аллелей в относительно не большой выборке образцов, подтверждает необходимость использования современных молекулярно-генетических методов анализа при проведении HLA-типирования популяций потенциальных доноров ГСК. Подтверждение наследования выявленных новых аллелей свидетельствует о целесообразности расширения пула доноров из данного региона Российской Федерации.

*Леонов Е.А., Хамаганова Е.Г., Абдрахимова А.Р., Хижинский С.П., Гапонова Т.В.*

### HLA-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ДИСТАНЦИИ МЕЖДУ РОССИЙСКИМИ ДОНОРАМИ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТОК РАЗЛИЧНОГО ЭТНИЧЕСКОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ, ТИПИРОВАННЫМИ С ВЫСОКИМ РАЗРЕШЕНИЕМ

*Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации*

**Введение.** Высокий полиморфизм генов системы HLA затрудняет подбор совместимого донора для пациентов с заболеваниями системы крови, которым показана трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ГСК). Информация о вариантах HLA-генов в популяциях разных географических регионов, о HLA-генетических дистанциях между популяциями способствует более успешному подбору донора для трансплантации ГСК.

**Цель.** Провести анализ генетических дистанций (g.d.) по генам HLA между донорами ГСК базы данных ФГБУ «НМИЦ Гематологии» Минздрава России, само-

определившимися как русские, донорами-татарами, донорами-башкирами, а также некоторыми другими российскими и зарубежными популяциями, о которых имеются сведения в открытой печати.

**Материалы и методы.** В исследование включено 1510 потенциальных доноров ГСК регистра ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, самоопределившиеся как русские, 192 доноров-татар, 120 доноров-башкир. Выделение геномной ДНК из образца периферической крови донора производили с помощью наборов QIAamp DNA Blood Mini Kit и автоматизированной системы выделения ДНК QIAcube (Qiagen,

ФРГ). HLA типирование проводили методом NGS с использованием наборов AllType NGS Amplification Kits (One Lambda, США) и GenDx (Нидерланды). Таргетное обогащение проводили с помощью локус-специфической амплификации. Дальнейшая постановка включала эквимольное пулирование ампликонов, ферментативную фрагментацию и лигирование адаптеров, очистку и выбор размера полученных фрагментов, индексирующую ПЦР, финальное пулирование и измерение библиотек. Анализ полученных в результате секвенирования последовательностей HLA-генов проводили при помощи компьютерной программы TypeStream Visual Software (TSV) (One Lambda, США), версия V2.0.0.68 (IPD-IMGT/HLA 3.40.0.1.). Для анализа генетических дистанций было привлечено 8 популяций, включая доноров базы данных ФГБУ НМИЦ Гематологии Минздрава России, которые самоопределились как русские, башкиры и татары, 3 российские популяции, исследованные коллективом авторов из ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России. Также были включены две зарубежные популяции, это поляки и турки. Критерием включения популяции в анализ были данные HLA генов по высокому разрешению, численность популяции > 120 индивидуумов, сумма частот по каждому HLA – гену равна 1. Расчет генетических дистанций и построение филогенетических деревьев, полученных на основании частот групп HLA-аллелей, проводили по методу Нея с помощью программы Phylip 3.695.

**Результаты.** Доноры ГСК базы данных ФГБУ «НМИЦ Гематологии» Минздрава России, самоопределившиеся как русские, наиболее близки по своему генетическому разнообразию к полякам (варшавянам) (g.d.= 0,160). Дальше отстоят татары (g.d.= 0,423) и башкиры (g.d.= 0,864). Более отдаленными от иссле-

дуемой популяции русских были турки (g.d.= 1,135) и чеченцы (g.d.= 1,490). Из российских популяций наибольшее генетическое расхождение у доноров-русских наблюдалось с бурятами из Иркутской области и калмыками (g.d. 2,145 и 2,217 соответственно). На филогенетическом дереве отмечена незначительная длина ветвей расположения восточнославянского (русские) и западнославянского (поляки) народов. Ветвь тюркских народов (татары, турки и башкиры) отходит из одного узла филогенетического дерева. Филогенетическая ветвь, на которой располагаются чеченцы – народ Северного Кавказа, относящийся к нахско-дагестанских языков, отпочковывается из единого узла с популяциями Европы и Азии. Своеобразие популяции выражена значительной длиной ветви, на которой располагается популяция чеченцев. Максимально отдаленная от русских монгольская ветвь берет начало из единого узла дерева и представлена популяциями северных (буряты) и западных (калмыки) монгольских групп.

**Выводы.** HLA-генетические дистанции между включенными в исследование популяциями, типированными на уровне высокого разрешения, а также расположение популяций на филогенетическом дереве, в основном совпадают с данными, полученными ранее для популяций, типированных на уровне низкого разрешения. Российские популяции иного этнического происхождения отстоят от русских по аллелям HLA-генов дальше, чем популяция поляков. Наблюдаемое генетическое разнообразие российских популяций разного этнического происхождения говорит о необходимости привлекать в российские регистры доноров различной этнической принадлежности из различных регионов России.

*Леонов Е.А., Хамаганова Е.Г., Абдрахимова А.Р., Хижинский С.П., Гапонова Т.В.*

## **ЧАСТОТА АЛЛЕЛЕЙ HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1 ГЕНОВ И СТРУКТУРА АЛЛЕЛЬНОГО РАЗНООБРАЗИЯ У ДОНОРОВ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК РЕГИСТРА ФГБУ «НМИЦ ГЕМАТОЛОГИИ» МИНЗДРАВА РОССИИ, САМООПРЕДЕЛИВШИХСЯ КАК РУССКИЕ**

*Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации*

**Введение.** Трансплантация аллогенных гемопоэтических стволовых клеток является эффективным методом лечения многих тяжёлых гематологических заболеваний. Подбор совместимого HLA-донора затруднён из-за высокого полиморфизма HLA-генов. Вероятность найти HLA-совместимого неродственного донора варьирует в зависимости от частоты встречаемости HLA-аллелей и гаплотипов в данной популяции, поэтому в России необходимо развивать регистры добровольных, анонимных, безвозмездных доноров гемопоэтических стволовых клеток (ГСК), HLA-типированных с максимально возможным разрешением.

**Цель.** Анализ распределения HLA-аллелей у до-

норов ГСК базы данных ФГБУ «НМИЦ Гематологии» Минздрава России, самоопределившихся как русские.

**Материалы и методы.** В исследование включено 1510 потенциальных доноров ГСК регистра ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, самоопределившиеся как русские. Выделение геномной ДНК из образца периферической крови донора производили с помощью наборов QIAamp DNA Blood Mini Kit и автоматизированной системы выделения ДНК QIAcube (Qiagen, ФРГ). HLA типирование проводили методом NGS с использованием набора AllType NGS Amplification Kits (One Lambda, США). Анализ полученных в результате секвенирования последова-

тельностью HLA-генов проводили при помощи компьютерной программы TypeStream Visual Software (TSV) (One Lambda, США), версия V2.0.0.68 (IPD-IMGТ/HLA 3.40.0.1.) Частоты HLA-аллелей и соответствие наблюдаемого распределения равновесию Харди-Вайнберга определяли с помощью программного обеспечения Arlequin 3.5 методом максимального правдоподобия с использованием алгоритма максимизации ожидания.

**Результаты.** При полногеном секвенировании генов HLA класса I выявлено 82 аллеля HLA-A, 156 аллелей HLA-B, 85 аллелей HLA-C (на уровне 4-го поля). Типирование по II классу HLA выявило 45 аллелей HLA-DRB1 и 18 аллелей HLA-DQB1 (на уровне 2-3 полей). Несмотря на большое разнообразие аллелей гена HLA-A, выявлено всего три аллеля с частотой более 10% (кумулятивная частота 51,7%) – A\*02:01:01:01 (27,1%), A\*03:01:01:01 (13,0%) и A\*01:01:01:01 (11,6%). Двенадцать аллелей с частотой от 1 до 10% охватывали еще 38,6%, 26 HLA-A аллелей с частотой встречаемости 0,1-1% имели кумулятивную частоту 7,6%. Редко встречаемые аллели (менее 0,1%) составляли группу из 41 аллеля (кумулятивная частота равнялась всего 2,1%). Среди аллелей HLA-B только один аллель имел частоту более 10% – B\*07:02:01:01 (12,9%). С частотой от 1 до 10% было выявлено 25 HLA-B аллелей, их кумулятивная частота составила 64%. 49 HLA-B аллелей с частотой встречаемости 0,1-1% имели кумулятивную частоту 19%. Аллели с редкой частотой встречаемости (менее 0,1%) представляли группу из 81 аллеля, их кумулятивная частота равнялась 4%. Два аллеля гена HLA-C имели частоту более 10% –

C\*07:02:01:03 (13%) и C\*07:01:01:01/16 (10,4%). С частотой встречаемости от 1 до 10% было выявлено 17 HLA-C аллелей, их кумулятивная частота была 64%. 26 HLA-C аллелей с частотой встречаемости 0,1-1% имели кумулятивную частоту 10,5%. Аллели с редкой частотой встречаемости (менее 0,1%) представляли группу из 40 аллелей, их кумулятивная частота равнялась 2%. Среди HLA-DRB1 аллелей три имели частоту более 10% – DRB1\*07:01:01 (13,4%), DRB1\*15:01:01 (13,3%) и DRB1\*01:01:01 с частотой 11,7%. 17 аллелей имели частоту встречаемости от 1 до 10% (кумулятивная частота 56,3%). 13 HLA-DRB1 аллелей с частотой встречаемости 0,1-1% имели кумулятивную частоту 4,9%. Аллели с редкой частотой встречаемости (менее 0,1%) представляли группу из 12 аллелей, их кумулятивная частота равнялась 0,4%. Наиболее встречаемыми аллелями HLA-DQB1 были три: DQB1\*03:01P (20,5%), DQB1\*05:01 (14,1%) и DQB1\*06:02:01 (12,7%). 10 аллелей с частотой встречаемости от 1 до 10% охватывали еще 50,8% HLA-DQB1 аллелей. 4 аллеля с частотой встречаемости от 0,1-1% имели кумулятивную частоту 1,8%. Аллель DQB1\*03:30 встретился всего один раз.

**Выводы.** Впервые получены данные по распределению HLA-аллелей у русских, типированных на уровне аллельного разрешения по генам класса I (и высокого разрешения по генам класса II). Большое разнообразие HLA-аллелей в исследованной популяции связано в основном с присутствием редких аллелей, хотя большинство индивидов в популяции имеет распространенные аллели. Носительство редких и новых аллелей ведёт к сложностям в подборе HLA-совместимого донора.

*Макаренко О.А., Кузьмич Е.В., Андрюшкина А.В.*

## РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ НАЦИОНАЛЬНОГО РЕГИСТРА ДОНОРОВ КОСТНОГО МОЗГА ИМЕНИ ВАСИ ПЕРЕВОЩИКОВА

*БФ Национальный регистр доноров костного мозга имени Васи Перевощикова, Москва*

**Введение.** По данным Минздрава РФ, потребность в трансплантации костного мозга в РФ составляет порядка 5100 трансплантаций в год. Для пациентов, которым показана аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) и нет совместимого донора в семье, необходим поиск неродственного донора костного мозга. Эффективность поиска оптимального неродственного донора для пациентов российских клиник зависит от количества, иммуногенетического разнообразия потенциальных доноров и скорости обработки запросов в российских донорских базах. Национальный регистр доноров костного мозга имени Васи Перевощикова (далее – «Национальный РДКМ») создан в 2017 году. Для организации поиска неродственных доноров в Национальном РДКМ создан отдел поиска доноров костного мозга (далее – «отдел поиска»).

**Цель.** Оценка эффективности работы Национального регистра доноров костного мозга имени Васи

Перевощикова.

**Материалы и методы.** По состоянию на 25 апреля 2021 года в составе Национального РДКМ 47 005 потенциальных доноров костного мозга. Разработана Информационная система для обезличенного хранения, систематизации, обработки данных и взаимодействия с медицинскими учреждениями. Определение HLA фенотипов 98% доноров выполнено с помощью технологии секвенирования нового поколения (NGS) на уровне высокого разрешения. Привлечение неродственных доноров в регистр ведется по всей территории РФ. Работу по подбору и активации доноров костного мозга по запросам врачей трансплантационных клиник выполняет отдел поиска доноров. Все этапы работы с донором стандартизованы.

**Результаты.** Поиск неродственных доноров в Национальном РДКМ осуществляют 5 медицинских учреждений, выполняющих аллогенную трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток, и два ме-

дицинских учреждения, осуществляющих первичный поиск неродственных доноров, позволяющий оценить наличие потенциально совместимых неродственных доноров для пациента. Информационная система Национального РДКМ используется с 20 сентября 2018 года. Специалистами медицинских учреждений проведено 520 первичных поисков.

В отдел поиска Национального РДКМ поступили запросы на выполнение подбора неродственных доноров для 60 пациентов. Для 26 пациентов выполнена заготовка трансплантата. В 21 случае заготовлены гемопоэтические стволовые клетки периферической крови, в 5 случаях – гемопоэтические стволовые клетки костного мозга. Для 22 пациентов поиск неродственных доноров в Национальном РДКМ был закрыт. Причины закрытия поисков: 3 – смерть пациента, 12 – выбор другого вида ТГСК, 7 – обстоятельства, связанные с донором.

Стандартизация всех этапов работы позволила сократить среднее время доставки биологического образца донора для контрольного HLA типирования до

2 дней вне зависимости от региона проживания донора. Контрольное HLA типирование выполнялось в течение 3-14 дней в зависимости от практики лаборатории тканевого типирования трансплантационного центра.

Согласно опубликованным данным, в первые три года работы РМНПЦ «Росплазма» ФМБА России выполнил 8 заготовок клеток от неродственных доноров для пациентов клиник. Лаборатория регистр доноров костного мозга СПбГМУ им. Акад. И.П. Павлова в течение первых трех лет работы осуществила 6 заготовок.

**Выводы.** Использование технологии NGS для первичного иммуногенетического обследования доноров, Информационная система Национального РДКМ, стандартизация этапов поиска донора позволяет поддерживать высокий уровень эффективности работы Национального РДКМ. Уровень эффективности подтверждается сравнительным анализом количества выполненных заготовок гемопоэтических стволовых клеток в Национальном РДКМ и других российских регистрах в первые три года деятельности.

*Макаренко О.А., Кузьмич Е.В., Андрюшкина А.В.*

## **ТРАНСПОРТИРОВКА ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В УСЛОВИЯХ ПАНДЕМИИ КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ**

*БФ Национальный регистр доноров костного мозга имени Васи Перевощикова, Москва*

**Введение.** С 11 марта 2020 г. ВОЗ объявила пандемию коронавирусной инфекции, что существенно повлияло на обеспечение российских пациентов гемопоэтическими стволовыми клетками от неродственных доноров. Для пациентов РФ стали недоступны доноры из международных регистров в связи прекращением пассажирского авиасообщения между странами.

Национальный регистр доноров костного мозга имени Васи Перевощикова (Национальный РДКМ) в 2020 году выполнил поиск доноров и доставку трансплантатов для 16 пациентов российских трансплантационных клиник. 13 пациентов получили клетки от российских доноров, 3 – от международных доноров.

**Цель.** Обоснование необходимости развития специализированной курьерской службы по доставке гемопоэтических стволовых клеток в РФ.

**Результаты.** В течение 2020 года выполнялась заготовка и доставка гемопоэтических стволовых клеток от неродственных доноров из Российских донорских центров. Несмотря на сложную эпидемиологическую ситуацию, сотрудники трансплантационных клиник совместно с Национальным РДКМ обеспечивали транспортировку клеток по территории РФ. Важным фактором было расположение трансплантационных клиник и центров заготовки в крупных городах России с хорошим авиасообщением.

Прекращение международного авиасообщения стало причиной невозможности выполнения аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток от доноров из международных регистров. В июле 2020 года Национальный РДКМ подключился к

организации поиска доноров и доставки трансплантата из регистра ZKRD (Германия) для пациентки одной из российских клиник. Национальный РДКМ является членом World Marrow Donor Association (ION-4381). Это позволило выполнить первичный поиск в информационной системе WMDA, организовать подбор и активацию донора. Обязательными условиями транспортировки гемопоэтических стволовых клеток является соблюдение температурного режима, доставка в срок менее 72 часов с момента заготовки клеток, наличие пакета документов для пересечения границ между государствами.

Для выполнения международной доставки Национальный РДКМ разработал следующие маршруты: доставка с использованием транспортных самолетов компании DHL; доставка через пограничный пункт г. Калининград; доставка через аэропорт г. Стамбул. 16 сентября 2020 года Национальный РДКМ организовал доставку трансплантата из Германии в Стамбул с помощью международной компании Ontime Courier. Данная компания специализируется в области доставки гемопоэтических стволовых клеток и осуществила транспортировку более 30 тысяч трансплантатов по миру. В Стамбуле бокс с трансплантатом был передан сотруднику российского трансплантационного центра. Утром 17 сентября клетки были доставлены и осуществлена трансплантация. Общее время доставки составило 16 часов.

На 25 апреля 2021 года Национальным РДКМ организованы поиски в международных регистрах для 11 пациентов, осуществлена доставка трансплантатов.

**Выводы.** Опыт работы Национального РДКМ в условиях пандемии демонстрирует необходимость создания в РФ специализированных компаний по транспортировке гемопоэтических стволовых клеток. Специализированная компания должна обеспечить регулярное обучение курьеров, организацию достав-

ки в соответствии с международными и внутренними стандартами, контроль качества доставки, быстрое реагирование в случае нестандартных ситуаций. Что позволит освободить специалистов трансплантационных клиник от необходимости выполнять функцию курьера.

*Минаева Н.В., Зорина Н.А., Хоробрых М.Н., Шерстнев Ф.С., Безрукова Л.А., Исаева Н.В., Ветошкин К.А., Утемов С.В., Малышева Н.А., Логинова М.А., Рылов А.В., Парамонов И.В.*

### СОДЕРЖАНИЕ CD34+ КЛЕТОК В ЛЕЙКОКОНЦЕНТРАТАХ, ПОЛУЧЕННЫХ НА 4 ДЕНЬ МОБИЛИЗАЦИИ, ОТ АЛЛОГЕННЫХ ДОНОРОВ

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

**Введение.** В последние десятилетия в качестве источника гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) для трансплантации используется периферическая кровь. Согласно международным стандартам, аппаратные лейкоцитаферезы проводятся на 5-6 день мобилизации ГСК гранулоцитарным колониестимулирующим фактором (Г-КСФ). Наряду с мобилизующим действием, Г-КСФ обладает способностью стимулировать дифференцировку ГСК *in vivo*, что неизбежно снижает плюрипотентность и пролиферативный потенциал этих клеток. Кроме того, известно, что введение Г-КСФ может сопровождаться нежелательными явлениями у доноров – боли в костях, лихорадка, недомогание, бессонница и т.д. Для успешного приживления трансплантата требуется не менее  $2 \times 10^6$  CD34+ клеток/кг массы тела реципиента, а для своевременного восстановления гемопоэза и дальнейшей стабильной функции трансплантата более предпочтительной считается доза не менее  $4 \times 10^6$  CD34+ клеток/кг массы тела. Сокращение сроков мобилизации ГСК в периферическую кровь до 3 дней может способствовать снижению числа нежелательных явлений у доноров, способствовать улучшению качественных характеристик трансплантата.

**Цель.** Оценить содержание CD34+ клеток в лейкоконцентраатах, полученных методом афереза на 4 день мобилизации с использованием Г-КСФ, от аллогенных доноров

**Материалы и методы.** Проанализированы характеристики аллогенных ГСК периферической крови, полученных у 143 родственных и неродственных доноров за период в 2015-2020 гг. Мобилизация ГСК проводилась филграстимом в дозе 10 мкг/кг, разделенной на 2 введения, ежедневно в течение 4-5 дней. Первый лейкоцитаферез проводили на 4 день от начала стимуляции с использованием клеточных сепараторов Amicus и Spectra Optia. Содержание CD34+ в лейкоконцентраатах оценивали методом проточной цитофлуорометрии. Среди доноров было 57 (39,9%) женщин и 86 (60,1%) мужчин, неродственных – 98, родственных – 45. В качестве оптимальной нами принята доза более  $4 \times 10^6$  CD34+ /кг массы тела реципиента, субоптимальной от 2 до  $4 \times 10^6$  CD34+ /кг включительно, недостаточной – менее  $2 \times 10^6$  CD34+ /кг массы тела. Сроки приживления трансплантата оценены у 27 пациентов, которым

трансплантировано более  $4 \times 10^6$  CD34+ /кг, полученных в результате однократного афереза, проведенного на 4 день от начала мобилизации в клинике ФГБУН КНИИиГПК ФМБА России. Количественные значения содержания CD 34+ клеток представлены в виде медианы (Me), первого и третьего квартилей (Q1-Q3), среднего значения и стандартного отклонения.

**Результаты.** В результате однократного афереза, проведенного на 4 день от начала мобилизации, оптимальная трансплантационная доза ГСК получена от 91 (63,6%) донора, субоптимальная от 33 (23,1%), недостаточная от 19 (13,3%), что потребовало проведения повторных процедур аферезов. Медиана содержания CD34+ /кг в трансплантате составила 6,27 (4,77; 9,6), 3,1 (2,5;3,7), 1,5 (0,9;1,9), а количество циркулирующих CD34+ клеток/мкл в периферической крови в день афереза составило  $73,6 \pm 4,66$ ,  $39,6 \pm 5,38$ ,  $26,6 \pm 4,21$  соответственно. Проанализировано соотношение массы тела в парах реципиент/донор ( $m_1/m_2$ ). Установлено, что оптимальная трансплантационная доза получена при  $m_1/m_2$   $0,92 \pm 0,04$ , субоптимальная –  $1,15 \pm 0,06$ , недостаточная –  $1,29 \pm 0,06$ . Восстановление кроветворения у 25 реципиентов, которым трансплантировано более  $4 \times 10^6$  CD34+ /кг, полученных в результате однократного афереза на 4 день от начала мобилизации, произошло в соответствии с установленными в трансплантологии сроками: уровень лейкоцитов более  $1 \times 10^9$  /л в течение 3 последовательных дней достигнут в среднем на +18 сутки, тромбоцитов более  $30 \times 10^9$  /л - на +16 день. У 2 реципиентов, донорами для которых явились гаплоидентичные родственники, приживления трансплантата не произошло (медиана содержания CD34+  $4,8 \times 10^6$  /кг).

**Выводы.** У 124 (86,7%) доноров получена достаточная трансплантационная доза в результате однократного лейкоцитафереза, проведенного на 4 день от начала мобилизации ГСК, при этом у 91 (63,6%) достигнуто оптимальное содержание CD 34+ клеток в трансплантате. Показано, что на эффективность заготовки влияет соотношение массы тела реципиента и донора. Восстановление кроветворения у реципиентов происходит в сроки, установленные международными требованиями. Таким образом, использованный нами подход является перспективным, поскольку сокраще-

ние сроков мобилизации ГСК в периферическую кровь до 3 дней и проведения лейкоцитафереза на 4 день не влияет на возможность получения трансплантата с оп-

тимальным содержанием CD 34+ клеток, что может изменить взгляд на существующий режим мобилизации у аллогенных доноров ГСК.

*Морозова Г.А., Лебедева Л.Л., Шубина Ю.Ф., Бронин Г.О.*

## **ОПЫТ ПРИМЕНЕНИЯ ТЕХНОЛОГИИ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В ИССЛЕДОВАНИИ ХИМЕРИЗМА ПОСЛЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК**

*Государственное бюджетное учреждение здравоохранения города Москвы «Морозовская детская городская клиническая больница Департамента здравоохранения города Москвы»*

**Введение.** Анализ химеризма – это рутинный тест, выполняемый для оценки результатов трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК). Результаты этого теста дают ценную информацию о приживлении донорских клеток и могут свидетельствовать о возможном рецидиве заболевания, поэтому представленные данные имеют большое значение при принятии решений о необходимых лечебных вмешательствах, таких как трансфузии донорских лимфоцитов и т.д. В настоящее время существуют разнообразные методы выявления химеризма гемопоэтических клеток, однако необходимость высокочувствительных технологий обнаружения небольших клеточных популяций является актуальной проблемой.

**Целью** данного исследования было изучение мониторинга гемопоэтического химеризма методом количественной полимеразной цепной реакции (кПЦР) с использованием реагентов GenDx (Нидерланды), ретроспективный анализ полученных результатов и сравнение их с клиническими данными пациентов.

**Материалы и методы.** Материалом для исследования служили образцы периферической крови и костного мозга пациентов до и после трансплантации и донорские образцы периферической крови. Геномную ДНК выделяли методом связывания и осаждения на мембране с силикагелем (QIAamp DNA MiniBlood Kits, Германия). Клеточные линии CD3+, CD19+, CD34+ получали методом положительной магнитной сепарации с использованием парамагнитных сфер (Invitrogen, США). Исследование химеризма проводилось с использованием 29 основных информативных маркеров и 10 дополнительных (в случае необходимости), стратегически размещенных на 16 хромосомах. Перед аллоТГСК ДНК реципиента и донора типировали с помощью набора маркеров KMRtype, мультиплексированных по три в каждой смеси. Поскольку как реципиент так и донор могли быть гомо- и гетерозиготными по маркерам, информативными они являлись, если были отрицательными у реципиента или донора в гомозиготном состоянии. Обнаруженные информативные маркеры служили для наблюдения за реципиентом после трансплантации, при этом уровень химеризма в исследуемых образцах реципиента сравнивался с уровнем химеризма перед трансплантацией (обра-

зец перед трансплантацией служил в качестве эталона). Этот процесс выполнялся с использованием реагентов KMRtrack, где на реакцию наносился 1 маркер (одиночный комплекс). Процентное соотношение химеризма рассчитывалось с помощью программного обеспечения производителя KMRengine.

**Результаты.** Исследовано 57 пациентов (2 получили вторую алло ТГСК) в возрасте от 0,17 до 18 (медиана 10) лет и 57 доноров костного мозга. Среди пациентов 36 страдали различными вариантами острых лейкозов, 9 – апластической анемией, 5 пациентов – талассемией, 5 пациентов с диагнозами: нейробластома, тяжелый комбинированный иммунодефицит, ювенильный миеломоноцитарный лейкоз, гемофагоцитарный лимфогистиоцитоз, мукополисахаридоз. Частота исследований проводилась в фиксированные временные точки (+30, +60, +100, +180, +365-й дни), при необходимости анализ выполнялся так часто, как того требовала клиническая ситуация. Всего за исследуемый период (2020-2021гг) было выполнено 450 тестов. У 40 пациентов была проведена родственная ТГСК, при этом для 33 пациентов – от гаплоидентичных родителей и для 7 от HLA идентичных сиблингов. 15 реципиентам была осуществлена неродственная ТГСК от доноров с совместимостью 10/10 (8 пациентов) и 9/10 (7 пациентов). Для всех пар донор/реципиент были обнаружены не менее двух информативных маркеров, по которым в дальнейшем велся мониторинг химеризма гемопоэтических клеток. По уровню химеризма пациенты были разделены на четыре группы: с полным донорским химеризмом, у которых обнаружена 100% донорская ДНК – 44 случая (9,8%); группа со смешанным химеризмом, у которых присутствует более 1% ДНК реципиента – 220 случаев (48,88%); третья группа, пациенты с обнаруженной ДНК только реципиента – 6 случаев (1,32%). Кроме того, нами была выявлена четвертая группа, с так называемым микрохимеризмом, когда в исследуемом образце была обнаружена ДНК реципиента в количестве 0,1-1% (всего 180 случаев, что составляет 40%).

**Выводы.** Таким образом, высокая чувствительность представленного метода позволяет выявить гемопоэтический микрохимеризм, что является значимым диагностическим признаком развития посттрансплантационных осложнений, и способствует своевременному проведению корректирующих мер.



На основании полученных данных количественного определения химеризма была выявлена корреляция с клиническим статусом пациентов. Количественная ПЦР является надежным, информативным и высоко

чувствительным методом для мониторинга химеризма у пациентов с уровнем реципиентских клеток менее 1% (чувствительность до 0,05%) и рекомендуется для внедрения в лабораторную практику.

*Назаретян М., Джордан Ф., Авакян С., Усян А., Сирунян А., Азарян А., Оганесян З.*

### ВНЕШНЯЯ ОЦЕНКА КАЧЕСТВА – ПРОВЕРКА КОМПЕТЕНТНОСТИ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ HLA-ЛАБОРАТОРИИ АРДКМ

*Армянский Регистр Доноров Костного Мозга, Ереван, Армения*

Проверка компетентности (ПК) – это стандартная процедура, предполагающая периодическую рассылку исследуемых проб лабораториям для анализа и/или идентификации, а также сравнения полученных данных исследуемой лабораторией с результатами других лабораторий с заданными величинами и последующим информированием результатов лабораториям-участникам и другим соответствующим организациям.

Лаборатории, стремящиеся получить аккредитацию European Federation for Immunogenetics (EFI), должны принимать участие в стандартизованном типировании HLA-антигенов и проверке компетентности (ПК) в отношении всех используемых лабораторией исследований, представленных на получение аккредитации.

**Целью** процедуры ПК АРДКМ являлась оценка качества исследований (точность, специфичность и воспроизводимость) в полученных от референс-лабораторий образцах крови методом ПЦР-SSP.

Требования для проведения ПК предполагают проведение тестирования в повседневных (обычных) для лаборатории условиях, при участии всех ее работников, использование для контрольного тестирования рутинных образцов крови, представление результатов в установленные заданием сроки и сохранение конфиденциальности информации результатов тестирования.

С 2004 г. начато участие АРДКМ в программе ASHI Proficiency Testing (PT). Для этого исследовалось по 10 образцов ДНК в год (низкое и высокое разрешение) и

тестирование (только высокое разрешение) в формате ASHI Disease Association Proficiency Testing (PT).

С 2007 по 2010 г.г. оценка ПК проводилась в рамках участия лаборатории в программе EFI Регион 8 EPT, а начиная с 2018 г. по настоящее время, в связи с изменением приписанного Регистру региона, уже в рамках программы EFI Регион 5 EPT.

**Результаты** проведения ПК АРДКМ: В рамках программы ASHI Proficiency Testing (PT) было проведено тестирование 10 образцов в год (низкое и высокое разрешение) антигенов HLA класса I (DNA) и класса II (DNA). В формате ASHI Disease Association PT было проведено 10 исследований (B27 detection только низкое разрешение). В формате программы EFI Регион 8 EPT проведено 10 исследований (все – низкое разрешение), а после смены региона, в формате EFI Регион 5 EPT – еще 10 исследований (низкое и высокое разрешение).

**Заключение.** Начиная с 2004 г., по настоящее время, достигнута и сохраняется 100% показатель соответствия (конкордантности) результатов с тестовыми образцами референс-лабораторий. Деятельность HLA-лаборатории АРДКМ полностью отвечает требованиям тестирования ПК, обеспечивающим качество HLA-типирования в соответствии с стандартами EFI и ASHI. Это основной компонент качества деятельности Банка доноров АРДКМ, являющегося составной частью и активным резервом Всемирной Сети Доноров Костного Мозга (BMDW) в международном поиске и предоставлении стволовых клеток костного мозга от родственных и неродственных доноров.

*Павлова И.Е., Глазанова Т.В., Шилова Е.Р., Чубукина Ж.В., Розанова О.Е., Бубнова Л.Н.*

### АССОЦИАЦИЯ ГЕНОВ HLA-DRB1 С РАЗВИТИЕМ ПАРОКСИЗМАЛЬНОЙ НОЧНОЙ ГЕМОГЛОБИнуРИИ

*ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии ФМБА России», г. Санкт-Петербург*

**Введение.** Роль иммунной системы в развитии пароксизмальной ночной гемоглобинурии (ПНГ) подтверждается обнаружением ассоциации между ПНГ и определенными аллельными вариантами генов Главного комплекса гистосовместимости (HLA-генов). При этом механизмы таких ассоциаций остаются неясными. Возможно, это зависит от функциональных свойств определенных молекул HLA-генов.

**Цель.** Изучение особенностей распределения HLA-DRB1 аллелей у больных ПНГ, проживающих в европейской части России.

**Материалы и методы.** В исследование были включены 77 пациентов, образцы периферической крови которых направлялись в лабораторию иммуногематологии ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России из различных регионов европейской части России для

выявления ПНГ-клона. Основными диагнозами направления были: апластическая анемия (АА), ПНГ, миелодиспластический синдром (МДС). У подавляющего большинства пациентов (71,4%) диагнозом направления на обследование являлся АА/ПНГ.

В качестве популяционного контроля использовалась группа доноров крови, жителей европейской части России, из 1456 человек в возрасте от 18 до 60 лет: мужчин – 871 (59,8%), женщин – 585 (40,2%), выразивших добровольное согласие на проведение иммуногенетического обследования для включения в регистр доноров костного мозга.

Диагностика наличия ПНГ-клона осуществлялась с помощью проточной цитометрии по общепринятой методике с использованием стандартного протокола, рекомендованного Международным Обществом Клинической Цитометрии (ICCS).

ПНГ-клон определяли среди эритроцитов, гранулоцитов и моноцитов методом, используя проточный цитофлуориметр Beckman Coulter (США). Использовали следующий набор реагентов: для выявления ПНГ клеток на эритроцитах – CD235a – FITC/CD59-PE; на гранулоцитах – CD45-PC7/CD15-PC5/CD24-PE/FLAER-Alexa 488; на моноцитах – CD45-PC7/CD64-PC5/CD14-PE /FLAER-Alexa 488.

HLA-типирование гена DRB1 проводилось на уровне базового разрешения, т.е. выполнялось определение групп аллелей с помощью полимеразной цепной реакции с сиквенс-специфичными праймерами (PCR-SSP) производства “Protrans” (Германия). В случае выявления группы аллелей HLA-DRB1\*15 выполнялось высокоразрешающее типирование с помощью PCR-SSP с сиквенс-специфичными праймерами производства “Olerup” (Германия).

Статистическую обработку проводили при помощи пакета программ Arlequin software package, version 3.5. Достоверность различий определяли с помощью критерия  $\chi^2$  с поправкой Йейтса.

**Результаты.** Патологический клон среди гранулоцитов и/или моноцитов был выявлен у 57 (74,03%) обследованных лиц; у 20 (25,97%) пациентов, на-

правленных на обследование, ПНГ-клон не был обнаружен. Величина ПНГ-клона варьировала от 0,1% до 99,9%, при этом клинически значимым считали клон более 10%, т.н. «большой клон», а содержание клеток с ПНГ-фенотипом от 0,1 до 10% расценивали как «малый клон». Большой клон был определен у 41 человека (73,2%), малый клон – у 16 человек (26,8%).

Анализ распределения групп аллелей показал, что среди пациентов с наличием ПНГ-клона значительно повышена частота группы аллелей HLA-DRB1\*15 – 66,07% против 28,37% в группе контроля. При последующем высокоразрешающем типировании группы аллелей HLA-DRB1\*15 установлено, что в 100% случаев в этой группе аллелей определялся HLA-DRB1\*15:01.

На фоне столь значимого увеличения частоты HLA-DRB1\*15:01 у пациентов с наличием ПНГ-клона установлено достоверное снижение частоты групп аллелей HLA-DRB1\*01 – 10,75% против 23,7% и HLA-DRB1\*16 – 1,75% против 8,65% по сравнению с группой здоровых лиц. Распределение групп аллелей гена HLA-DRB1 у пациентов с отсутствием ПНГ-клона незначительно отличалось от такового в группе популяционного контроля. В этой группе пациентов высокоразрешающее типирование группы аллелей HLA-DRB1\*15 также выявило HLA-DRB1\*15:01 в 100% случаев. Изучение частоты групп аллелей HLA-DRB1 среди пациентов в зависимости от величины патологического клона не показало каких-либо значимых различий. наибольшая частота HLA-DRB1\*15:01 наблюдалась в группе больных с АА (73,53%), несколько реже этот аллель определялся у пациентов с МДС (62,5%) и ПНГ (53,33%), однако во всех группах больных частота аллеля HLA-DRB1\*15:01 существенно превышала этот показатель в группе популяционного контроля.

**Вывод.** Установлено, что частота иммуногенетического маркера HLA-DRB1\*15:01 значимо повышена как в группе больных пароксизмальной ночной гемоглобинурией, так у больных АА/ПНГ и МДС/ПНГ.

*Пирожков И.А., Малышев М.Е., Резник О.Н., Скворцов А.Е., Кузьмин Д.О., Хабирова Т.Г.*

## **МИКРО-РНК – НОВЫЙ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ МАРКЕР В ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ ПОСТТРАНСПЛАНТАЦИОННОГО ПЕРИОДА**

*ГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт скорой помощи имени И.И. Джанелидзе», Санкт-Петербург*

**Введение.** Лабораторное обследование является важнейшим компонентом посттрансплантационного мониторинга, позволяющим существенно повысить продолжительность и качество жизни реципиентов трансплантата. Стандартно для мониторинга состояния пересаженного органа используется биопсия трансплантата, однако к недостаткам метода относят инвазивность и часто неинформативность биоптата для исследования. Перспективным направлением развития ранней неинвазивной диагностики посттрансплантационных осложнений считается опреде-

ление профиля специфичных микроРНК. МикроРНК относятся к классу малых эндогенных некодирующих РНК длиной 19–25 нуклеотидов, участвующих в посттранскрипционной регуляции экспрессии генов эукариот. Возможность использования микроРНК для ранней диагностики и прогноза течения патологических процессов обусловлена особыми свойствами молекулы: микроРНК стабильна в биологических средах, может успешно выделяться из образцов различных тканей, уровни экспрессии микроРНК не различаются по полу и возрасту, количественный анализ

экспрессии микроРНК может быть проведен с помощью стандартных лабораторных методик.

**Цель исследования:** проанализировать особенности профилирования микроРНК и определить уровни экспрессии специфичных микроРНК в образцах сывороток и нефробиоптатах реципиентов почки, определить возможности использования микроРНК в качестве маркеров сохранности донорского органа, течения посттрансплантационного периода и адекватности проводимой иммуносупрессивной терапии.

**Объект исследования:** планируется проведение обследования реципиентов почки, прооперированных в ПСПБГМУ им. И.П.Павлова и ГБУ СПб НИИ СП им. И.И.Джанелидзе.

**Методы исследования:** биоинформационный анализ, ПЦР в реальном времени, ИФА.

**Результаты.** По результатам обзора научной литературы и баз данных MiRBase, TargetScan, MiRanda

определены наиболее перспективные микроРНК-кандидаты: микроРНК-10, микроРНК-15, микроРНК-20, микроРНК-21, микроРНК-142, микроРНК-146, микроРНК-155, микроРНК-223. На основании результатов комплексного исследования выбранных микроРНК-кандидатов планируется создать мультиплексную диагностическую панель специфических микроРНК для мониторинга состояния пациентов трансплантационных центров методом ПЦР в реальном времени.

**Выводы.** Таким образом, данные о ключевой роли микроРНК в физиологических и патофизиологических процессах, различие уровней экспрессии микроРНК, специфичное для определённых тканей и органов позволяют рассматривать возможность их применения в качестве неинвазивных молекулярно-генетических маркеров течения посттрансплантационного периода.

*Реутова Н.В., Малышев М.М.*

### ОПЫТ РАБОТЫ ГОРОДСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ ИММУНОГЕНЕТИКИ И СЕРОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ ЗА 10 ЛЕТ

*Санкт-Петербургский Научно-Исследовательский институт скорой помощи имени И.И.Джанелидзе, г. Санкт-Петербург*

Городская лаборатория иммуногенетики и серологической диагностики создана около 30 лет назад в соответствии с распоряжением Комитета по здравоохранению Администрации Санкт-Петербурга с целью обеспечения высококвалифицированного иммунологического обследования доноров и реципиентов органных трансплантатов и повышения эффективности трансплантаций. За эти годы поменялся режим и объем работы лаборатории, но цели и задачи остались прежними. Это формирование единого городского «Листа ожидания» (ЛО) потенциальных реципиентов органного трансплантата, обеспечение планового и экстренного подбора иммунологически совместимых пар «донор-реципиент» и посттрансплантационный мониторинг развития иммунологического отторжения трансплантата. Начиная с 2010 года, лаборатория работает в соответствии со стандартами Европейской Федерации Иммуногенетиков.

За последние 10 лет значительно расширился ЛО, так как в него добавились новые центры трансплантации. На сегодняшний день, ЛО составляют около 300 реципиентов, ожидающих трансплантации почки, сердца, печени, легкого и поджелудочной железы. Все пациенты имеют идентификационный номер, чтобы позволяет учитывать их время нахождения в ЛО. Повысилась точность типирования HLA-генов в связи с тем, что лаборатория полностью перешла на молекулярное типирование. Определение дотрансплантационного уровня HLA-сенсбилизации у реципиентов осуществляется как с помощью лимфоцитотоксического теста, как базового метода, так и более чувствительного иммуноферментного анализа, что с учетом ежегодного трёхкратного обследования образцов лимфоцитов составляет 55 тысяч анализов в год.

Тщательный анализ спектра антител у сенсбилизированных пациентов и его учет при подборе донора позволяет минимизировать риск острого отторжения и дать шанс на успешную трансплантацию больным, которые обладают наибольшим риском развития острого отторжения трансплантата: это реципиенты для повторной трансплантации (составляют 14% ЛО) и пациенты с высоким уровнем сенсбилизации (составляют 20% ЛО). Из них 15% имеют комплементсвязывающие цитотоксические антитела.

Лаборатория обеспечивает плановый подбор гистосовместимых доноров для родственной трансплантации почки. По результатам исследований за 10 лет проведено более 200 подборов пар донор-реципиент и выполнено более 60 родственных трансплантаций. Лаборатория также работает в режиме круглосуточного дежурства, обеспечивая экстренный подбор доноров для неродственной органной трансплантации. Разработан алгоритм подбора кандидатов на трансплантацию в соответствии с критериями отбора доноров и срочности состояния реципиентов. За последние 10 лет в г. Санкт-Петербург было обследовано около 800 потенциальных доноров органного трансплантата и были проведены трансплантации печени более 400 реципиентам, почки – 370 рец., сердца – 160 рец., легкое – 6 рец. и 1 трансплантация поджелудочной железы. Приблизительно 20% предполагаемых доноров «бракуются» по причине обнаружения маркеров гемотрансмиссивных инфекций (осуществляется автоматизированным методом с помощью прибора ARCHITECT I 2000).

Было проведено 17 повторных трансплантаций почки, из них у 1-го пациента это была третья трансплантация. Улучшился подбор донора, имеющего с

реципиентом минимальное количество расхождений по HLA-антигенам, что значительно снизило риск отторжения трансплантата, а учет специфической направленности преобладающих HLA-антител реципиента позволил увеличить процент пересадки органов высокосенсибилизированным пациентам. За 10 лет более 30 таких пациентов получили органнй трансплантат, из них в 75% случаев уровень сенсибилизации составил более 80%.

Также лаборатория проводит посттрансплантационный мониторинг выработки донор-специфических HLA-антител двумя методами, что позволяет эффективно корректировать иммуносупрессию и увеличивать сроки нормального функционирования транс-

плантата. Примерно в 3% случаев в год у пациентов обнаруживаются HLA-антитела после трансплантации почки и только у 1% – донор-специфические, которые обуславливали гуморальное отторжение трансплантата. За 10 лет не более 10% пациентов вернулись на гемодиализ после трансплантации почки и 18% больных умерло после трансплантации сердца и легкого. В лаборатории также проводится освоение новых инновационных технологий, применяемых в работе, и разработка дополнительных методик для усовершенствования перекрестной пробы на индивидуальную совместимость и выявления гуморального отторжения у пациентов в самые ранние сроки.

**Романенко Н.А., Алборов А.А., Розанова О.Е., Юрьев, Е.Ю. Шилова Е.Р., Глазанова Т.В., Волошин С.В.**

## **ИССЛЕДОВАНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ЦИТОКИНОВ ВОСПАЛЕНИЯ ПРИ АНЕМИИ У БОЛЬНЫХ КОЛОРЕКТАЛЬНЫМ РАКОМ С МЕТАСТАЗАМИ В ПЕЧЕНЬ**

*Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства», г. Санкт-Петербург*

**Введение.** Цитокины воспаления играют важную роль в иммунном ответе организма на опухоль и воспаление. Предполагается, что их повышенная экспрессия не только подавляет рост опухоли, но приводит к анемии, как ранее было продемонстрировано на когорте больных злокачественными заболеваниями лимфатической ткани.

Цель исследования. Сравнить содержание провоспалительных цитокинов у больных колоректальным раком (КРР) с метастатическим поражением печени с анемией и у доноров.

Материалы и методы. В исследование включены: 1) группа – пациенты с КРР с метастатическим поражением печени после 4-6 курсов противоопухолевой химиотерапии с анемией (Hb 87,6±1,3 г/л; n=29) в возрасте 41-79 лет (Me=61 год); 2) группа – здоровые лица (Hb ≥120 г/л; n=18) в возрасте от 24 до 50 лет (Me=37 лет) – контрольная группа. В сыворотке крови исследовано содержание фактора некроза опухоли-α (ФНО-α), интерлейкина-1β (ИЛ-1β), интерлейкина-6 (ИЛ-6). Методом корреляционного анализа предпринята попытка выявить связь между уровнем гемоглобина и содержанием цитокинов.

Результаты. В ходе исследования выявлено, что ФНО-α у исследуемых пациентов (n=29) составлял

2,6±0,4 пг/мл (0,2–7,3 пг/мл), в группе сравнения (n=18) – 2,3±0,5 пг/мл (0,1–8,2 пг/мл), что статистически не различалось (p=0,61). Аналогично не выявлено существенной разницы содержания и двух других цитокинов: ИЛ-1β у больных КРР констатирован на уровне 1,9±0,7 пг/мл (0,3–18,2 пг/мл), в группе сравнения – 1,0±0,4 пг/мл (0,1–6,4 пг/мл; p=0,31); ИЛ-6 у больных – 8,8±2,0 пг/мл (0,4–41,1 пг/мл), в группе сравнения – 14,5±2,6 пг/мл (0,2–28,8 пг/мл; p>0,09). Важно отметить, что в последующем всем больным для коррекции анемии назначался эритропоэтин альфа и положительный ответ, в виде повышения гемоглобина на ≥10 г/л, был получен у 27 из 29 исследуемых пациентов с КРР (93,1%).

Вывод. Таким образом, в результате проведенного исследования мы пришли к заключению, что у больных КРР с метастазами в печень после завершения программной химиотерапии содержание провоспалительных цитокинов хоть и незначительно выше, чем в контрольной группе, но статистические различия отсутствуют. Однако следует отметить тот факт, что экспрессия цитокинов воспаления была невелика, что могло быть ассоциировано с выраженным эффектом корригирующей терапии эритропоэтином.

**Сатыбалдиева-Назаретян А.Б., Карабаев Б.Б.**

## **ВНЕШНЯЯ ОЦЕНКА КАЧЕСТВА (ВОК) И ВНУТРЕННИЙ КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА (ВКК) В СКРИНИНГЕ ДОНОРСКОЙ КРОВИ НА ГТИ**

*Республиканский центр крови МЗ КР, Бишкек*

Контроль качества лабораторных исследований для скрининга гемотрансмиссивных инфекций (ГТИ) предполагает регулярное осуществление

системы мероприятий для выявления и предотвращения недопустимых ошибок, которые могут иметь место в процессе выполнения исследований.

Такой контроль требует стандартизации всех этапов лабораторного исследования и анализа результатов внутрилабораторного контроля качества и внешней оценки качества.

Целью скрининга донорской крови на ГТИ является обеспечение безопасности компонентов и препаратов крови для трансфузионной терапии.

Внедрение системы оценки и контроля качества в лабораторную диагностику для скрининга ГТИ обуславливает достижение этой цели за счет уменьшения лабораторных ошибок.

Лаборатория диагностики СПИД Республиканского Центра крови в г. Бишкеке имеет разрешение Республиканской Режимной комиссии на проведение лабораторных исследований, в том числе, с микроорганизмами II-III группы патогенности.

Для своевременного и качественного обследования образцов сывороток донорской крови на ГТИ, лаборатория оснащена полуавтоматическими и автоматическими анализаторами ИФА и ИХЛА фирмы «Human» – «Elisis Quatro» и «Архитект» фирмы Эббот и проводит ежегодную стандартную проверку их работы внешней организацией – «Кыргызстандарт».

В соответствии с основными задачами, лаборатория диагностики СПИД проводит исследования образцов донорской крови на антиген/антитела к ВИЧ 1/2, HBsAg, ВГС, анти-Люис GM, включая входной контроль тест-систем, поступающих в лабораторию для оценки чувствительности и специфичности.

С 2002 г. лаборатория диагностики СПИД РЦК участвует в ежегодной Внешней Оценке Качества лабораторных исследований, проводимой СДС (Центр по контролю и профилактике заболеваний США) и референс-лабораторией НПО «Профилактическая медицина» совместно с референс-лабораторией РО «СПИД».

Профессиональная оценка компетентности тестирования проводится с помощью интегрированной контрольной панели, включающей 8 закодированных образцов на а-ВИЧ, а-ВГС, HBsAg и сифилиса,

с определением отрицательного и положительного статуса в %.

Контрольная панель разработана и аттестована в соответствии с требованиями ISO (GUIDE 34; 35), и ВОЗ (WHO/92.800). Позитивные образцы панели откалиброваны по Международным биологическим стандартам (NIBSC 02/210; NIBSC 02/238-005; NIBSC 00/588).

Мы используем только тест-системы фирмы «Диагностические тест-системы» г. Нижний Новгород и «Вектор-Бест» г. Новосибирск, имеющие разрешение на применение от Минздрава КР. ВИЧ-исследование проводится тест-системами четвертого поколения «антиген-антитело».

С 2010 года, после проведения ВОК, осуществлен переход на тестирование сифилиса методом ИФА. В качестве специального контрольного материала мы используем приготовленную лабораторией контроля качества инфекционных болезней НПО «ПМ» слитую сыворотку (замороженную при t -200), разведенную до определенного параметра (выше ОП крит. в 1,5 – 2 раза), которую ежедневно тестируем и полученные результаты отмечаем на карте Шухарта.

Использование контрольной карты тестирования дает возможность своевременно распознать и предотвратить ошибки в выполнении методики.

Так как на качество проводимых исследований большое влияние оказывает стабильность температурного режима, в помещении лаборатории дополнительно установлен кондиционер «зима - лето».

Для усовершенствования преаналитического этапа лабораторного исследования разработаны СОПы на правила забора, транспортировки биоматериала и оформления направлений.

Разработаны и внедрены СОПы на проведение тестирования антител к ВИЧ, сифилис и вирусных гепатитов В и С, а также разработаны стандартные процедуры на эксплуатацию лабораторно-аналитического оборудования.

*Сазонова Ю.В., Федотов П.А., Симоненко М.А., Борцова М.А., Килина Д.А., Ситникова М.Ю., Николаев Г.В., Гордеев М.Л., Карпенко М.А.*

### ТРАНСПЛАНТАЦИЯ СЕРДЦА У ПАЦИЕНТОВ С СЕНСИБИЛИЗАЦИЕЙ К НЛА-АНТИГЕНАМ

*Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург*

**Введение.** Сенсibilизация к НЛА антигенам у реципиентов до трансплантации сердца (ТС) затрудняет подбор пары донор-реципиент и является риском для развития острого гуморального отторжения пересаженного органа, как в ранние, так и в отдаленные сроки после операции. Предотвращение осложнений после ТС, связанных с повышенным уровнем антител к НЛА антигенам,

считается одной из важных задач в трансплантологии.

**Цель.** Оценить частоту встречаемости НЛА-сенсibilизации у реципиентов сердца, эффективность десенсibilизирующей терапии и выживаемость после ТС.

**Материалы и методы.** В период с января 2010 по апрель 2021г. в Центре была выполнена 161

ТС. Выявление анти-HLA I и II класса выполнялось методом твердофазного иммуоферментного анализа (ИФА) и мультиплексного анализа (Luminex). Определение панель-реактивных антител PRA проводилось расчетным методом и с помощью программного обеспечения MatchIT antibody, Immucor для методики Luminex. Всем пациентам проводилась проба на перекрестную совместимость с потенциальным донором методом лимфоцитотоксического теста (cross-match). Реципиентам с наличием сенсibilизации к HLA высокой степени (PRA более 10% и/или MFA более 5000) и/или при наличии положительной cross-match реакции в анамнезе выполнялся протокол десенсибилизирующей терапии, включающий в себя методы трансфузиологической гемокоррекции на оборудовании CobeSpectra или Plasauto Sigma (плазмообмен или каскадная плазмофильтрация), введение внутривенного иммуноглобулина (IVIg) из расчета 2 г/кг однократно. Все больные после ТС получали тройную иммуносупрессивную терапию ингибиторами кальциневрина, микофеноловой кислотой/эверолимусом, глюкокортикостероидами. Индукция была проведена большинству реципиентов (93%, n=150): у 130 – базиликсимабом и у 20 – антитимоцитарным глобулином.

**Результаты.** Сенсibilизация к HLA до ТС была выявлена у 29 пациентов из 161 (18%), из которых 18 являлись высокосенсibilизированными. Причины сенсibilизации у данных больных были следующие: у 8 больных – беременность в анамнезе, у 4 – наличие вспомогательного устройства кровообращения, у 9 гемотрансфузия

в анамнезе и у 8 – причина не была верифицирована. У 9 реципиентов (5,6%) был проведен протокол десенсибилизирующей терапии в полном объеме, что позволило избежать положительной cross-match реакции, подобрать пару донор-реципиент и успешно выполнить ТС. У 1 пациента протокол десенсибилизирующей терапии выполнен в раннем послеоперационном периоде. У остальных больных десенсибилизация не проводилась либо в связи с низким уровнем предсуществующих антител (n=11), либо по причине экстренной трансплантации (n=8). В течение года после ТС у 7 исходно сенсibilизированных реципиентов выявлялись высокие титры антител к HLA I и/или II класса. Кризы гуморального отторжения (AMR2) в течение первого года после ТС зарегистрированы только у 5 пациентов, из них у 3 проведены повторные сеансы методом трансфузиологической гемокоррекции в сочетании с IVIg и/или ритуксимабом. Гемодинамически значимых кризов отторжения трансплантированного органа выявлено не было. Выживаемость в течение года после ТС составила 86,2% (25 человек).

**Выводы.** Частота встречаемости сенсibilизации к HLA антигенам перед ТС была высокой и составила 18%. Проведение протокола десенсибилизирующей терапии до ТС позволило избежать положительной cross-match реакции при подборе донор-реципиент, снизить риск развития криза гуморального отторжения с дисфункцией сердечного трансплантата в течение первого года после операции и повысить выживаемость высокосенсibilизированных реципиентов.

*Свитина С.П., Кострома И.И., Сидорова Ж.Ю., Дрижун Ю.С., Чубукина Ж.В., Грицаев С.В., Бессмельцев С.С., Капустин С.И.*

## **ВЗАИМОСВЯЗЬ АЛЛЕЛЬНОГО ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ ЦИТОКИНОВ И ЭФФЕКТИВНОСТИ АУТОЛОГИЧНОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК У БОЛЬНЫХ МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМОЙ**

*ФГБУ "Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии ФМБА России", Санкт-Петербург, Россия*

**Введение.** Патогенез множественной миеломы (ММ) обусловлен сложной комбинацией численных и структурных изменений хромосом. Помимо изменений в плазматических клетках, в патогенезе ММ важное значение имеют изменения в костномозговом микроокружении, включающие активацию ангиогенеза, нарушение паракринной и аутокринной регуляции, нарушение функции клеточноопосредованного иммунитета. Преимущественно, это касается избыточной продукции интерлейкина 6 (IL-6), интерлейкина 1β (IL-1β), сосудистого эндотелиального ростового фактора (VEGF). Было показано, что некоторые аллельные варианты генов интерлекинов 1 и 6 являются предрасполагающим

иммуногенетическим фактором развития ММ. На сегодняшний день, аутологичная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (аутоТГСК) признана одним из стандартных методов лечения молодых (≤65 лет) больных ММ. Безусловно, немалый интерес представляют прогностические факторы эффективности аутоТГСК при данном заболевании. В настоящее время появляется все больше исследований, в которых подтверждается связь между генетической изменчивостью иммунорегуляторных генов и результатами лечения ММ, в частности при использовании высокодозной химиотерапии с последующей аутоТГСК.

**Цель исследования.** Изучить особенности ал-

лельного полиморфизма ряда генов иммунной системы (IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1B, IL-10) у больных ММ при выполнении аутоТГСК.

**Материалы и методы.** В исследование включены 37 больных ММ (15 мужчин и 22 женщины) в возрасте от 38 до 66 лет. В зависимости от количества CD34+ клеток, заготовленных в день первого сеанса лейкоцитафереза, пациенты были разделены на две группы. В первую группу вошли 23 пациента с количеством клеток выше субоптимального уровня: 2,5x10<sup>6</sup>/кг. Вторая группа включала в себя 14 больных, у которых число заготовленных клеток было ниже 2,5x10<sup>6</sup>/кг. Частичный (ЧО), очень хороший частичный (ОХЧО) и полный (ПО) ответы после проведения первой аутоТГСК были констатированы у 11, 7 и 19 больных соответственно. Контрольную группу (КГ) составили 236 здоровых лиц. Полиморфизм исследуемых генов IL-6 (G-174C), IL-1B (T-31C), IL-10 (C-592A) и TNF-A (G-308A) определяли методом ПЦР с последующим рестрикционным анализом. Статистическая обработка результатов проведена с использованием программы GraphPad Prism 5.0. Различия в распределении аллелей и генотипов оценивались с помощью точного критерия Фишера.

**Результаты.** Характер распределения генотипов IL-6, IL-10 и TNF-A в группе больных существенно не отличался от нормы. В то же время доля гомозиготных носителей аллеля IL-1B -31C была более чем в два раза выше среди больных ММ, по сравнению

со здоровой популяцией (24,3% против 10,6%, соответственно; OR=2,7; 95%CI: 1,2-6,4; p=0,029). При разделении больных на подгруппы в зависимости от количества заготовленных в день первого сеанса лейкоцитафереза CD34+ клеток, были выявлены существенные различия в частоте встречаемости генотипов по гену IL-10. В группе больных с количеством заготовленных CD34+ клеток более 2,5x10<sup>6</sup>/кг, частота встречаемости генотипа IL-10 -592(C/C) оказалась в два раза выше, чем в подгруппе с низким количеством заготовленных CD34+ клеток (60,9% против 28,6%, соответственно OR=3,9; 95%CI: 0,9-16,3; p=0,091). Кроме того, статистически значимое отличие было обнаружено в подгруппе пациентов с ПО на терапию с использованием аутоТГСК. Доля гетерозигот по гену IL-6 в этой подгруппе была выше, чем среди больных с ОХЧО или ЧО (68,4% против 14,3% и 36,4, соответственно OR=5,6; 95%CI: 1,4-23,2; p=0,022).

**Выводы.** Вариант -31(C/C) гена IL-1B ассоциирован с повышенным риском развития ММ. Аллельный полиморфизм генов IL-10 (C-592A) и IL-6 (G-174C) может оказывать влияние на эффективность заготовки CD34+ клеток в результате первого сеанса лейкоцитафереза и глубину ответа после выполнения аутоТГСК, соответственно. Для уточнения значимости вариантов указанных генов в прогнозировании эффекта противомиеломной терапии необходимы дальнейшие исследования с расширением группы больных.

*Симакова Т.С.<sup>1</sup>, Павлова М.А.<sup>1</sup>, Канаева М.Д.<sup>1</sup>, Мозгов С.С.<sup>1</sup>, Афанасьев А.М.<sup>1</sup>, Слепченко А.В.<sup>1</sup>, Суворова А.В.<sup>1</sup>, Кривоносова К.А.<sup>1</sup>, Абрамова А.В.<sup>1</sup>, Логинова М.А.<sup>2</sup>, Павлов А.Е.<sup>1</sup>*

### ТЕСТ-СИСТЕМА ДЛЯ ПОТОКОВОГО HLA-ТИПИРОВАНИЯ – ТРЕБОВАНИЯ И РЕАЛИЗАЦИЯ

<sup>1</sup> ООО «ПАРСЕК ЛАБ»

<sup>2</sup> Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства (КНИИГиПК)

**Введение.** Благодаря своей высокой производительности технология NGS широко применяется для исследования генома, в том числе для HLA-типирования. Однако сама по себе возможность получать большее количество данных за меньшее время не позволяет радикально ускорить наполнение регистра доноров. Многостадийная пробоподготовка множества образцов в ручном режиме занимает много времени, либо требует лабораторной автоматизации. Оценка качества результатов NGS и их интерпретация, с использованием массивов технической информации, представляют собой длительный и трудоемкий процесс, выполняемый высококвалифицированным иммуногенетиком.

**Целью** данной работы являлось разработка и валидация максимально производительной тест-системы, рассчитанной на потоковые исследования для рутинного HLA-типирования потенциальных доноров ГСК.

**Материалы и методы.** Таргетное обогащение

проводилось методом LR-PCR, с последующей ферментативной фрагментацией и лигированием индексированных адаптеров по протоколу Parseq Lab. Секвенирование проводилось на платформе Illumina MiSeq с набором MiSeq Reagent Kit v2 (300). Анализ данных проводился с помощью разработанного ПО PARAllele™ Software с системой поддержки принятия решений (Parseq Lab). Валидация проводилась на образцах геномной ДНК выделенных из цельной крови набором QIAamp DNA Blood Mini Kit. Референсные HLA-генотипы образцов были установлены в Научно-исследовательской лаборатории прикладной иммуногенетики (КНИИГиПК) при рутинном типировании добровольцев методом SBT и NGS в высоком разрешении. Корректность типирования оценивалась путем сравнения с референсными генотипами.

**Результаты.** Разработанная тест-система для HLA-типирования PARAllele™ HLA solution позволяет анализировать до 192 образцов в одном запу-

ске. Анализ проводится по 5 локусам (HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DQB1, HLA-DRB1) с разрешением 3 поля. Пробоподготовка 192 образцов одним лаборантом занимает один рабочий день. Анализ и контроль качества данных выполняется полностью автоматически и не требует ручного присвоения аллелей. Интерпретация результатов по 192 образцам занимает около 30 минут. Расчётная потоковая производительность составляет 25 000 образцов в год для одного секвенатора. Тест-система валидирована на выборке из 2 000 образцов (20 000 аллелей), доля совпадающих аллелей составила 100%.

**Выводы.** Разработка подобного решения потребовала существенной оптимизации протокола

пробоподготовки и алгоритма анализа данных для минимизации трудозатрат персонала лабораторий. При этом увеличение количества типизируемых локусов и разрешения свыше необходимого (для эффективного подбора доноров), приводит к усложнению результирующего генотипа, а также роста его неоднозначности. Все указанные особенности выделяют разработанную тест-систему среди существующих на рынке решений для HLA-типирования методом NGS, рассчитанных в основном на исследовательские, а не клинические задачи.

Разработанная тест-система для потокового HLA-типирования успешно валидирована и внедрена в практическое здравоохранение.

**Суслова Т.А.<sup>1,2</sup>, Крохин А.А.<sup>1</sup>, Вавилов М.Н.<sup>1,2</sup>, Беляева С.В.<sup>1,2</sup>, Евдокимов А.В.<sup>2</sup>, Родионова Е.С.<sup>1</sup>, Султанова А.А.<sup>2</sup>, Чуманова Е.А.<sup>2</sup>, Миронова Е.А.<sup>2</sup>, Кофиади И. А.<sup>3</sup>**

## **ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ, ПРЕДРАСПОЛАГАЮЩИЕ К РАЗВИТИЮ COVID-19 (HLA, ABO, RH-IR)**

<sup>1</sup>ГБУЗ «Челябинская областная станция переливания крови», Челябинск

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет», Челябинск

<sup>3</sup>ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Москва

Эпидемия новой коронавирусной инфекции затронула население Челябинской области. По данным Роспотребнадзора (20.05.2021) всего в области зарегистрировано 62069 случаев заболевания (показатель на 100 тыс. населения -1790,6).

**Цель работы** – выяснить наличие/отсутствие генов предрасположенности систем HLA, Rh-Нг, ABO к возникновению и развитию коронавирусной инфекции у населения Челябинской области, русских. Был проведен анализ распределения HLA, ABO, Rh-Нг среди доноров Челябинской областной станции переливания крови.

**Материалы и методы.** Статистическую обработку результатов исследований проводили с применением стандартных методов. Были рассчитаны частоты генов, антигенов. Достоверность различий оценивали с помощью критерия  $\chi^2$ , различия считались значимы при  $p \leq 0,05$ .

Для расчета частот генов HLA из Регистра потенциальных доноров стволовых клеток были сформированы когорты: 1) группа доноров, имевших в анамнезе факт заболевания коронавирусной инфекцией за период 2020 – апрель 2021 года – 90 человек 2) группой сравнения служили доноры Регистра, не отмечавшие факт заболевания в этот период и не включенные в Федеральный регистр лиц, больных COVID-19 (ФР) – 90 человек. HLA-типирование было выполнено донорам при их вступлении в Регистр методом SSP по локусам HLA -A,B,C,DRB1,DQB1.

Для анализа распределения групп крови ABO были сформированы следующие группы сравнения: 3) доноры, сдававшие кровь за период ноябрь 2020 – апрель 2021, не болевшие COVID-19 и не состоявшие в ФР – 476, 4) доноры, инфицированные SARS-Cov-2 и перенесшие заболевание в легкой или бессимптомной форме с наличием антител к воз-

будителю – 381 человек 5) доноры антиковидной плазмы, перенесшие двустороннюю пневмонию без сопутствующих хронических заболеваний – 133 человека 6) группа пациентов антиковидного госпиталя, перенесших двустороннюю пневмонию и с наличием различной сопутствующей патологии (сердечно-сосудистой, онкологической, др) – 107 человек.

Для сравнения распределения антигенов системы Rh-Нг были использованы следующие группы доноров: 3), 4), 5).

**Результаты.** Сравнение частот генов HLA: A, B, C, DRB1, DQB1 у доноров, перенесших COVID-19, показало, что у лиц, инфицированных SARS-Cov-2, в сравнении с донорами отрицающими факт заболевания за исследуемый период наблюдается некоторое повышение частоты C\*03 ( $gf=0,063$  и  $gf=0,041$ , соответственно) и снижение DRB1\*14 ( $gf=0,004$  и  $gf=0,024$ , соответственно) на уровне тенденции, что позволяет предположить возможную предрасполагающую роль HLA-C\*03 для развития заболевания и протективную роль HLA-DRB1\*14 у русских Челябинской области. Обе обнаруженные ассоциации являются ассоциациями слабой силы.

Распределение антигенов системы ABO в исследуемых группах выявило значительное достоверное повышение доли лиц со второй группой крови А среди реконвалесцентов двухсторонней пневмонии как с наличием сопутствующих хронических заболеваний (48,60%), так и без них (41,18%). В группе доноров, инфицированных за исследуемый период времени (имеющих антитела к возбудителю), но отрицающих факт заболевания, он составил 32,02%. В контрольной группе доноров, не инфицированных коронавирусом и не имеющих антител к возбудителю за период ноябрь 2020 – апрель 2021, этот пока-



затель составил 25,4%.

Антиген 0, наоборот, встречался значительно чаще среди доноров, не имеющих антитела к коронавирусу (45,17%), в то время как среди доноров, перенесших двустороннюю пневмонию, он составил 25,21%, а у больных, перенесших двустороннюю пневмонию с сопутствующими хроническими заболеваниями – 26,17%, что достоверно ниже ( $p < 0,05$ ).

В распределении генов и фенотипов системы Rh-Hr отмечено достоверное повышение частоты гена E (и фенотипа, включающего его гомозиготный вариант – DссEE) у больных, перенесших двусторон-

нюю ковидную пневмонию 32,33% (4,51%), а также в группе доноров, имеющих антитела к SARS-Cov-2 31,5% (3,41%), в сравнении с донорами, не имеющими антител 23,95% (1,68%). Ген E системы Rh-Hr, таким образом, можно считать фактором, предрасполагающим к развитию инфекции.

**Выводы.** Таким образом, потенциальными факторами риска развития COVID-19 у русских Челябинской области могут быть гены HLA-C\*03, антиген A системы ABO и E системы Rh-Hr. В качестве протективных факторов можно отметить ген HLA DRB1\*14 и группу крови 0(I) системы ABO.

*Ясинская А.П., Сокольникова П.С., Белянская Ю.В., Волкова О.Я.*

### ПРИМЕНЕНИЕ ЛИНЕЙНО-СПЕЦИФИЧЕСКОГО ГЕМОПОЭТИЧЕСКОГО ХИМЕРИЗМА В КАЧЕСТВЕ МАРКЕРА СОСТОЯНИЯ ТРАНСПЛАНТАТА ПОСЛЕ АЛЛОГЕННОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

*Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург*

**Введение.** Аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК) является одним из важнейших, а иногда и единственным эффективным стандартизированным методом лечения пациентов с гемобластозами. Ее выполнение сопряжено с высокими рисками осложнений для пациентов, что требует разработки чувствительных методов мониторинга состояния пациента после трансплантации. Исследование гемопоэтического химеризма (ГХ) в отдельных субпопуляциях лейкоцитов (линейно-специфический ГХ – ЛСГХ) является высокочувствительным тестом, который позволяет своевременно выявить изменения в трансплантате и адекватно оценить состояние пациента после алло-ТГСК.

**Целью** настоящего проспективного исследования было изучение диагностических возможностей мониторинга ЛСГХ для оценки состояния трансплантата после алло-ТГСК.

**Материалы и методы.** В исследование было включено 22 пациента с гемобластозами (12 мужчин и 10 женщин) в возрасте от 18 до 61 года (медиана возраста – 35 лет) перенесших алло-ТГСК от HLA-совместимого (4 человека), либо гаплоидентичного родственного донора (18 человек). Исследование общего ГХ и ЛСГХ осуществлялось методом фрагментного анализа коротких tandemных повторов (short tandem repeats = STR) с использованием коммерческих наборов реагентов COrDIS Plus (ООО «ГОРДИЗ», Россия). Клеточные популяции (ГСК – CD34+ и субпопуляции Т-лимфоцитов – CD3+) были получены путем сортировки клеток из образцов костного мозга методом проточной цитометрии (BD FACSAria III (BD Biosciences, США). Оценка и анализ результатов фрагментного анализа проводились на генетическом анализаторе «НАНОФОР-05» (ИАП РАН, Россия) с использованием программы «ДНК Фрагментный Анализ», версия 5.0.1.6 (ИАП РАН, Россия).

**Результаты.** В результате проведенного исследования общего ГХ на 30 день после алло-ТГСК у 12 (55%) пациентов выявлен полный донорский химеризм (ПДХ) и зафиксировано приживание трансплантата, у 10 человек (45%) определен смешанный ГХ (СГХ). При исследовании ЛСГХ в CD34+ и CD3+ клетках в эти же сроки у большинства пациентов наблюдалась сходная картина, однако у 4 человек было выявлено несоответствие показателей общего и линейно-специфического ГХ. Так у 2-х пациентов на фоне ПДХ в общем пуле лейкоцитов и в CD34+ клетках наблюдалось снижение ГХ в популяции Т-лимфоцитов, что может быть связано с отсрочкой восстановления Т-лимфоцитарного ростка кроветворения, либо с индивидуальными особенностями клинической картины, которые требуют дальнейшего изучения. Еще у одного человека СГХ был выявлен только в общем пуле лейкоцитов, тогда как в отдельных популяциях определялся ПДХ. Данное несоответствие может быть объяснено тем, что снижение общего ГХ произошло за счет других клеточных линий, не вошедших в настоящее исследование. У четвертого пациента на фоне СГХ в общей популяции лейкоцитов и ПДХ в Т-лимфоцитах в CD34+ клетках определялось отсутствие донорского химеризма (ОДХ), что было связано с развитием изолированного нейрорецидива с сохранением костно-мозговой ремиссии. Последующий мониторинг общего химеризма и ЛСГХ показал раннее снижение показателей ГХ в CD34+ клетках по сравнению с CD3+ и общим пулом лейкоцитов у пациентов с эпизодами отторжения трансплантата и/или рецидива основного заболевания.

**На основании полученных результатов были сделаны следующие выводы:**

1. показатель ЛСГХ в CD34+ клеточной популяции характеризует более раннее изменение состояния трансплантата, в сравнении с показателями ГХ

в общем пуле лейкоцитов и в CD3+ клетках;

2. развитие изолированных костномозговых рецидивов и/или вторичного отторжения трансплантата сопровождается резким снижением ГХ в общем пуле лейкоцитов и CD34+ клеточной линии;

3. исследование ЛСГХ наряду с общим ГХ в ру-

тинной практике позволяет повысить точность посттрансплантационного мониторинга химеризма и своевременно реагировать на изменения в состоянии пациента после алло-ТГСК.

**Ханов А.Г.<sup>1</sup>, Палухин С.И., Ищенко И.В., Труфанова Т.И., Кудинова Э.Е., Савченко О.А., Костенко Ю.В.<sup>2</sup>, Козель Ю.Ю.<sup>3</sup>, Аллавердян А.И.<sup>4</sup>, Мамедов Х.А.<sup>5</sup>**

## **РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ЧАСТОТЫ АНТИГЕНОВ ЛОКУСОВ HLA-A, -B И АЛЛЕЛЬНЫХ ГРУПП ГЕНА HLA-DRB1 У ПАЦИЕНТОВ С РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ В РОСТОВСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ**

<sup>1</sup> ГБУ РО «Областная клиническая больница №2», г. Ростов-на-Дону

<sup>2</sup> ГБУ РО «Станция переливания крови», г. Ростов-на-Дону

<sup>3</sup> ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России, г. Ростов-на-Дону

<sup>4</sup> ФГБОУ ВО МГМСУ им. А.И. Евдокимова Минздрава России, г. Москва

<sup>5</sup> ФГБОУ ВО РостГМУ Минздрава России, г. Ростов-на-Дону

**Введение.** Ревматоидный артрит (РА) – наиболее распространённое хроническое системное с прогрессирующим течением аутоиммунное воспалительное мультифакториальное заболевание, характеризующееся симметричным полиартритом, поражающим преимущественно периферические суставы кистей и стоп по типу эрозивно-деструктивного артрита. Клиническая картина заболевания варьирует от легкой степени до тяжелого инвалидизирующего эрозивного артрита. С учетом рекомендаций ACR, EULAR к числу основных диагностических лабораторных маркеров при РА относят определение широкого спектра аутоантител, ревматоидного фактора класса IgM, антител к циклическому цитруллинированному пептиду (АЦЦП) и маркеров воспаления – СОЭ и СРБ.

Исследованиями установлено, что наличие у пациентов европейских популяций аллелей HLA-DRB1 \*04:01, \*04:04, \*04:08, а азиатских популяций – \*04:05, значительно повышает риск развития РА. Перечисленные аллели ассоциированы с АЦЦП-положительным РА. У пациентов с высоким АЦЦП наблюдается более активное течение заболевания, более высокий индекс DAS28 и быстрое прогрессирование эрозивных изменений в суставах. Достигнуты значительные успехи в лечении РА, но сложности в диагностике заболевания ещё существуют. Определение иммуногенетических маркеров у пациента с подозрением на РА становится важным дополнительным лабораторным исследованием для диагностики, прогноза течения заболевания и своевременного начала лечения.

В ЗЛИТТ ГБУ РО «СПК» в течение 2019-2020 гг. проводилось HLA-типирование пациентов: HLA I класса (-A, -B) и II класса (DRB1) для раннего подтверждения диагноза РА и других воспалительных ревматических заболеваний.

**Цель** данного исследования – провести анализ распределения частоты антигенов локусов HLA-A, -B и аллельных групп гена HLA-DRB1 у пациентов с ревматоидным артритом, проживающих в Ростовской области.

**Материалы и методы.** Все обследованные пациенты находились на стационарном лечении в ревматологическом отделении ГБУ РО «ОКБ №2». Анализ проведен в общей группе пациентов с РА (n=41) и в группах серопозитивного (n=18) и серонегативного (n=23) артрита. Контрольная группа (n=694) представлена здоровыми жителями региона (доноры регистра ГСК). Серологическое типирование HLA-A,-B проводилось с помощью комплементзависимого лимфоцитотоксического теста с использованием реактивов фирмы Дилен. Группы аллелей гена DRB1 определялись с помощью полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с использованием реактивов HLA-ДНК-ТЕХ. Частота групп аллелей при этом рассчитывалась с помощью программы «Арлекин» (версия 3.5). Достоверность различий оценивали по критерию Х2, с поправкой Йетса. Определяли относительный риск (RR), этиологическую (EF) и превентивную (PF) фракции.

**Результаты.** Установлено, что в группе пациентов с серонегативным РА достоверно повышена частота антигена HLA A1 (x2 – 6,43; p≤0,05) и B8 (x2 – 4,24; p≤0,05) и достоверно снижена частота B35 (p≤0,05). Отмечено незначительное повышение частоты антигена HLA B27, при серопозитивной форме РА (17,6%) и в общей группе (15,3%) по сравнению с контрольной группой (10,7%). Достоверно, по сравнению с контролем (20%) повышена частота группы аллелей DRB1\*04 в общей когорте пациентов с РА – 46,3% (x2 – 14,36; p≤0,001) и в группе больных с серопозитивным артритом – 61,1% (x2 – 15,42; p≤0,001). Значение уровня достоверности, величина RR, увеличение частоты аллельной группы DRB1\*04 с высокой вероятностью указывают на ассоциативную связь с заболеванием РА у пациентов, проживающих в Ростовской области. Необходимо отметить, что во всех трех группах наблюдалось некоторая тенденция к увеличению частоты группы аллелей DRB1\*01 (общая группа РА – 26,8%; серопозитивный артрит – 27,7%; серонегативный – 26,1%), по сравнению с контролем (19,6%), но эти различия не-

достоверны. В общей группе пациентов при серонегативном РА установлено статистически достоверное снижение частоты HLA-DRB1\*13 ( $p \leq 0,05$ ). Этот показатель снижен и при серопозитивном артрите (11,1%) по сравнению с контролем (24,4%), но различия статистически недостоверны. Кроме того, достоверно ( $p \leq 0,05$ ) снижена частота группы аллелей HLA-DRB1\*11 в общей когорте больных (14,6%) и при серонегативном РА, по сравнению с контролем

(28,5%).

Таким образом, установлено, что для жителей Ростовской области иммуногенетическим фактором, ассоциированным с развитием РА, HLA-DRB1\*04, протективными факторами в отношении развития этого заболевания являются группы аллелей HLA-DRB1\*11 и HLA-DRB1\*13.

***Hovhannisyanyan A., Madelian V., Avagyan S., Nazaretyan M., Mayilyan K., Yepiskoposyan L., Hyussyan A., Sirunyan A., Arakelyan R., Manukyan Z., Jordan F.***

### **GENETIC LIABILITY OF HLA-C\*04:01 ALLELE FOR SEVERITY OF COVID-19 IN ARMENIAN POPULATION**

*Institute of Molecular Biology, National Academy of Sciences, Yerevan, Armenian  
Armenian Bone Marrow Donor Registry, Yerevan, Armenia*

The novel coronavirus (SARS-CoV-2) infection has recently emerged and become a global health concern causing COVID-19 pandemic.

While some COVID-19 patients suffer rather mild or even no symptoms, others may develop severe respiratory complications. Understanding how variation in HLA is related to the COVID-19 clinical manifestation could help clinicians to identify patients who are likely to progress to severe disease outcomes. However, yet little is known about the potential link between HLA alleles and COVID-19 clinical course.

We aimed to identify associations between common HLA alleles and COVID-19 severity in the Armenian population. A total of 299 COVID-19 patients were classified into three groups according to the disease severity.

Typing for class I and II classical HLA genes was performed using Next-Generation Sequencing (NGS).

For contextualization of the HLA-allele contribution to COVID-19 severity, the data of 5,328 individuals from

the general Armenian population were used.

Patients were further classified into three groups according to the disease symptoms. In the severe disease subgroup of patients ( $n=122$ ) were those who required critical care such as ICU or ventilator.

The mild disease group ( $n=102$ ) included patients who were hospitalized but not required ventilators or ICU care, or those recuperating at home.

The asymptomatic group ( $n=75$ ) consisted of subjects with no symptoms, but who have tested positive for the virus.

We found that the allelic-load of HLA-C\*04:01 was associated with a significant increase in severity of COVID-19 clinical manifestations and advanced age of the patients.

Nevertheless, the link between genotype and age was secondary to the former, a much stronger association. Thus, our findings underscore a plausible role of HLA molecules in the clinical manifestation of the COVID-19 infection.

***Blau Olga, Blau Igor-Wolfgang***

### **IMPACT OF MOLECULAR GENETIC STUDIES IN ALLOGENEIC STEM CELL TRANSPLANTATION IN AML PATIENTS**

*Charité University Berlin, Clinic for Hematology, Oncology and Tumorimmunology,  
Berlin Germany*

Acute myeloid leukemia (AML) is a heterogeneous disease with very different disease biology and response to conventional treatments. Achieving complete remission (CR) with complete hematological recovery gives better long-term results than morphological remission with or without incomplete recovery of peripheral blood parameters. Among patients who achieve only morphological remission, a measurable (or "minimal") level for residual disease (MRD) provides important prognostic information. Numerous studies have shown that achieving a negative MRD is a reliable predictor of better long-term outcomes in AML patients.

Interestingly, the recently revised European Leukemia Net recommendations for AML management have introduced the category CR without MRD.

AML is the most common indication for alloSCT. Improvements in disease risk stratification using genetic and MRD technologies allow for the correct identification of high-risk patients who require alloSCT. The increased donor availability combined with modern conditioning regimens, has significantly increase access of alloSCT for high-risk AML patients.

Despite the accumulated experience over the last four decades, relapse continues to represent the

commonest cause of transplant failure. Therefore, the development of strategies with the potential to reduce disease recurrence represents a serious need. A number of retrospective analyses showed that MRD level prior alloSCT is an important prognostic risk factor of relapse. Therapy before alloSCT can affect both the MRD status before transplantation and the relapse risk after allograft. Thus, treatment aimed at reducing the burden of MRD before alloSCT may improve transplant outcome.

Along with the achievement of CR with MRD negativity, genetic markers of AML have significant predictive effect on clinical outcome and usually guide treatment strategies. In over 90% of AML patients, different molecular aberrations may be identified by next-generation sequencing (NGS). This technology use into clinical practice for the initial mutational screening at the time of AML diagnosis. Moreover, the use of NGS for MRD detection is attractive because its flexibility allow almost every mutated gene to be used as a MRD marker.

However, it must be assumed that some mutations can occur in hematopoietic cells as a part of clonal

hematopoiesis (CH). CH is found in a population of cells derived from somatically mutated hematopoietic stem cells. This process often accompanies aging, and then it is called age-related CH (ARCH). On the other hand, CH can also be a precursor of hematological neoplasms. In that cases it is called CH with indeterminate potential (CHIP).

The presence of CHIP with a fraction of mutant alleles of at least 2% in individuals without any signs of neoplasms is associated with an increase of hematopoietic malignancies up to a maximum of 1% per year. The most frequently mutated gene in CH is DNMT3A, which, as shown in previously studies, could not predict relapse of disease as a marker of MRD.

In conclusion, molecular genetic studies is widely applicable to AML patients, is highly predictive of relapse and survival, and can help clarify the indications for alloASCT and post-transplantation management in AML patients.