

Краткий аналитический отчет о результатах выполненных научных исследований и разработок за 2016 год

1. «Молекулярные, генетические и клеточные механизмы реализации патологических процессов в организме человека при заболеваниях системы крови» (фундаментальная)

Полученные наиболее важные результаты

Раздел: «Молекулярно-генетическое исследование гемофилии А и В в России»

В 2016 году значительно увеличено число больных гемофилией А, для которых определены мутации в гене фактора VIII. На данный момент мутации определены у 128 неродственных пациентов преимущественно с тяжелой формой заболевания. Распространенная инверсия *inv22* выявлена у 70 из 139 обследованных больных (50%). Во всех случаях, когда речь шла о спорадической гемофилии (мутация *de novo*, первый больной в семье), матери пробандов были носительницами этого генетического дефекта. Сопоставление с данными семейного анализа полиморфных маркеров показывает, что пробанд в таких семьях, как правило, наследует ген фактора VIII своего здорового деда, что согласуется с существующим представлением о том, что инверсия *inv22* возникает *de novo* гораздо чаще в сперматогенезе, чем в оогенезе. Более редкая инверсия *inv1* выявлена у 5 из 242 пациентов случаях (2,1%). Не инверсионные мутации найдены у 53 пациентов. Всего выявлено 48 различных генных дефектов, 28 из которых являются новыми и ранее в мировой популяции не встречались. Среди найденных нарушений преобладают миссенс-мутации (25,52%) и нонсенс-мутации (9,19%). Наиболее распространенной оказалась мутация *c.3637delA*, она встретилась у 5 неродственных пациентов. Еще 4 мутации (*c.4379_4380insA*, *His634Arg*, *His2026Arg*, *Arg2228Gln*) встретились дважды. Остальные мутации были уникальными, т. е. выявились у единичных пациентов. Полностью охарактеризованы с определением точек разрыва две масштабные делеции в гене фактора VIII, *del ex6* и *del ex7-12*. Протяженность делеции *del ex6* — 3748 пн, делеции *del ex7-12* — 29 960 пн. Идентифицированы мутации в гене фактора VIII у двух женщин с клиническими проявлениями гемофилии А. В дополнение к заявленному изначально плану мы расширили в 2016 году наше исследование, включив в него более редкие коагулопатии — различные варианты фибриногенемии (афибриногенемия, дисфибриногенемия, гипофибриногенемия), а также дефицит фактора VII и фактора XII (болезнь Хагемана). Найдены мутации в одном из генов фибриногена (*FGA*, *FGB* или *FGG*) у 4-х пациентов с различными формами фибриногенемии, а также мутации в гене *FVII* у 4-х пациентов с дефицитом фактора VII и мутации в гене *FXII* у 4-х пациентов с болезнью Хагемана. Среди выявленных мутаций новыми оказались *CD66 delT* в гене *FGA*, замена *CD222 AAG-AAA* в гене *FGG*, нарушающая сплайсинг, миссенс-мутация *Gln283Arg* в гене *FGB* и миссенс-мутация *Gly22Arg* в гене *FVII*. Проведена практическая диагностика носительства гемофилии А для женщин из 22 семей, в том числе 2 пренатальных ДНК-диагностики. В большинстве случаев использовали параллельно два подхода — косвенную диагностику по полиморфным маркерам и прямую диагностику с определением мутаций в гене фактора VIII.

Раздел: «Роль клонального Т-клеточного компонента в патогенезе В-клеточных заболеваний»

Проведено исследование клональности по генам тяжелой цепи иммуноглобулина IGH (*VH-JH*, *FRI/FRII/FRIII*), бета цепи Т-клеточного рецептора *TCRB* (*Vβ-Jβ/ Dβ-Jβ*), гамма цепи Т-клеточного рецептора *TCRG* (*Vγ-Jγ*) у 8 пациентов с диагнозом ревматоидный артрит (РА) и 6 пациентов с диагнозом системная красная волчанка (СКВ). У всех

пациентов выявлены поликлональные реаранжировки генов IgH. В большинстве случаев при ревматоидном артрите и системной красной волчанке была обнаружена поли- (у 4 из 14 пациентов) или олигоклональная (у 7 из 14 пациентов) картина реаранжировок генов TCRG и TCRB. Моноклональность Т-лимфоцитов в общей популяции, т. е. присутствие доминирующего клонального продукта, была обнаружена у 3 пациентов из 14 (21%). Чтобы получить представления об иммунофенотипе данных клеточных клонов, мы подвергли клетки селекции у 7 пациентов (5 РА и 2 СКВ). Для селекции были выбраны преимущественно пациенты с олигоклональной и моноклональной картиной в общей популяции Т-лимфоцитов. Из лейкоцитов периферической крови были выделены две популяции лимфоцитов: CD4+, CD8+. Исследование клональности в данных популяциях Т-лимфоцитов показало, что клональные лимфоциты присутствовали как в CD4+, так и в CD8+ популяции Т-лимфоцитов. Ни в одном случае, не было найдено изолированного присутствия моноклональных пиков в CD8+ популяции лимфоцитов, что было характерно для аутоиммунной гемолитической анемии (АИГА) и было показано нами ранее. Данное отличие являлось статистически значимым для пациентов с АИГА ($p < 0,0001$).

Раздел: «Биофизические свойства популяции эритроцитов у больных с нарушением эритропоэза»

Исследована динамика изменения РЭПП во время инкубации эритроцитов при 37°C. Показано, что у здоровых добровольцев и у большинства пациентов с различными заболеваниями системы крови после суточной инкубации эритроцитов при 37°C наблюдается уменьшение плотности эритроцитов, вызванное увеличением объема эритроцитов вследствие спровоцированного накоплением лактата снижения рН крови. Через 2-е суток инкубации плотность эритроцитов увеличивалась. Причиной этого является активация Гардос каналов, спровоцированная увеличением уровня внутриклеточных ионов кальция вследствие метаболического истощения эритроцитов. Этот вывод был подтвержден исследованием изменений РЭПП в присутствии активатора Гардос каналов пропранолола. Через 4 суток инкубации были выявлены фракции эритроцитов со сниженной плотностью (постлитические) и был зарегистрирован гемолиз эритроцитов. Результаты исследования динамики изменений РЭПП при физиологической температуре позволили выявить пациентов с ускоренным метаболическим истощением эритроцитов. В основном это были пациенты с талассемией, некоторые пациенты с АИГА. У пациентов с талассемией наблюдается ускоренное увеличение плотности эритроцитов вследствие изначально сниженного уровня АТФ в эритроцитах. Поэтому они быстрее, чем здоровые эритроциты разрушаются в селезенке, что приводит к ее увеличению.

Получены новые результаты, демонстрирующие влияние свойств популяции эритроцитов на гемостаз. Выявлена положительная корреляция между объемом интраоперационной кровопотери (ОИК) во время эндопротезирования коленного сустава у пациентов с гемофилией А с гематокритом более 38,5% и средней плотностью эритроцитов.

Впервые показано, что включение эритроцитов в кровяной сгусток зависит не только от гематокрита, но и от плотности эритроцитов. При снижении гематокрита крови и увеличении плотности эритроцитов гематокрит кровяного сгустка (объемная доля эритроцитов в кровяном сгустке) уменьшается.

Получены предварительные результаты, показавшие, что антикоагулянтная терапия нефракционированным гепарином и ксарелто уменьшает включение эритроцитов в кровяной сгусток, а клексан, тромбоасс и клопидогрел практически не влияют на свойства кровяного сгустка.

Метод исследования распределения эритроцитов по плотности опубликован и используется в Гематологическом научном центре МЗ РФ для оценки свойств популяции эритроцитов. Результаты исследований опубликованы и доложены на научных конференциях и семинарах. Метод исследования свойств кровяного сгустка находится в стадии разработки. Предполагается его внедрение в качестве дополнительного критерия оценки причин тромбозов и геморрагий и выбора оптимальных методов коррекции гемостатических нарушений.

Раздел: «Изучение пространственной динамики свертывания крови»

Проведены тестовые эксперименты *in vitro* для поиска качественного влияния тиоловых изомераз на биохимический каскад свертывания крови. В ходе экспериментов выяснилось, что характер процессов свертывания не изменяется в ответ на ингибирование тиоловых изомераз.

Проведена серия экспериментов по выращиванию тромбов в конвективных условиях. Выяснилось, что метод выращивания тромбов в условиях потока не поддается стандартизации.

В связи с этим была отработана методика выращивания тромбов в стационарных условиях в пробирке с последующим переносом в экспериментальную установку для изучения процессов фибринолиза в гидродинамических условиях.

2. «Изучение иммуномодулирующих свойств мультипотентных мезенхимных стромальных клеток с целью повышения терапевтической эффективности у больных после трансплантации аллогенных стволовых клеток» (фундаментальная)

Полученные наиболее важные результаты

Изучен уровень экспрессии генов у пациентов с гемобластомами и здоровых доноров в ММСК и КОЕф, при этом оценивался относительный уровень экспрессии ряда генов, отвечающих за способность к самоподдержанию (FGFR1, FGFR2, PDGFRA, PDGFRB), пролиферацию (FGF2), морфогенез (BMP4, SOX9, SPP1, BGLAP, PPARG, VEGF), регуляцию кроветворения (Jag1, TGFB2, TGFB1, CSF, ANG1) и иммунный ответ (IL1b, IL1R, IL6, IL8).

Все ММСК, полученные из образцов КМ пациентов, морфологически не отличались от таковых, полученных от здоровых доноров. В исследовании было выявлено увеличение времени первого пассажа ММСК у пациентов с гемобластомами, в сравнении со здоровыми донорами и снижении суммарной клеточной продукции за 3 пассажа у больных с ОМЛ, что, возможно, обусловлено уменьшением количества стромальных предшественников или нарушением их пролиферации в связи с тотальной экспансией бластных клеток, подавляющих нормальное кроветворение. Кроме того, было показано, что в дебюте повышена экспрессия генов способствующих пролиферации лейкозных клеток и генов, ингибирующих пролиферацию и миграцию ММСК, в ходе терапии уровни генов, отвечающих за дифференцировку ММСК, восстанавливались, в частности экспрессия генов IL-6, IL1b1, CSF, VCAM, IGF1 и др. При этом в ходе терапии отмечалось повышение уровня экспрессии гена PDGFRA, кодирующего белок, который является рецептором к фактору роста — PDGFa. PDGFRA является мощным митогеном для клеток мезенхимального происхождения. Он играет важную роль в ангиогенезе, а также обладает способностью к поддержанию кроветворения. Повышение его экспрессии в ходе терапии

свидетельствует о восстановлении микроокружения. Изучена экспрессия генов, ответственных за морфогенез ММСК: остеокальцина (BGLAP), SOX9, при этом показано значительное снижение уровня экспрессии генов в дебюте заболевания и постепенное увеличение в ходе терапии.

Были изучены в динамике изменения в популяции ММСК, активированных интерфероном-гамма (ИФН). Костномозговые ММСК человека культивировали в стандартных условиях, добавляя в среду культивирования ИФН в различных концентрациях. Показано, что суммарная клеточная продукция ММСК достоверно снижается при длительном культивировании в присутствии ИФН, тогда как 4-х часовое воздействие не влияет на клеточную продукцию. Через 4 часа культивирования уровень экспрессии IDO1 повышается в 300 раз, CSF1 в 7, а IL6 в 2,4 раза, что существенно повышает иммуномодулирующие свойства ММСК. По мере культивирования ММСК после обработки ИФН в течение 4-х часов наблюдалось значительное увеличение экспрессии HLA-ABC и HLA-DR. При использовании ММСК от собственного донора гемопоэтических стволовых клеток повышение экспрессии HLA-DR не имеет иммунологического значения. Анализ активации ММСК показал, что обработка ими клеток в использованных дозах в течение 4-х часов существенно не влияет на клеточную продукцию за 4 суток.

При изучении ингибирования пролиферации лимфоцитов ММСК доноров были выявлены изменения в самих ММСК после взаимодействия с аллогенными лимфоцитами. При добавлении активированных лимфоцитов (культивирование в присутствии ФГА) клеточная продукция уменьшалась независимо от предварительной обработки ИФН. В культурах, предварительно обработанных ИФН, при ко-культивировании с активированными лимфоцитами не происходило снижения пропорции живых клеток, что может указывать на сенсбилизацию клеток к факторам, выделяемым активированными лимфоцитами. Таким образом, впервые в системе *in vitro* получены результаты, указывающие на существенные изменения свойств ММСК при попадании в организм, где эти клетки взаимодействуют с лимфоцитами в кровяном русле и в тканях.

Также были оценены различия в способности ММСК ингибировать пролиферацию аллогенных и сингенных активированных к делению лимфоцитов с помощью метода окрашивания Carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) лимфоцитов. В предварительных экспериментах не было отмечено различий в ингибировании пролиферации активированных сингенных и аллогенных лимфоцитов. В случае аллогенных лимфоцитов пролиферация снижалась в $2,2 \pm 0,6$ раза, а в случае сингенных в $2,0 \pm 0,5$ раза.

Продолжено изучение иммуномодулирующих свойств ММСК для профилактики острой РТПХ после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток крови. Введение ММСК снижало развитие РТПХ у больных с родственными донорами в 2 раза по сравнению с больными, которым не вводили ММСК. Профилактика была неэффективна в 13,5% случаях. В неэффективных образцах ММСК было выявлено достоверное снижение суммарной клеточной продукции и относительного уровня экспрессии генов CFH, FGFR1, PDGFRa и ICAM1. Полученные данные впервые указали на возможные механизмы защиты организма от развития РТПХ. Снижение уровня экспрессии фактора комплемента H (CFH) связано со снижением цитотоксичности T-регуляторных клеток, а молекулы адгезии лимфоцитов ICAM1 с возможным недостатком взаимодействия между лимфоцитами и ММСК. Результаты открывают новые возможности анализа образцов ММСК, которые могут иметь прикладное значение при использовании этих клеток для эффективной профилактики и лечения РТПХ.

Изучено значение внутрикостного введения ММСК для пациентов с несостоятельностью трансплантата. После восстановления показателей периферической крови выполнены пункции костного мозга, при этом через 3 и 5 месяцев после введения в пунктате костного мозга больных были обнаружены ММСК доноров. У 1 больного в небольшом проценте были обнаружены ММСК донора в 3-х образцах из 4-х, у другого больного 3 в одном из 4-х образцов в 18,6% наблюдались донорские клетки. При анализе суммарной клеточной продукции ММСК у этих больных была выявлена тенденция к лучшему росту образцов, содержащих донорские ММСК. Таким образом показано, что функционально адекватные ММСК донора способны длительно существовать в костном мозге больного.

3. «Изучение молекулярных, цитогенетических, морфологических основ заболеваний системы крови с целью выявления молекулярно-биологических маркеров, улучшения диагностики, адекватного подбора дифференциальной терапии и мониторинга заболевания» (фундаментальная)

Получены наиболее значимые результаты

Раздел: «Исследование гемопоэтических предшественников у пациентов с гемобластомами после спленэктомии»

В результате проведенных исследований выявляется характерная динамика изменения как абсолютного, так и относительного количества гемопоэтических клеток предшественников у пациентов с гемобластомами после проведенной спленэктомии. У большинства пациентов обнаруживается тенденция к увеличению абсолютного числа гемопоэтических клеток-предшественников после проведенной спленэктомии на протяжении 7 суток с последующим снижением к исходному значению через 14 суток. Для отдельных нозологий полученные данные являются крайне гетерогенными в связи с малым объемом выборок. Для относительного количества стволовых клеток в периферической крови выявлена тенденция к уменьшению их числа через сутки после проведенной спленэктомии.

Раздел: «Роль онкогенных мутаций в прогнозе лимфопролиферативных заболеваний»

Проанализированы больные ДВККЛ, которым была выполнена терапия по программе mNHL-BFM-90 или R-DA-EPOCH/R-HMA. Выполнен одно- и многофакторный анализ с использованием таких критериев как пол, возраст, молекулярный тип ДВККЛ, нодальный или экстранодальный тип, наличие более 1 экстранодального очага поражения, высокая активность ЛДГ, наличие В-симптомов, стадия и МПИ, высокая пролиферативная активность ($Ki-67 > 80\%$), наличие мутаций гена MYD88. По данным этого анализа выявлено, что независимым прогностическим признаком при выполнении данных схем терапии является мутационный статус гена MYD88.

В результате проведенного исследования был отработан метод, позволяющий определить наличие мутации гена MYD88 в тканях, фиксированных в формалине и заключенных в парафиновые блоки, а также замороженных образцах ДНК. Мутация L265P MYD88 была выявлена в 26,4% случаев ДВККЛ nonGCB-типа, что соответствует данным литературы.

У пациентов с мутацией L265P MYD88 преобладали экстранодальные формы ДВККЛ (78,5%) с высоким уровнем пролиферативной активности и ЛДГ. Половина больных ДВККЛ MYD88-mut были старше 60 лет. Вероятно, это связано с увеличением количества случаев nonGCB-типа ДВККЛ в старшей возрастной группе. Так, у пациентов старше 80

лет ДВККЛ постгерминального происхождения диагностируется практически в 67% случаев против 28% в группе больных ДВККЛ от 50 до 60 лет.

Обращает на себя внимание тот факт, что мутация L265P MYD88 была выявлена у 5 (55,6%) из 9 больных ДВККЛ иммунопривилегированных органов ($p = 0.04$).

Большое число работ, выполненных за последнее десятилетие, раскрыли не только каскадные механизмы функционирования ВКР, но привели к созданию летальных для опухолевой В-клетки таргетных препаратов. Применение препаратов — ингибиторов молекул сигнальных путей ВКР и ТПР, вызывающих обрыв сигнала, активирующего NF- κ B, представляется перспективным. Установлено, что результат применения тирозинкиназного ингибитора — ибрутиниба зависит от «уровня» мутаций ключевых генов сигнального пути ВКР-NF- κ B (CD79b и CARD11), а также наличия мутации гена MYD88. В исследовании у больных с рефрактерным течением/рецидивом ДВККЛ nonGCB-типа ибрутиниб продемонстрировал эффективность у пациентов с мутацией гена CD79b. При сочетанных мутациях генов CD79b и MYD88 опухоль оказывается еще более чувствительной к применению таргетного препарата. Тогда как наличие мутации L265P MYD88 и гена CD79b дикого типа является предиктором резистентности больных ДВККЛ nonGCB-типа при применении ингибитора БТК. Молекулярный механизм описанной взаимообусловленности мутаций генов сигнальных путей ВКР и ТПР на сегодня неизвестен. Ибрутиниб также неэффективен при мутациях гена CARD11. Таким образом, применение ибрутиниба целесообразно у больных ДВККЛ nonGCB-типа с диким типом гена CARD11, если не обнаружено сочетание мутации L265P MYD88 и дикого типа гена CD79b.

Планируется провести 2 дополнительных исследования с целью идентификации мутаций генов CD79b и CARD11 у больных ДВККЛ nonGCB-типа. Для стратификации пациентов и определения целесообразности применения таргетных препаратов необходим мутационный анализ генов MYD88, CD79b и CARD11. Однако лечение пациентов с ДВККЛ малыми молекулами в режиме монотерапии малоэффективно. Как упоминалось выше, использование первично-интенсифицированной химиотерапии (ХТ) позволяет достигнуть до 80% ремиссий ДВККЛ. Вероятно, одной из причин рефрактерности опухоли даже к такой сверхтоксичной терапии, являются альтерации генов сигнальных путей ВКР и ТПР, требующие применения селективных таргетных препаратов. Поэтому, на наш взгляд, заслуживает внимания перспектива использования ингибиторов молекул сигнального пути ВКР в сочетании с интенсивной ХТ, как подход к лечению прогностически неблагоприятного варианта ДВККЛ. Таким образом, новые возможности лечения потенциально будут способствовать преодолению механизмов резистентности у больных ДВККЛ, оказавшихся устойчивыми к интенсивной ХТ. Исследование молекулярно-генетического профиля сигнальных путей ВКР и ТПР обеспечит прецизионность терапевтического подхода у пациентов с ДВККЛ nonGCB-типа.

Раздел: «Детекция и мониторинг ПНГ-клона у больных апластической анемией и апластическими синдромами на разных этапах течения заболевания»

ПНГ-клон определяли стандартным методом высокочувствительной проточной цитометрии по протоколу, предложенному в 2010 г. Международной группой исследователей по проточной цитометрии.

По результатам настоящего исследования, среди первичных больных АА ПНГ-клон был выявлен в 66% случаев. Частота выявления ПНГ-клона у больных ТАА и НАА статистически не различалась: 62% и 71% соответственно. Однако, достоверно показано, что средний размер клона у больных НАА выше: $19,48 \pm 7,33\%$ против $3,63 \pm 1,29\%$ ($p =$

0,043). Возможно, что больший размер ПНГ-клона у больных НАА в момент первоначального исследования связан с большей гетерогенностью этой группы больных АА по сравнению с больными ТАА. Несмотря на то, что не получено разницы в давности заболевания с момента появления первых клинических симптомов болезни до установления диагноза АА и проведения исследования на выявление ПНГ-клона, можно предположить, что продолжительность заболевания при НАА больше, а глубина аплазии костного мозга меньше, чем при ТАА. Создаются благоприятные условия для экспансии ПНГ-клона. Более того, среди больных НАА чаще происходит в дальнейшем клональная эволюция и развитие не только ПНГ, но и МДС/ОМЛ.

При анализе эффективности ИСТ установлено, что большинству больных АА ПНГ+ потребовался минимальный объем терапии, т. е. проведение 1-го курса АТГ и кумулятивная частота достижения ответа достоверно выше среди больных АА ПНГ+. Уже 56% с ПНГ-клоном отвечают на терапию к 6-му месяцу терапии, в то время, как лишь у 44% больных АА ПНГ- к этому сроку диагностировался первичный ответ на лечение. При этом, развитие полной ремиссии после первого курса АТГ достоверно чаще определялось в группе АА ПНГ+ (47% против 17% соответственно). Таким образом, наличие ПНГ-клона у больных АА при первоначальном исследовании, до проведения ИСТ можно расценивать как фактор благоприятного прогноза эффективности ИСТ, фактор более раннего и более полного ответа на проводимое лечение.

По результатам настоящего исследования, динамическое изменение размеров ПНГ-клона, как в сторону уменьшения, так и в сторону увеличения и появления, происходит при ответе на ИСТ, в процессе становления ремиссии, и, вероятнее всего, зависит от преимуществ к росту нормального (ГФИ-позитивного) или клонального (ГФИ-негативного) кроветворения.

При динамическом исследовании ПНГ-клона у больных апластической анемией в процессе иммуносупрессивной терапии и после отмечалась разнонаправленная динамика. В то же время анализ данных, полученных в течение периода наблюдения, показал увеличение числа больных апластической анемией с ПНГ-клоном менее 10% (68% больных до лечения и 82% — после) с одновременным уменьшением числа больных с минорным ПНГ-клоном.

В экспериментах *in vitro* был выявлен сниженный ответ на цитотоксическое воздействие у ГФИ-негативных клеток. Возможно, развитие ГФИ-негативного кроветворения (ПНГ-клона) является «шунтовым» механизмом в условиях аутоагрессии, и его пролиферация, будучи обусловлена внешним преимуществом, позволяет приспособиться к создавшимся условиям. Мы видим значительные изменения в размере ПНГ-клона при ответе на ИСТ, т. е. восстановление «нормального» кроветворения при блокировании аутоагрессии, и в то же время среди больных с ПНГ-клоном более 50% ответ на лечение достигается при более интенсивном воздействии и за больший промежуток времени. В то же время, ГФИ-дефектные клетки появляются в периферической крови больных АА без первоначально выявленного ПНГ-клона при ответе на лечение. Количество их не столь велико, и стоит отметить, что данные больные ответили на минимальный объем ИСТ. Создается впечатление о необходимости более детальной оценки костномозгового кроветворения и поиска оптимальных лабораторных подходов.

Раздел: «Изучение молекулярных механизмов патогенеза и химиорезистентности агрессивных и зрелоклеточных опухолей лимфатической системы на основе анализа иммуногистохимических и генетических механизмов»

В процессе работы с целью дифференциальной диагностики между диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомой (ДБККЛ) с изолированным поражением средостения и первичной медиастинальной В-клеточной крупноклеточной лимфоме (ПМВККЛ), проводили оценку экспрессии генов JAK2, MAL, PDL1, PDL2, TRAF1. Экспрессия генов JAK2, MAL, PDL1, PDL2, TRAF1 определена у 17 (43%) пациентов. У 5 (30%) больных диагностирована ДБККЛ. В данной группе у 1 (20%) больного констатирован ранний рецидив с вовлечением ЦНС.

Фолликулярная лимфома является гетерогенной группой лимфатических опухолей с разными клиническими проявлениями, морфологическими вариантами и разным ответом на терапию.

При ALK⁺-анаплазированной крупноклеточной лимфоме (АЛКЛ) доказано, что обнаружение в крови и/или костном мозге химерных онкогенов, образуемых в результате специфических для данного заболевания транслокаций с участием гена ALK, является фактором неблагоприятного прогноза. Детекция минимальной резидуальной болезни после лечения является очевидным предиктором развития рецидива или прогрессии болезни, в связи с чем проводилась методом полимеразной цепной реакции в реальном времени детекция и мониторинг минимальной резидуальной болезни в первичных образцах крови и/или костного мозга и по следующим этапам терапии: после 2, 6 курса химиотерапии, каждые 3 месяца с момента окончания лечения в первые 1,5 года наблюдения, каждые полгода в последующие 3,5 лет.

Грибовидный микоз (ГМ) составляет более 60% первичных кожных Т-клеточных лимфом. Распространенность составляет 6 на 1 млн человек. Течение болезни — прогредиентное: отмечается постепенная смена пятнистой, бляшечной и опухолевой стадий. Более чем в 70% случаев развивается внекожная генерализация процесса с поражением лимфатических узлов и висцеральных органов, наиболее часто — легких, селезенки и печени. Оценка распространения процесса крайне важна для определения прогноза и выбора терапии. Выявление Т-клеточной клональности по реаранжировкам гамма-цепи Т-клеточного рецептора в крови и пунктате костного мозга может выявляться на ранних стадиях, но прогностическое значение этих феноменов не определено. Поэтому проводили оценку частоты и определение прогностической значимости выявления Т-клеточной клональности по гамма цепи Т-клеточного рецептора в костном мозге и периферической крови у пациентов ГМ/синдромом Сезари (СС) на ранних стадиях заболевания.

В результате исследования впервые созданы протоколы диагностики и лечения опухолей лимфатической системы, отработан алгоритм дифференциальной диагностики некоторых агрессивных лимфом. Новые протоколы диагностики, схемы лечения лимфопролиферативных заболеваний и профилактики осложнений терапии будут способствовать более широкому использованию этих методов в клинической практике, что может существенно улучшить выживаемость больных лимфатическими опухолями.

Раздел: «Изучение молекулярных механизмов резистентности бактерий и грибов у больных гемобластозами»

Изучены гены вирулентности у 363 госпитальных штаммов *Enterococcus* spp., выделенных из гемокультур больных опухолями системы крови. Среди выделенных штаммов *Enterococcus* spp. было 281 (77,4%) *E. faecium*, 74 (20,4%) *E. faecalis*, 8 (2,2%) других (5 *E. gallinarum*, 2 *E. durans* и 1 *E. hirae*). Устойчивыми к ванкомицину были 37 (13,2%) *E. faecium* и один (1,4%) штамм *E. faecalis*. Изоляты ванкомицин-резистентных *E. faecium* имели гены *vanA* (n = 29) и *vanB* (n = 8). Гены вирулентности были обнаружены у 334 (92%) штаммов, отсутствовали у 29 (8%) *Enterococcus* spp. Гены *esp* (75,8%) и *hyl* (65,5%)

достоверно чаще определялись у *E. faecium*, гены *asa1* (62,2%) и *gelE* (68,9%) — у *E. faecalis* ($p < 0,001$). При изучении генов вирулентности у *E. faecium*, устойчивых и чувствительных к ванкомицину, были определены достоверные отличия в частоте обнаружения только одного гена *asa1*, который преобладал у ванкомицин-резистентных *E. faecium* (8,1% против 1,6%, $p = 0,02$). У ванкомицин-резистентных *E. faecium* с генотипом *vanA* присутствовали практически все исследуемые гены, кроме *culA*, в то время как у штаммов с генотипом *vanB* — только два (*esp* и *hyl*). Определено, что *E. faecium* являются доминирующим видом среди *Enterococcus spp.*, выделенных из гемокультуры. У большинства штаммов *Enterococcus spp.* (92%) были обнаружены исследуемые гены вирулентности. Показано, что разные гены вирулентности доминировали у разных видов *Enterococcus spp.*

Проведено изучение колонизации слизистой оболочки кишечника и ротоглотки энтеробактериями с продукцией бета-лактамаз расширенного спектра (БЛРС) у больных с острыми миелоидными лейкозами (ОМЛ) и с лимфомами до курса химиотерапии. Для детекции БЛРС использовали фенотипические методы, генов резистентности *blaTEM* и *blaCTX-M* — метод ПЦР. В проспективное исследование (2013—2014) были включены 98 больных (33 с ОМЛ, 65 с лимфомами), из них у 94 (96%) гемобластоз был диагностирован впервые. Медиана возраста больных с лимфомами составила 47 лет, с ОМЛ — 35 лет. При поступлении колонизацию слизистой оболочки кишечника энтеробактериями с продукцией БЛРС выявили у 26 (27%) больных (у 28% с лимфомами, у 24% с ОМЛ) и лишь у 4 (4%) — со слизистой ротоглотки, $p < 0,01$. Было выделено 34 изолята (*E. coli* 52%, *K. pneumoniae* 42%, *Citrobacter spp.* 6%). Бета-лактамазы CTX-M типа были у 76% изолятов, TEM типа — у 53%, одновременно два типа — у 44%. У больных с лимфомами статистически значимыми факторами колонизации продуцентами БЛРС были перевод в ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России из другого стационара (ОШ 4,2; $p = 0,01$) и возраст от 50 лет и старше (ОШ 3,0; $p = 0,05$), у больных с ОМЛ — проживание вне Москвы (ОШ 7,6; $p = 0,04$). При многофакторном анализе независимыми оказались те же факторы. Исследование продемонстрировало, что практически у каждого третьего пациента (27%) с впервые диагностированными ОМЛ и лимфомами определялась колонизация слизистой оболочки кишечника энтеробактериями с продукцией БЛРС при поступлении в ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России. Детекция их была значимо чаще со слизистой оболочки прямой кишки, чем ротоглотки. Среди энтеробактерий преобладали *E. coli* и *K. pneumoniae*, содержащие преимущественно бета-лактамазы CTX-M. Полученные результаты ставят под сомнение назначение фторхинолонов для профилактики без предварительного обследования.

Проведено изучение характера инфекций и эффективности антибиотиков у больных острым миелоидным лейкозом (ОМЛ) с колонизацией и без колонизации слизистой оболочки кишечника энтеробактериями с продукцией β -лактамаз расширенного спектра (БЛРС). Проспективное исследование (2013—2015 гг.) включало 66 больных ОМЛ, получивших 208 курсов химиотерапии в течение 6 мес. Инфекционные осложнения регистрировали в 193 (93%) курсах химиотерапии. В анализ были включены 173 эпизода инфекции, из них 68 — с колонизацией и 105 — без колонизации слизистой оболочки кишечника энтеробактериями с продукцией БЛРС. Показания к назначению антибиотиков были сопоставимы у больных с колонизацией и без колонизации продуцентами БЛРС, за исключением случаев бактериемии, вызванной энтеробактериями с продукцией БЛРС, которые были только у больных с колонизацией такими бактериями (7,5%; $p = 0,009$). У больных с колонизацией и без колонизации продуцентами БЛРС получены сопоставимые результаты по эффективности антибиотиков для 1-го этапа лечения (38 против 44%), замене их на карбапенемы (62 против 55%), эффективности применения карбапенемов в режиме монотерапии (36 против 52%) и в сочетании (64 против 41%), длительности

использования антибиотиков суммарно (14 против 13 дней) и карбапенемов отдельно (по 10 дней). Излечение всех случаев бактериемии, вызванной продуцентами БЛРС, имело место при назначении карбапенема.

Показано, что колонизация слизистой оболочки кишечника энтеробактериями с продукцией БЛРС является предиктором бактериемии, вызванной подобными микроорганизмами. Не выявлено отличий в применении антибиотиков у больных с колонизацией и без колонизации слизистой кишечника продуцентами БЛРС.

Раздел: «Изучение молекулярно-биологических и инструментальных методов исследования у пациентов с множественной миеломой на разных этапах высокодозной химиотерапии»

В генетической структуре множественной миеломы (ММ) выделяют первичные хромосомные нарушения, которыми являются $t(14q32)/IgH$ с локусами генов, регулирующих циклины группы Д, и множественные трисомии с увеличением количества копий потенциальных онкогенов. К вторичным, связанным с трансформацией опухоли, относят $del13q14$, $amp1q21$, $del17p13/TP53$, $t(8q24)/cMYC$. С 07.2009 г. по 09.2016 г. 134 больным (67 мужчинам и 67 женщинам), в возрасте 27—81 (медиана 57) лет, до начала лечения выполнен FISH-анализ мононуклеаров и CD138+-клеток костного мозга для выявления $tIgH$, трисомий хромосом 5, 9, 15. Индукционная терапия включала 6—8 бортезомиб-содержащих курсов. Ауто-ТСКК выполнена 48 пациентам. Ме наблюдения за больными составила 19,3 мес. $tIgH$ выявлены у 57 (42,5%), трисомии — у 77 (57,5%) пациентов, в 11,2% они сочетались между собой, у 3 (2,4%) выявлена гипоплоидия. Частота встречаемости отдельных $t(14q32)$ составила: $t(11;14)$ — 16,4%; $t(4;14)$ — 12,7%; $t(14;16)$ — 3,7%; $t(14;20)$ — 2,2%; $t(6;14)$ выявлена у одного больного, хромосомный партнер не установлен в 6,7% случаев. $Del13q14$ обнаружена у 54 (40,3%); $delTP53$ — у 17 (12,7%); $t(8q24)$ — у 23 (17,2%); $amp1q21$ — у 53 (39,6%) больных. Была проведена оценка химиочувствительности ММ у 127 пациентов. Самый хороший ответ отмечался у больных с $t(4;14)$ (частота ПР 18,8%), гипердиплоидией (частота ПР 17,8%), $t(11;14)$ (частота ПР 14,3%), $del13q14$ (частота ПР 13,7%) и $amp1q21$ (частота ПР 11,8%). Чувствительность опухоли к бортезомиб-содержащим программам оказалась существенно хуже в группах пациентов у которых была выявлена $delTP53$ (частота ПР 5,9%) и $t(8q24/cMYC)$, полной ремиссии у этих пациентов достигнуто не было. Также полученные результаты были обработаны для оценки влияния наличия тех или иных хромосомных aberrаций на долгосрочный прогноз опухолевого процесса. Статистически значимые различия общей выживаемости (ОВ) были получены в группах пациентов с $delTP53$ ($p = 0,02$), $amp1q21$ ($p = 0,07$) и $t(8q24/cMYC)$ ($p = 0,001$). Помимо этого, было выявлено, что 3 копии $1q21$ достоверно не влияют на прогноз заболевания, в то время как, у больных с количеством копий $1q21$ более 3-х показатели ОВ статистически значимо ниже, в сравнении с группами без $amp1q21$ и с тремя копиями $1q21$. Таким образом, на основании углубленного анализа полученных результатов было показано, что делеция $17p13/p53$, $amp1q21$ и $t(8q24/cMYC)$ являются факторами неблагоприятного прогноза у больных ММ.

При диагностике ММ частота встречаемости костных и экстрамедуллярных плазмоцитом составляет 7—18%, при рецидиве — более чем у 20% пациентов. Клиническое течение ММ, осложненной плазмоцитомами, характеризуется более плохим прогнозом, резистентностью к терапии, низкой общей выживаемостью. С целью изучения молекулярно-биологических характеристик опухолевых клеток в костном мозге и плазмоцитомах у первичных больных ММ было проведено иммуногистохимическое исследование (ИГХ) на срезах с парафиновых блоков трепанобиоптатов и биоптатов опухоли. Использовались панели антител к CD56, Ki67, CXCR4, CD 166 (28 пациентов). Также 19 пациентам было выполнено ИГХ на парафиновых блоках трепанобиоптатов с использованием антител к c-myc и cyclinD1. При ИГХ исследовании трепанобиоптатов

обнаружено, что у больных ММ без плазмцитом по сравнению с пациентами с наличием плазмцитомы, достоверно чаще выявлялись экспрессия CD56 (80% против 38,5%, $p = 0,05$) и высокий уровень экспрессии Ki-67 (53,3 % против 0%, $p = 0,002$). При этом у всех пациентов без плазмцитом отмечена экспрессия CXCR4 клетками опухолевого субстрата в костном мозге, что достоверно превышало таковую у больных ММ с плазмцитомой (100% против 46,2%, $p = 0,001$). Анализ полученных результатов ИГХ и сопоставление их с течением опухолевого процесса показал, что отсутствие экспрессии CXCR4 в костном мозге может свидетельствовать о более агрессивном течении заболевания. Гиперэкспрессия белка c-myc в костном мозге пациентов с ММ является неблагоприятным прогностическим маркером в отношении вероятности достижения глубокого противоопухолевого ответа при терапии бортезомиб-содержащими программами.

С целью определения значимости мутации в 4 и 5 экзонах гена уромодулина (UMOD) в развитии каст-нефропатии (КН) было проведено секвенирование гена UMOD в ДНК, выделенной из мононуклеаров периферической крови 20 больных ММ с экскрецией с мочой белка Бенс-Джонса более 2 г/сутки. В основную группу вошли 13 больных с КН, группу сравнения составили 7 больных ММ с нормальной функцией почек. Было выделено 6 типов мутаций: 4600 C> CT 277 C> C/C; 4870 G> GA 367 V> V/V; 4503 G> GA 245 R> R/G; 4918 C> CT 383 P> P/P; 5068 G> GA 398 G> G/G; 6979 G> GA 398 G> GA (NCBI Reference Sequence: NT_010393). Только одна из этих мутаций (4503 G>GA 245 R>R/G), обнаруженная у пациента с КН, приводит к аминокислотной замене. Информация о ней в базах данных отсутствует. Остальные мутации являются широко распространенными полиморфизмами (до 40% в европейской популяции), достоверные данные об их влиянии на течение каких-либо заболеваний отсутствуют. Эти мутации встречались с одинаковой частотой у пациентов обеих групп. Таким образом, связи между наличием мутаций в гене UMOD и развитием КН при ММ не установлено. Полиморфизмы в гене UMOD одинаково часто встречались в обеих подгруппах, что указывает на отсутствие их влияния на развитие КН.

Раздел: «Мутации в генах JAK2, MPL, CALR, FIP1L1-PDGFRa, CSF3R, TET2, SFRS2, SF3B1 при миелодиспластических, миелолифферативных (МДС/МПЗ) и Ph-негативных неоплазиях: связь с клиническими особенностями и патоморфологией»

Цель: изучение молекулярных механизмов патогенеза Ph-негативных хронических миелолифферативных заболеваний, разработка и внедрение в клиническую практику диагностических и молекулярно-направленных терапевтических подходов при Ph-негативных миелолифферативных заболеваниях.

Проанализированы морфологические особенности, гистотопография ростков миелопоэза в трепанобиоптатах костного мозга с использованием гистологического метода исследования у пациентов с различными нозологическими формами Ph-негативных МПЗ (истинной полицитемии, эссенциальной тромбоцитемии, первичного миелофиброза, МПЗ-неклассифицируемого). Проведена оценка степени ретикулинового фиброза при помощи гистохимического метода окраски по Gomori у больных Ph-негативными МПЗ. В результате проведенной работы сделан вывод, что гистохимическое исследование трепанобиоптатов костного мозга позволяет верифицировать гистологическую стадию заболевания, диагностировать болезнь на ранних стадиях.

Разработан высокочувствительный и высокоспецифичный молекулярный метод диагностики мутаций генов JAK2, MPL, CALR, SRSF2, SF3B1, ASXL1. Исследование проводилось на ретроспективной выборке парафиновых и замороженных образцов (ткани,

клетки и нуклеиновые кислоты), хранящихся в базе лабораторий по исследуемым нозологиям, а также проспективно — на образцах крови больных.

Установлено, что при МПЗ, протекающих скрыто и имеющих в качестве клинических проявлений только венозные тромбозы портальной системы, выявление мутации JAK2V617F и последующее гистологическое исследование костного мозга позволяют подтвердить диагноз МПЗ. Своевременное проведение циторедуктивной терапии, а также антикоагулянтной терапии позволяют добиться реканализации, однако требуется индивидуальный подход и оценка риска кровотечений.

Оценка результатов мониторинга гематологических, гистологических ответов и количественной оценки молекулярных ответов (JAK2V617F) у больных с Rh-негативными МПЗ на фоне интерферонотерапии продемонстрировало возможность получения не только гематологического, молекулярного ответа, но и гистологического ответа у пациентов с ИП и ЭТ.

Раздел: «Мутации генов сигнальных путей и рецепторов лимфоцитов: роль в патогенезе и чувствительности к терапии при лимфопролиферативных заболеваниях»

40 пациентов с ВКЛ и 24 пациента с СЛКМЗ обследованы на наличие мутаций *BRAF V600E*. Данная мутация была выявлена в 39 из 40 случаев ВКЛ и ни в одном из случаев СЛКМЗ. Принимая во внимание, что патогенные мутации в гене *BRAF* не ограничиваются вариантом *V600E*, и что основное число активирующих мутаций локализовано в экзонах 11 и 15, мы изучили нуклеотидные последовательности соответствующих экзонов данного гена у всех пациентов, вошедших в исследование. Ни у одного из больных ВКЛ или СЛКМЗ не были выявлены активирующие мутации в экзонах 11 и 15 гена *BRAF*.

В соответствии с литературными данными, при вариантной форме ВКЛ и в тех случаях, когда при ВКЛ экспрессируется *IGHV4-34*, выявляются активирующие мутации в гене *MAP2K1*, кодирующем MAP-киназу MEK1. Для оценки частоты данных мутаций нами разработана диагностическая система, основанная на секвенировании методом Сэнгера. Мутация с.167A>C, приводящая к замене Q56P в аминокислотной последовательности белка MEK1, была обнаружена у 1 пациента с ВКЛ. В результате определения мутационного статуса генов иммуноглобулинов было выяснено, что это единственный пациент в нашей выборке, относящийся к подгруппе *IGHV4-34*-положительных ВКЛ. Важно отметить, что этот случай имел нетипичную картину поражения костного мозга — морфологически выявлялись лишь рассеянные лимфоидные клетки, но при иммуногистохимическом исследовании обнаруживалась выраженная интерстициальная лимфоидная инфильтрация CD20+CD79a+ В-клетками. При этом в биоптате удаленной селезенки морфологически, иммуногистохимически и фенотипически диагноз ВКЛ был подтвержден, в то время как повторное исследование показало наличие мутации *MAP2K1 Q56P* и отсутствие мутации *BRAF V600E* в ткани селезенки. Ни у одного из 24 пациентов с СЛКМЗ не было обнаружено мутаций в гене *MAP2K1*.

Проведен ряд молекулярно-генетических исследований у 5 пациентов с лимфомой красной пульпы селезенки: ни в одном из образцов мутации *BRAF V600E* обнаружены не были; секвенирование 11 и 15 экзонов гена *BRAF* и 2, 3 и 11 экзонов гена *MAP2K1* показало наличие активирующей мутации G128D гена *MAP2K1* у одного из пациентов. У четырех пациентов было показано наличие мутированных генов вариабельного региона иммуноглобулинов (IgVH), в перестройках использовались VH-гены 3-го и 4-го семейств. У одного пациента мутационный статус установить не удалось.

Раздел: «Изучение генетической структуры лейкозов и лимфом: определение основных молекулярно-цитогенетических событий, лежащих в основе инициации и прогрессии опухолей»

Комплексные изменения в кариотипе больных МДС и ОМЛ являются факторами неблагоприятного прогноза и могут быть результатом многоступенчатого процесса с последовательным накоплением хромосомных аномалий, т. е. эволюции опухолевого клона. Возможности стандартного цитогенетического исследования (СЦИ) ограничены низкой разрешающей способностью этого метода. Молекулярно-цитогенетические методы — флюоресцентная гибридизация *in situ* на интерфазных ядрах (iFISH), многоцветная флюоресцентная гибридизация *in situ* (mFISH), многоцветная идентификация хромосом высокого разрешения (mBAND) — позволяют идентифицировать сложные хромосомные нарушения, маркерные хромосомы, субмикроскопические делеции и транслокации с делециями локусов известных и потенциальных генов, участвующих в патогенезе заболевания. На момент установления диагноза выполнено 438 больным МДС и 164 больным ОМЛ. В настоящее исследование включены 27 пациентов с комплексными нарушениями кариотипа (13 мужчин и 14 женщин, средний возраст 59,8 лет): 15 больных МДС (3,4%) и 12 больных ОМЛ (7,3%). Этим больным выполняли iFISH, mFISH, в трех случаях была выполнена mBAND для хромосом 5, 7, 15, 17. В результате СЦИ в комплексных кариотипах обнаружено в среднем 7 аномалий на кариотип (от 3 до 21). Дополнительный неидентифицируемый при СЦИ хромосомный материал обнаружен в 18 случаях (66,6%), маркерные хромосомы — 13 случаях (48,1%). Дополнительные хромосомы (три- и тетрасомии) обнаруживались в 8 случаях, моносомии встречались значительно чаще — в 19 случаях, при этом чаще отсутствовали хромосомы 5 (40,7%), 7 (18,5%), 17(11%). В результате исследования молекулярно-цитогенетическими методами обнаружено в среднем 6 аномалий на кариотип (от 2 до 16), Хромосомные нарушения представлены преимущественно транслокациями (72%), выявлены 51 простая реципрокная транслокация, 21 транслокация с вовлечением трех и более хромосомных партнеров. Истинная моносомия 7 обнаружена у одного больного, для хромосом 5 и 17 истинных моносомии не найдено. Маркерные хромосомы и дополнительный неидентифицируемый хромосомный материал, за исключением одного случая, были идентифицированы как хромосомный материал, возникший в результате несбалансированных транслокаций. При СЦИ моносомия 7 выявлена и вне комплексных кариотипов. У больных МДС моносомия 7 как единственное хромосомное нарушение выявлена в 2,5%, в сочетании с каким-либо нарушением в менее одного процента случаев. В простых кариотипах больных ОМЛ моносомия 7 обнаружена в 7,2% случаев, в 4,2% из них являлась единственным хромосомным нарушением. С помощью молекулярно-цитогенетических методов фрагменты хромосомы 7 не обнаружены. Сочетание методов mFISH, iFISH и mBAND позволило идентифицировать все количественные и структурные аномалии, нераспознанные при СЦИ, определить скрытые хромосомные нарушения, уточнить точки разрывов хромосом и определить происхождение маркерных хромосом. В комплексных кариотипах истинные моносомии 5 и 17 не выявлены ни в одном случае; истинная моносомия 7 обнаружена лишь у одного больного. Кроме этого случая молекулярно-цитогенетические методы исследования выявили фрагменты хромосом 5, 7 и 17, вовлеченные в простые реципрокные и сложные транслокации, которые, исключая один случай, сопровождалась делециями регионов 5q31, 7q31 и 17p13. Обнаруженная в простых кариотипах больных МДС и ОМЛ моносомия 7 — всегда истинная (фрагменты хромосомы 7 не обнаруживаются).

Нарушениям наследственного аппарата принадлежит важное место в патологии человека. Значительная часть нарушений онтогенеза связана с численными или структурными абберациями всего генома или отдельных хромосом. Генетически сбалансированные хромосомные абберации (транслокации, инсерции, инверсии), как правило, не сказываются на фенотипе носителя. Хромосомный мозаицизм при хромосомных болезнях

описан для половых хромосом, многих аутосом. Доказан повышенный риск развития лейкемии при некоторых наследственных синдромах: синдром Дауна, анемия Фанкони. Можно предположить, что конституциональные перестройки ведут к появлению хромосомной нестабильности района; гены, локализованные в точках разрыва хромосом, теряют привычную ориентацию и, вероятно, могут изменять свою функциональную активность. Сведения о частоте возникновения онкогематологических заболеваний у индивидов с конституциональными перестройками хромосом мало отражены в литературе. Конституциональные структурные aberrации с контрольными точками, похожими на лейкоз-ассоциированные контрольные точки, были зарегистрированы у пациентов с онкогематологическими заболеваниями. Остается неясным, играют ли конституциональные aberrации значимую роль в лейкемогенезе, или развитие злокачественных заболеваний крови у пациентов с конституциональными изменениями кариотипа носит случайный характер. В ретроспективное исследование включены данные по абсолютному числу конституциональных перестроек у пациентов НМИЦ гематологии по результатам стандартного цитогенетического исследования за 2014—2016 год. Всего вошло 3503 пациента. Цитогенетические находки обнаружены у 54 пациентов (из них женщин — 32, мужчин — 22) в возрасте от 19 до 81 с различными гематологическими заболеваниями, которым было выполнено стандартное цитогенетическое исследование (костного мозга — 53 случая, биоптата селезенки — 1), а также подтвержден конституциональный характер перестроек при цитогенетическом анализе ФГА-стимулированных лимфоцитов периферической крови (ЛПК) — 12 случаев. Проведено два исследования методом гибридизации *in situ* (FISH) с помощью ДНК-зонда (СЕР X SpectrumOrange/Y SpectrumGreen DNA Probe (ABBOTT)) у пациентов с аномалиями половых хромосом. Транслокаций (t) за представленный период было выявлено шесть: из них 4 реципрокные (у пациентов женского пола) и 2 Робертсоновские (1 — у женщины, 1 — у мужчины). Выявлено две периферические инверсии, добавочный сверхчисленный маркер, численные аномалии половых хромосом. Проанализированы нормальные варианты полиморфизма хромосом. Количество выявленных структурных и числовых аномалий, частота которых в популяции известна, значительно ниже популяционной величины. Определены группы пациентов, которым необходимо исследование ФГА-стимулированных лимфоцитов периферической крови для исключения или подтверждения наследственного характера хромосомных aberrаций.

Одними из важнейших факторов, определяющих прогноз клинического течения ХЛЛ, являются хромосомные нарушения. Применение FISH с использованием зондов к локусам, в которых характерны aberrации, позволяет выявлять хромосомные нарушения у 80% больных ХЛЛ. Однако, изменения кариотипа у больных ХЛЛ не ограничиваются этими хромосомными нарушениями. Было показано, что наличие любых транслокаций имеет неблагоприятное влияние на течение ХЛЛ. Более того, последние исследования сообщают о том, что комплексный кариотип значительно ухудшает результаты лечения ибрутинибом больных с резистентным и рецидивирующим течением ХЛЛ по сравнению с делецией 17p13/p53, определяемой только при FISH-исследовании. Целью данной работы было охарактеризовать кариотип иммуностимулированных В-лимфоцитов периферической крови больных хроническим лимфолейкозом. Культивирование проводили с добавлением стимулятора деления олигонуклеотида DSP30 и интерлейкин-2 и с применением стандартного сочетания митогенов LPS и TPA. Проанализировано 34 больных В-ХЛЛ, наблюдавшихся в период с ноября 2015 по ноябрь 2016 года, которым проводились стандартное цитогенетическое исследование (СЦИ) и флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH) в научно-клинической лаборатории кариологии ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, из них 18 мужчин и 13 женщин (соотношение мужчины : женщины составляет 1,4) в возрасте от 38 до 86 лет (средний возраст 60 лет, медиана возраста 58 лет). Хромосомные aberrации были выявлены у 28 больных (82%)

больных: у 8 (23%) из них была найдена 1 aberrация, у 9 больных (27%) — две и у 11 (32%) — три aberrации и более (комплексные нарушения кариотипа). Транслокация t(11;14) была выявлена у 3 больных, у 2 больных — в сочетании с комплексным кариотипом. При кариотипировании делящиеся клетки были выявлены у 31 больного (91%). Нормальный кариотип был выявлен у 3 (8%) больных, но у 1 (3%) больного из них при FISH-исследовании были выявлены aberrации. Комплексные нарушения кариотипа были выявлены у 11 (32%) больных, но при FISH-исследовании делеция короткого плеча хромосомы 17 была выявлена у 5 больных (15%). Такой высокий процент выявления комплексного кариотипа по сравнению с данными зарубежных авторов (16%) можно объяснить анализом большого количества метафаз (от 40—80) и учетом всех клональных нарушений, включая делецию Y-хромосомы.

Раздел: «Изучение молекулярно-генетических и цитогенетических характеристик при хроническом миелолейкозе и миелопролиферативных заболеваниях, протекающих с эозинофилией и идентификация новых молекулярно-биологических предикторов редукции Ph-положительного опухолевого клона, с целью оптимизации таргетной терапии ингибиторами тирозинкиназ»

Проанализирована динамика лейкоэмического клона при воздействии таргетной терапии ИТК, включая оценку значения цитогенетического и молекулярно-генетического методов характеристики объема опухолевого клона при ХМЛ, оценку возможности элиминации лейкоэмического клона при МПЗ с эозинофилиями, идентификацию полиморфизмов генов СУР в качестве предикторов редукции опухолевого клона при ХМЛ, а также выполнение фармакокинетическое моделирование трансплацентарного переноса ИТК и сопоставление этих данных с результатами *in vivo*. Полученная информация может стать основой оптимизации таргетной терапии при ХМЛ и МПЗ, протекающих с эозинофилиями.

При сопоставлении результатов СЦГИ и МИ как методов оценки объема лейкоэмического клона при ХМЛ подтверждена их положительная корреляционная связь (коэффициент корреляции 0,715). Установлено, что при отсутствии ЧЦО и уровне Ph-позитивных клеток в пределах 100-36% уровень *BCR-ABL* значительно варьирует и не может быть единственным маркером для оценки клиренса опухоли на ранних этапах применения ИТК. Отмечено, что при уровне *BCR-ABL* менее 1% в 86% характерно наличие ПЦО, и данный уровень возможно рассматривать в качестве эквивалента ПЦО при отсутствии цитогенетического мониторинга. При уровне *BCR-ABL* более 10% преимущественно выявляется отсутствие ЦО или минЦО.

При изучении динамики *PDFRA*, *PDGFRA* клонов и возможности их полной элиминации под воздействием ИТК при МПЗ, протекающих с эозинофилиями установлено, что таргетная терапия иматинибом позволяет получить ПГО в 90% случаев в течение 1—3 мес., МО удается достичь в 88% случаях при Ме наблюдения 7 месяцев. В дальнейшем возможна потеря МО; для обобщения данных о динамике лейкоэмического клона при МПЗ с эозинофилиями требуется дальнейшее наблюдение.

При анализе полиморфизмов генов СУР и метилтрансфераз в качестве предикторов редукции опухолевого клона при ХМЛ установлено, что в группе с резистентностью к ИТК генотип дикого типа встречался в 4—9 раз чаще, чем в группе с высокой чувствительностью к ИТК, чувствительность теста составила 50%, специфичность 97%, положительное (ППЗ) и отрицательное (ОПЗ) прогностическое значение — 89% и 79%, соответственно. Для оценки результативности данного теста необходим дальнейший проспективный сбор информации.

При фармакокинетическом моделировании трансплацентарного переноса ИТК и сопоставлении этих данных с результатами *in vivo* установлено, что в соответствии с

физико-химическими свойствами все ИТК, применяемые при ХМЛ, способны пассивно проникать через ГПБ. Соотношение концентраций иматиниба и нилотиниба в плазме крови матери и плода оказалось значительно ниже расчетного и составило от 0,05 до 0,22 (Me 0,12) для иматиниба и 0,5—0,58 для нилотиниба. Таким образом, подтвержден сниженный риск экспозиции этих ИТК за счет ограниченного проникновения через ГПБ. Разница в теоретических расчетах и данных, полученных на практике, наиболее вероятно обусловлена активным транспортом препаратов и индивидуальными особенностями, не учитываемыми при теоретическом моделировании.

4. Определение клинически релевантных минорных антигенов гистосовместимости при HLA-идентичной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (фундаментальная)

Получены наиболее значимые результаты

Изучение свойств минорных антигенов гистосовместимости (МАГ) и открытие новых является важной задачей. Первые МАГ были обнаружены в 90-е годы, и за последние два десятка лет с развитием технологий и появлением новых подходов, таких как полногеномный поиск ассоциаций (GWAS, Genome-Wide Association Studies), ежегодно исследователи находят новые минорные антигены. Нами были проанализированы данные около 50 различных МАГ. Накопленные знания по данной теме помогут индивидуально подходить к каждому пациенту, проходящему через процедуру аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК). Для этого необходимо до проведения операции получить информацию о несовпадении генотипов донора и реципиента по известным МАГ. Генотипирование по МАГ в дополнение к типированию по аллелям HLA, которое является необходимым тестом перед ТГСК, позволит подбирать оптимального донора, предсказывать интенсивность аллогенного иммунного ответа (реакция «трансплантат против хозяина»), проводить модификацию трансплантата для предотвращения побочных реакций и усиления цитотоксического эффекта трансплантата в отношении остаточных опухолевых клеток. Несмотря на очевидную важность, генотипирование на МАГ перед операцией ТГСК не проводится в клинических целях, кроме того не разработано подхода для быстрого и надежного типирования пациентов на избранные панели МАГ, исходя из HLA-генотипа человека. Описанные в литературе методы определения аллельных вариантов МАГ подходят лишь для анализа отдельных полиморфизмов и непригодны для работы с большим объемом клинического материала и параллельного анализа по нескольким параметрам. Единственный доступный сейчас подход для единовременного генотипирования МАГ включает в себя 10 антигенов, и из-за особенностей метода расширение этой панели не представляется возможным. Для разработки оптимального подхода нами были проанализированы четыре метода, применяемые для типирования МАГ: аллель-специфичная ПЦР (АС-ПЦР), метод анализа кривых плавления, количественная ПЦР с использованием зондов TaqMan и метод полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ). В качестве контрольного метода применялось секвенирование по Сэнгеру. Параметрами для оценки методов являлись простота исполнения, затрачиваемое время, стоимость, возможность составления индивидуальных панелей для пациентов с различным HLA-генотипом. Количественная ПЦР с применением флуоресцентных зондов оказалась наиболее подходящей, мы модифицировали данный подход с использованием аллель-специфичных праймеров, что позволяет сохранить высокую точность и надежность при большой продуктивности метода. Кроме того, данный подход работает по модульному принципу, в котором МАГ объединены в панели на основе их рестриктивной аллели HLA. Таким образом, для каждого пациента используется только необходимое число панелей. Использование зондов с различными флуоресцентными метками позволяет сократить

число реакций. На сегодняшний день полностью готова и отработана панель для генотипирования МАГ, рестриктированных по аллели HLA-A*02, носителями которой являются более 30% жителей Российской Федерации. Панель включает в себя все известные 16 минорных антигенов (для HLA-A*02), и по мере обнаружения новых возможно ее расширение. Кроме того, на стадии разработки находятся панели из 16 минорных антигенов, покрывающие еще 9 аллелей HLA.

С использованием разработанных подходов ведется активное изучение генетического материала пациентов и их доноров, проходивших лечение ранее в Гематологическом научном центре, либо находящихся на лечении в настоящее время. На сегодняшний день частично проанализировано уже 27 пар донор-реципиент, и информация по ним пополняется по мере расширения возможностей типирования.

Для изучения роли отдельных антигенов в системе *in vitro*, потенциального обнаружения новых антигенов гистосовместимости, создается коллекция лимфобластоидных клеточных линий (LCL) пациентов, а также крио-банк периферических мононуклеаров венозной крови доноров. Коллекция на сегодняшний день включает в себя 16 линий LCL и расширяется по мере поступления новых пациентов.

5. Изменения стромального микроокружения костного мозга под действием цитотоксических препаратов и опухолевых клеток в процессе лечения больных гемобластозами (фундаментальная)

Получены наиболее значимые результаты

Объектом исследования являются стромальные клетки-предшественники кроветворного микроокружения — мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (МСК) и колониобразующие единицы фибробластов (КОЕф) из костного мозга больных гемобластозами.

В работе показано, что в момент диагностики заболевания в костном мозге пациентов с ОМЛ и ОЛЛ существенно и статистически достоверно снижена концентрация КОЕ-Ф. Снижение концентрации КОЕ-Ф у больных ОМЛ и ОЛЛ в дебюте заболевания не коррелировало с количеством бластов в костном мозге. Таким образом, наблюдаемое снижение количества стромальных предшественников не может быть объяснено тем, что в исследованных образцах стромальные клетки были заменены на бласты. В костном мозге больных ОМЛ в процессе лечения концентрация КОЕф восстанавливается только частично, тогда как у больных ОЛЛ концентрация КОЕ-Ф восстанавливалась уже через 37 дней после начала лечения и дальше не снижалась.

Суммарная клеточная продукция МСК у больных всеми исследованными нозологиями достоверно не отличалась от таковой в культурах здоровых доноров. Время, необходимое для формирования конфлуентного монослоя после первичной посадки костного мозга (время до P0), было увеличено во всех исследованных нозологиях (ОМЛ, ОЛЛ, ХМЛ). Так как время между следующими пассажами культур доноров и больных не различалось, то можно предположить, что в исходных образцах костного мозга больных было снижено количество МСК, способных пролиферировать и инициировать образование конфлуентного монослоя.

В то же время способность поддерживать рост ранних кроветворных предшественников (клеток, образующих области булыжника, КООБ, на 7 день культивирования) из костного мозга здоровых доноров была изменена в МСК больных различными нозологиями. МСК

больных ОМЛ и ОЛЛ в момент постановки диагноза поддерживали ранние кроветворные предшественники значительно и достоверно хуже, чем МСК здоровых доноров, тогда как МСК больных ХМЛ показали улучшение данной способности в сравнении с контролем. При анализе относительного уровня экспрессии генов в МСК больных до начала лечения были выявлены достоверные изменения экспрессии различных ростовых факторов, маркеров дифференцировки и других регуляторных молекул. Очевидно, что развитие исследованных лейкозов изменяет стромальные предшественники в костном мозге больных.