

## КРАТКИЙ ИТОГОВЫЙ АНАЛИТИЧЕСКИЙ ОТЧЕТ

### Тема I: Изучение молекулярно-биологических и биофизических механизмов реализации патологических процессов при заболеваниях системы крови

В ходе реализации проекта, целью которого являлось проведение молекулярно-генетического исследования распространенных и редких коагулопатий в России, разработаны системы мутационного анализа и проведен поиск патологических вариантов для генов *VWF*, *FGA*, *FGB*, *FGG*, *F5*, *F7*, *F10*, *F11*, *F12* и *F13*. Определены спектры мутаций, которые для всех изученных генов, за исключением гена *F12*, отличались высоким разнообразием. Наибольшее число различных мутаций (33 и среди них 11 новых) было найдено для гена *VWF*. Мажорной оказалась микроделеция с.2430delC, распространенная также в ряде европейских стран и чаще всего встречающаяся у пациентов с 3-м типом болезни Виллебранда. Она встретилась у 32% пациентов. Мажорные нарушения были выявлены также в генах *FGG* (IVS6 +1 G>A и Arg301Cys) и *F7* (с.1391delC). У пациентов с болезнью Хагемана найдено всего 6 различных мутаций в гене *F12* с явным доминированием трех из них, мутации сплайсинга IVS13 -1 G>A и двух нуклеотидных замен в промоторной области в позициях -57 и -62. Три другие мутации (с.614delC, IVS4 -1 G/A и Tyr218His), встретились однократно и ранее в мировой популяции не встречались. Новые мутации (44) найдены также в генах *FGB*, *FGG*, *F5*, *F8*, *F10*, *F11* и *F13*. Кроме традиционных мутаций, было обнаружено комплексное генетическое нарушение нового типа в гене *vWF*, обусловленное взаимодействием гена и псевдогена, локализованных на разных хромосомах, а также очень редкая нуклеотидная замена в интроне гена *F5*, формирующая высокоэффективный аномальный сайт сплайсинга. Выявление доминирующих в отечественной популяции нарушений в генах *vWF*, *FGG*, *F7* и *F12* позволило предложить экономичные экспресс-системы для ДНК-диагностики болезни Виллебранда, болезни Хагемана, гипопроконвертинемии и фибриногенемии. Исследование генетической предрасположенности к развитию ингибиторной формы гемофилии А показало, что факторами неблагоприятного прогноза могут быть как тяжелые мутации в гене *F8*, так и патогенные варианты целого ряда генов регуляторных белков. Было проведено также исследование, показавшее ассоциацию интенсивных болевых ощущений у пациентов с гемофилией А и В с аллелем G полиморфизма (rs1799971) гена *OPRM1*.

Выявлен редкий аллельный вариант RhD weak type 122 и изучены его серологические характеристики. Изучена иммуногенетическая характеристика аллелей *ABO\*O* у россиян. Получены данные по частоте аллелей и генотипов *ABO\*A2*. Описан редкий недеletionный аллель *ABO\*O.01.26* с остаточной А-

гликозилтрансферазной активностью у больной с острым гемолитическим осложнением после переливания одногруппной плазмы. Разработаны и успешно апробированы оригинальные ПЦР-системы, позволяющие проводить дискриминантный анализ редких и поиск новых аллельных вариантов высоко гомологичных генов *RHD* и *RHCE*, ассоциированных с аномалиями антигенов системы Резус. Внедрение в работу лаборатории трансфузиологической иммуногематологии молекулярных методов исследования генов эритроцитарных систем позволяет разрешать неоднозначные результаты серологических методов исследования у потенциальных реципиентов со сложно определяемыми группами крови, изучать механизмы появления аллельных вариантов разных генов, изучать серологические свойства кодируемых ими антигенов или ферментов (гликозилтрансфераз), понимать патогенез посттрансфузионных гемолитических осложнений. Разработка оригинальных ПЦР-систем сотрудниками лаборатории генной инженерии позволяет проводить дискриминантный анализ редких и поиск новых аллельных вариантов высоко гомологичных генов *RHD* и *RHCE*.

Было проведено численное моделирование активации тромбообразования в моделях аппаратов вспомогательного кровообращения, разработанных Food and Drug Administration, FDA: 1) модель FDA Nozzle и 2) модель FDA Blood Pump. Выявлены основные особенности строения указанного класса устройств, определяющие их уровень тромбогенности. Был разработан быстрый алгоритм и реализована программа на языке Python, что позволило на основании доплеровского ультразвукового сканирования (одномерный D-режим) реконструировать геометрию исследуемых сосудов. Отлажена технология изготовления силиконовых отливок персонализированных участков сосудистой сети пациента по данным МРТ. Были проведены серии валидационных *in vitro* экспериментов по контролю процессов активации тромбоцитов в трёхмерных объектах сложной геометрии: аппараты вспомогательного кровообращения, артериовенозные фистулы для гемодиализа, поражённые атеросклерозом кровеносные сосуды. Была разработана и отлажена технология изготовления специализированных microfluidity биочипов, моделирующих сосудистые сети. Проведены тестовые испытания на тромбогенность. Была построена феноменологическая модель активации сигнальной трансдукции в PI3K-Akt-mTOR каскаде. Найдены параметры рассматриваемой системы, изменения которых способны критически влиять на понижение порога активации тромбоцитов.

## **Тема II: Изучение иммуногенности вариантных пептидов, кодируемых геномными полиморфизмами человека**

Распознавание пептидов в составе молекул МНС является важной составляющей

формирования аллореактивного Т-клеточного иммунного ответа. После тимусной селекции клетки способны распознавать аллогенные, но не аутологичные антигены. Однако было показано, что не все антигены иммуногенны, т.е. способны вызывать иммунный ответ. Согласно нашей гипотезе, различия в частотах антиген-специфичных Т-клеток могут являться причиной разной иммуногенности.

В рамках выполнения НИР были отработаны протоколы получения и дифференцировки активированных дендритных клеток, нагруженных синтетическими пептидами, из моноцитов периферической крови. На сформированной панели из 7 антигенов, кодируемых полиморфными генами человека и презентруемых в контексте молекулы HLA-A\*02 были отработаны протоколы получения и оценки эффективности антиген-специфичных Т-клеточных экспансий из наивных Т-клеток, культивированных с аутологичными активированными дендритными клетками здоровых доноров. Далее были оценены частоты наивных предшественников, специфичных к отобранным антигенам. После секвенирования репертуаров, полученных Т-клеточных культур было определено 258 уникальных последовательностей альфа- и бета-цепей рецепторов.

### **Тема III: Изучение молекулярных, цитогенетических, иммуноморфологических основ патогенеза клональных заболеваний системы крови**

В ходе выполнения работы получены данные свидетельствующие о влиянии опухолевого процесса на стромальное микроокружение костного мозга у больных диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомой независимо от межклеточного контакта мезенхимных стромальных клеток с опухолевыми клетками. Учитывая наличие изменений на молекулярном и клеточном уровне, пациентам с диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомой было проведено исследование костной ткани. У больных ДВККЛ в дебюте заболевания достоверно были повышены ДПИД/креатинин в моче и b-cross-laps в крови, что свидетельствует об активации процессов остеодеструкции. Одновременно с этим был снижен витамин Д3 в крови по сравнению с контрольной группой. При обследовании пациентов через много лет после окончания лечения при сохранении длительной ремиссии основного заболевания все биохимические показатели нормализовались. Изучение денситометрии в позвоночнике и шейке бедра не выявило различий между группами. Изучили возможность диффузионно-взвешенной магнитно-резонансной томографии всего тела – МРТ-ДВИ-ВТ в сравнении с позитронно-эмиссионной томографией с компьютерной томографией – ПЭТ/КТ) в оценке объема и распространенности опухоли, а также определении поражения КМ (при различных цитологических типах) при диагностике и

стадировании заболевания у больных фолликулярной лимфомой (ФЛ). Оценки распространенности опухолевого поражения методами МРТ-ДВИ-ВТ и ПЭТ/КТ совпали. Но, метод МРТ-ДВИ-ВТ позволяет получать детализированную визуализацию костного мозга очагов поражения и окружающих мягких тканей как в дебюте ФЛ, так и в процессе мониторинга эффективности полихимиотерапии.

Разработаны высокочувствительные количественные методики определения точечных соматических мутаций гена RHOA с.50G>T (p.G17V); гена STAT3: с.1919A>T (p.Y640F); с.1940A>T (p.N647I); с.1982A>T (p.D661V); с.1981G>T (p.D661Y); с.1981G>C (p.D661H); с.1981G>A (p.D661N); гена STAT5B с.1924A>C (p.N642H), мутаций генов IDH1 (p.R132H, p.R132C/G/S) и IDH2 (p.R140Q; p.R172K). Определена специфичность и чувствительность исследования данных мутаций при ангиоиммуобластной Т-клеточной лимфоме (Т-АИТЛ), Т-клеточном лейкозе из больших гранулированных лимфоцитов (Т-ЛБГЛ), остром миелоидном лейкозе (ОМЛ). Для тестирования специфичности методов исследована большая контрольная группа пациентов с различными гематологическими заболеваниями. Определена роль данных исследований по отношению к рутинному молекулярно-генетическому методу ПЦР определения Т-клеточной клональности по реаранжировкам генов Т-клеточного рецептора, применяемого для диагностики Т-клеточных лимфом. Доказана необходимость включения ПЦР исследования данных мутаций в стандартные протоколы ведения пациентов с АИТЛ и Т-ЛБГЛ для диагностики, стадирования и оценки эффективности противоопухолевой терапии.

Обнаружены существенные различия в репертуаре генов *IGHV* для ХЛЛ, МКЛ, ВКЛ и СКМЗ. Обнаружена тенденция к стереотипии антигенных В-клеточных рецепторов при СКМЗ и ЛКМ. Несмотря на небольшую выборку, выявлены 2 предиктивных HLA-аллеля при ХЛЛ с немутированными генами *IGHV*, и еще 2 для наиболее агрессивных вариантов этого заболевания. Кроме того, наблюдаются некоторые различия в репертуаре HLA-аллелей у пациентов с экспрессией генов *IGHV* из разных семейств. Исследование неселектированных выборок больных ХЛЛ существенно большего размера, вероятно, позволит найти новые ассоциации HLA аллелей с течением заболевания. Показано, что в группах пациентов с наиболее распространенными в России CAP генетические нарушения встречаются значительно чаще, чем в целом у пациентов с ХЛЛ. При этом в нашей выборке значительно чаще, чем по литературным данным, встречаются мутации в гене *TP53* и *del17p13* в группах CLL#1 и CLL#6. Отчасти, это связано с использованием в работе более чувствительных методов. Кроме того, часть пациентов в нашей когорте имели рецидив после режима FCR. Также нельзя исключить и популяционные отличия в развитии заболевания. Дальнейшее

изучение генетических нарушений при этой и других группах САР поможет в будущем улучшить терапию и понимание патогенеза заболевания. Разработан метод определения мутаций ВТК, который существенно проще и дешевле, чем ранее использовавшиеся методы, такие как ddPCR, NGS и другие, но не менее чувствительный и надежный.

Проведены молекулярно-генетические исследование методом "секвенирования следующего поколения" (NGS) образцов костного мозга и периферической крови 48 пациентов с клиническим диагнозом "миелодиспластический синдром". Наиболее частыми оказались мутации генов: ASXL1 (ASXL1 c.1934\_1943dupGTGGCCCGGG, ASXL1 c.1944T>G (?Syn), ASXL1 c.4112\_4114delAGA, ASXL1 c.2644C>T, ASXL1 c.1934dupG, ASXL1 c.3306G>T, ASXL1 c.3935C>T, ASXL1 c.3593G>A, ASXL1 c.4382C>T, ASXL1 c.1934dupG и ASXL1 c.2893C>T), DNMT3A (DNMT3A c.2644C>T, DNMT3A c.2196dupT, DNMT3A c.1904G>A, DNMT3A c.917G>A, DNMT3A c.2644C>T, DNMT3A c.1082\_1087dupAGCAGC) и TET2 (TET2 c.3881G>C, TET2 c.1586delT, TET2 c.3571C>T, TET2 c.2662T>C, TET2 c.2238dupA, TET2 c.703dupT). Мутации в генах кодирующих белков сплайсинга РНК: ZRSR2 (ZRSR2 c.1093G>T, ZRSR2 c.700C>T и ZRSR2 c.195\_198delAAGA), U2AF1 (U2AF1 c.101C>A, U2AF1 c.101C>T, U2AF1 c.101C>T, U2AF1 c.470A>C), SRSF2 (c.284\_307delCCCCGGACTCACACCACAGCCGCC, SRSF2 c.284C>A, SRSF2) и SF3B1 (SF3B1 c.2098A>G, SF3B1 c.2347G>A и SF3B1 c.1998G>C). Однако, патогенетическое значение найденных мутаций генов эпигенетической регуляции и сплайсинга РНК требует дальнейших исследований.

В результате исследования выявлены достоверные различия в исследуемых цитометрических параметрах при сравнении групп доноров и пациентов; опухолевые клетки ХЛЛ, ЛКМ и ЛМЗС имеют отличительные особенности в экспрессии антигенов FAS, PD-L1, CD80, а также имеют отличия в относительном количестве Т-клеток, экспрессирующих PD-1 и PD-L1 в сравнении друг с другом и с контрольной группой. В зависимости от стадии ХЛЛ иммунофенотип опухолевых В-клеток и Т-лимфоцитов периферической крови пациентов имеет свои особенности. При продвинутых стадиях ХЛЛ опухолевые клетки меньше экспрессируют ко-стимуляторные антигены (CD80, CD86) и степень «истощения» Т-хелперов при продвинутых стадиях выше, что отражено в большей экспрессии PD-1+CD4+ клетками. Также в рамках проведенного исследования дана разносторонняя и динамическая характеристика функционального состояния иммунологического синапса при таких В-клеточных заболеваниях, протекающих с лейкомизацией, как ЛКМ и ЛМЗС. Обнаружено, что иммунофенотип опухолевых клеток и Т-клеток, экспрессирующих PD-1 и PD-L1, при данных заболеваниях имеет свои особенности и отличительные черты. Выявлено, что в отличие от ХЛЛ

для ЛКМ характерно истощение и анергия функции Т-лимфоцитов, а для ЛМЗС – истощение функции Т-клеток. Таким образом, выполненное исследование демонстрирует разную, в зависимости от нозологии, экспрессию антигенов иммунологического синапса на опухолевых клетках и различное использование опухолевыми клетками В-ЛПЗ механизмов «уклонения» от Т-клеточного иммунного ответа, путем изменения профиля экспрессии антигенов иммунологического синапса.

В исследование было включено 218 больным множественной миеломой в возрасте от 30 до 81 лет, наблюдавшихся в период с декабря 2009 года по сентябрь 2020 гг., выполнено FISH-исследование костного мозга. Частота первичных и вторичных хромосомных нарушений в дебюте составила 87,6% и 70,7%, соответственно. Цитогенетические aberrации, а также их сочетание у больных множественной миеломой следует расценивать как важный фактор прогноза. Выявлена статистически значимая связь показателей ОБ и ВБП с хромосомными нарушениями. Транскриптомный анализ, выполненный методом RNA-seq, показал резкое усиление экспрессии гена IL6 при рецидиве (в 30 раз), которое могло послужить пусковым механизмом прогрессии ММ, поскольку этот цитокин способен стимулировать клеточную пролиферацию, активируя различные сигнальные пути (MAPK, JAK-STAT, PI3K). Для прогноза длительности периода ремиссии необходимо проводить комплексный молекулярно-генетический скрининг. При изучении субстрата плазмоцитомы при множественной миеломе выявлены достоверные различия иммуногистохимических параметров экстрамедуллярной и костной плазмоцитомы. Проллиферативная активность клеток экстрамедуллярной плазмоцитомы значимо выше таковой клеток костной плазмоцитомы. Экспрессия адгезивной молекулы CD166 в клетках экстрамедуллярной плазмоцитомы достоверно ниже таковой в клетках костной плазмоцитомы, вероятно, данный белок принимает участие в моделировании остеогенеза. В проспективно-ретроспективное исследование включено 42 пациента с впервые диагностированной ММ и острым повреждением почек вследствие миеломной каст-нефропатии. Изученные морфологические и иммуногистохимические предикторы обратимости острым повреждением почек 3 стадии с потребностью в диализе при ММ является новым оригинальным подходом, позволяющим прогнозировать исход почечного повреждения. Разработана модель прогнозирования почечного ответа на основании совокупности морфометрических данных, выраженности эпителиально-мезенхимальной трансформации и эффективности противоопухолевой терапии у пациентов с миеломной каст-нефропатией с потребностью в диализе.

В ходе мониторинга во время поддерживающей терапии МОБ не была обнаружена ни у одного пациента, что указывает на то, что протокол «ОЛЛ-2016»

в ходе фазы индукции и консолидации позволяет достичь глубокой ремиссии. Скорость клиренса МОБ не зависела от иммунофенотипа опухолевой популяции. Определение МОБ у пациентов с ОМЛ и ОЛЛ в первой полной ремиссии непосредственно перед выполнением трансплантации аллогенного костного мозга необходимо для стратификации риска алло-ТГСК и выявления пациентов, которые будут нуждаться в проведении профилактической посттрансплантационной терапии с целью предотвращения рецидива заболевания. Характер распределения семейств V $\beta$  в Т-хелперах при АА поликлонален. В отличие от Т-хелперов в популяции ЦТЛ размер выявляемых клонов ТКР-V $\beta$  был более выраженным. У всех больных АА отмечено увеличение количества ЦТЛ, эффекторных CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> клеток, CD4<sup>+</sup> клеток “памяти” и уменьшение доли наивных CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> клеток, регуляторных Т-клеток, двойных негативных Т-клеток (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>). Различные стратегии профилактики РТПХ не влияют на клинический исход. Используемые в нашей клинике схемы ИСТ характеризовались медленным восстановлением Т-клеток, особенно Т-хэлперов. В случае с кИСТ и ПТ-ЦФ восстановление Т-клеток происходило за счет популяции ЦТЛ. В случае применения ex vivo TCR  $\alpha\beta$ -деплеции восстановление Т-клеточного звена иммунной системы в течение первых 6 месяцев происходит за счет всех исследуемых субпопуляций Т-клеток памяти (Т-наивных и стволовых клетки памяти), Т-клетки центральной памяти, Т-клетки транзитной памяти, Т-клетки эффекторной памяти, Т-терминальных эффекторов. В то время как при использовании режимов с посттрансплантационным циклофосфамидом и/или АТГ – за счет субпопуляций эффекторного пула. Исследование показало, что восстановление исследуемых субпопуляций более, чем через 1 месяц после трансплантации существенно отличается в зависимости от режима профилактики РТПХ.

Исследование по изучению генетического родства карбапенемонечувствительных изолятов *Acinetobacter baumannii*, выделенных из крови больных опухолями системы крови, показало принадлежность изолятов *A. baumannii*, выделенных из гемокультуры больных, находившихся на лечении в 7 стационарах России (2003-2017 гг.) к одной из международных клональных линий (G1-G14) определяли с помощью двух мультиплексных ПЦР, разработанных для селективной амплификации аллелей генов *ompA*, *csuE* и *bla*<sub>ОХА-51-подобные</sub>. Генетическое разнообразие *A. baumannii* изучали методом ПЦР случайных полиморфных фрагментов ДНК (RAPD-ПЦР) с использованием праймера ОРА-2. Всего исследовано 96 изолятов *A. baumannii*, из которых 77 (80,2%) были нечувствительными к меропенему и/или имипенему. Исследуемые изоляты *A. baumannii* принадлежали к 8 клональным линиям, распространенным в мире, из них 62,3% - к международной клональной линии G1 (international clone II, IC II).

Гены приобретенных карбапенемаз были обнаружены у 79,2% (61/77) карбапенем-нечувствительных изолятов *A. baumannii* ( $bla_{\text{OXA-24/40}}$ -45,9%,  $bla_{\text{OXA-23}}$ -45,9%,  $bla_{\text{OXA-58}}$ -6,6%, сочетание  $bla_{\text{OXA-24/40}^+} bla_{\text{OXA-23}}$ - 1,6%). Более половины изолятов *A. baumannii*, имеющих гены  $bla_{\text{OXA-23-подобные}}$ , и *A. baumannii*, содержащие  $bla_{\text{OXA-24/40-подобные}}$ , принадлежали к группе G1 (IC II) (67,9% и 64,3%, соответственно). В ходе RAPD-генотипирования было выявлено 84 RAPD-профиля. Генетически подобные *A. baumannii* (коэффициент сходства (КС)  $\geq 80\%$ ) были объединены в 20 кластеров (клонов) и включали 85,4% штаммов. Полное совпадение RAPD-профилей (КС 100%) было определено для 22 (23%) штаммов, которые были выделены от больных как внутри одного стационара, так и в стационарах, расположенных в разных городах.

**Заключение.** Проведенное исследование продемонстрировало принадлежность *A. baumannii* к международным клональным линиям, генетическое разнообразие и распространение идентичных клонов *A. baumannii* в гематологических стационарах.

Определение способности *Candida* spp. продуцировать биопленки проводили спектрофотометрическим методом с использованием соли тетразолия (ХТТ). В исследование было включено 428 *Candida* spp., из них 172 изолята были выделены от больных опухолью системы крови, 256 - от больных без опухолей системы крови, 361 - из гемокультуры, 67 - из других стерильных образцов. Способность к продукции биопленок была выявлена у 41,8 % (у 179 из 428 штаммов) *Candida* spp., выделенных из крови и других стерильных в норме образцов, с одинаковой частотой как у больных с опухолью (41,9%), так и без опухоли системы крови (41,8%). Значимо чаще продукция биопленок была у *C. tropicalis* (89,5 %) и у *C. krusei* (75 %) в сравнении с *C. parapsilosis* (41,3 %), *C. albicans* (28,6 %) и *C. glabrata* (27 %,  $p < 0,05$ ). Исследование показало различия в способности формирования биопленок у разных видов *Candida* и идентичность в частоте детекции их у больных опухолью и без опухолей системы крови.

**Заключение.** Способность к формированию биопленок различалась у разных видов *Candida* и преобладала у *C. tropicalis* и *C. krusei*. Продукция биопленок была выявлена с одинаковой частотой у больных опухолью и без опухолей системы крови.

В исследование включено 33 больных ЭТ и ИП, получающих терапию пегилированным интерфероном, из них 10 пациентов получали предыдущее лечение. Смена терапии проведена вследствие непереносимости или недостаточной эффективности предыдущего лечения. Группы сравнения представляют 23 больных на терапии гидроксимочевинной и 7 больных на терапии рекомбинантным интерфероном. Через 6 месяцев терапии у 43% пациентов, получавших пегилированный интерферон альфа наблюдалась полная клинико-



гематологическая ремиссия, у 36% отмечена частичная клинко-гематологическая ремиссия, стабилизация заболевания - у 21%, прогрессирования заболевания не зафиксировано ни у одного пациента. Также отмечалось снижение аллельной нагрузки JAK2. В группе пациентов, получавших пегилированный интерферон альфа достигнуто статистически значимое снижение медианы уровня эритроцитов ( $p=0,0137$ ), гемоглобина ( $p=0,0051$ ), гематокрита ( $p=0,0051$ ), тромбоцитов ( $p=0,001$ ), лейкоцитов ( $p=0,002$ ) через 12 месяцев терапии относительно исходных значений. В группе пациентов, получавших Гидреа, достигнуто статистически значимое снижение уровня аллельной нагрузки JAK2 ( $p=0,0066$ ), медианы уровня эритроцитов ( $p=0,0003$ ), гемоглобина ( $p=0,0014$ ), гематокрита ( $p=0,0031$ ), тромбоцитов ( $p=0,000$ ), лейкоцитов ( $p=0,0005$ ) через 12 месяцев терапии относительно исходных значений. В группе пациентов, получавших ИФН, отмечено статистически значимое снижение уровня тромбоцитов ( $p=0,0156$ ) через 12 месяцев терапии относительно исходных значений. При сравнении зависимости эффекта терапии от варианта применяемой терапии статистически значимых различий не получено ( $p= 0,2462$  (точный критерий Фишера)). Выявлена корреляция между клинко – гематологическим ответом на терапию и аллельной нагрузкой JAK2: чем ниже аллельная нагрузка, тем лучше ответ на терапию. Причем это наблюдалось во всех проанализированных группах. Оценка динамики гистологических изменений проведена у 7 пациентов в группе 1: у 2 пациентов отмечена положительная динамика.

В исследование включено 100 пациентов с рецидивирующим/рефрактерным хроническим лимфолейкозом (ХЛЛ), получающих таргетную монотерапию ингибитором тирозинкиназы Брутона (ибрутинибом). Показано независимое неблагоприятное прогностическое значение комплексного кариотипа (5 и более хромосомных нарушений) (HR: 4,27; 95% CI 1,5 - 12,1,  $p = 0,006$ ) и делеции 17p/TP53 (HR: 6,18 (95% CI 1,8 - 20,3,  $p = 0,003$ ) на выживаемость без прогрессии. На материале 256-ти больных ХЛЛ до начала лечения FCR-подобными курсами изучены структура делеции 13q14 и ее прогностическое значение в качестве единственного нарушения, выявленного методом FISH. Выявлены различные варианты делеции по размеру утраченного материала, вовлеченности аллелей и механизму, ведущему к потере геномного материала. Получены статистически значимые различия общей выживаемости в группах больных с изолированной делецией без вовлечения локуса *Rb1* и с вовлечением *Rb1*: 10-летняя ОВ составила 91,5% и 47,5%, соответственно,  $p=0,05$ . Из 92 пациентов с ХЛЛ, которым выполняли стандартное цитогенетическое исследование, в 26 случаях с помощью молекулярно-цитогенетических методов mFISH (multicolour FISH) и mBAND (multicolour banding) детализирована структура несбалансированных перестроек.

Выделены две наиболее многочисленные группы: транслоцированные хромосомные дубликации без делеции хромосомных партнеров и несбалансированные транслокации с делециями. Дополнительные несбалансированные аберрации были выявлены при анализе маркерных хромосом, в результате чего 3 больных перераспределены в группу риска по наличию комплексных нарушений кариотипа. 37 пациентам с первичной медиастинальной (тимической) В-крупноклеточной лимфомой исследован локус гена *СНТА/16p13.13*, методами секвенирования по Сэнгеру, FISH и стандартного цитогенетического исследования. Определены различные соматические вариации в гене *СНТА*, затрагивающие его функционально важные участки, что представляет интерес для дальнейшего изучения биологии опухоли и определения связи нарушений *СНТА* с клиническим течением заболевания.

#### **Тема IV: Исследование взаимосвязи структурного состояния и механизма действия новых гемостатических и антикоагулянтных средств**

Итогами внедрения результатов работы по государственному заданию явились разработки новых монопокрытий в форме порошка и губки на основе каппа-каррагинана, бактериальной целлюлозы и покрытий в форме губки на основе альгината натрия. Разработана композиция из альгината натрия и цеолита, аппликация на основе альгината натрия с добавлением сульфата железа II и комбинация альгината натрия с наночастицами оксидов железа (патент РФ № 2739490). Предложена новая тест-система для комплексного анализа гемостатической активности образцов в форме губки *in vitro*. Доказано, что покрытие на основе альгината натрия может быть использовано в качестве донора для быстрой доставки лечебных препаратов в зону травмы. Полученные результаты *in vitro* полностью подтвердили результаты *in vivo*. Добавление тромбина и фибрин-мономера эффективно снижало число тромбоцитов и уровень фибриногена, при этом заметно активировало коагуляционные реакции *in vitro*. Добавление в губку наночастиц оксидов железа минимизировало коагуляционный сдвиг, но не исключало его. Проводился выбор из соединений с антикоагулянтной (АК)/антитромбоцитарной (1 ряд) активностями и гемосовместимых соединений, не способствующих гемолизу и без АК/антитромбоцитарной (2 ряд) активностей. В 1 ряд вошли: сульфаты целлюлозы, аминоксидодезоксидоцеллюлозы, сульфатированный органосольвентный лигнин. Ряд 2 составили аминоксидодекстраны, дезоксицеллюлоза, гидроксидэтил крахмал, конъюгат целлюлозы с диборнолом.

#### **Тема V: Оптимизация программной химиотерапии гемобластозов на основе пациентспецифических биологических маркеров заболевания**

Снижение дозы ингибиторов тирозинкиназ (ИТК) II поколения у больных хроническим миелолейкозом (ХМЛ) не привело к снижению эффективности. Однако, для внедрения подхода к терапии с подбором оптимальной дозы ИТК II поколения с максимальной эффективностью и минимальной интенсивностью для больных ХМЛ с признаками уже имеющейся лекарственной токсичности или высоким риском развития нежелательных явлений на терапии ИТК необходимо оценить в проспективных исследованиях.

Проведение высокодозной терапии мелфаланом с последующей аутоТГСК больным множественной миеломой (ММ) с диализ-зависимой почечной недостаточностью позволило улучшить противоопухолевый ответ (71% полная ремиссия, 29% очень хорошая полная ремиссия) и достичь минимального почечного ответа в 14% случаев. Больным, у которых достигнут минимальный почечный ответ, прекращен гемодиализ, наблюдение за ними продолжается, потребность в проведении заместительной почечной терапии отсутствует в течение 24–100 мес. Выполнение высокодозной химиотерапии с последующей аутологичной трансплантацией стволовых кроветворных клеток (ауто-ТГСК) является эффективным и безопасным методом лечения больных ММ, осложненной ОПП III стадии.

Современные протоколы комбинированной иммуносупрессорной терапии (ИСТ), включающие антитимоцитарный глобулин (АТГ) и циклоспорин А, позволяют у большинства больных апластической анемией (АА) получить стабильный положительный ответ на лечение. Современная программа лечения больных АА, включающая использование на различных этапах течения болезни как комбинированной иммуносупрессивной терапии, так и трансплантации гемопоэтических стволовых клеток, позволяет значительно улучшить вероятность длительной общей выживаемости больных и качество их жизни.

Проведенное проспективное исследование отражает реальную клиническую практику терапии больных ММ в России. Отмечена высокая частота диагностики поздних стадий заболевания. Индукционная терапия абсолютному большинству больных ММ в России осуществляется бортезомиб-содержащими схемами, эффективность которой сопоставима с общемировыми данными.

Достижение МОБ-негативного статуса после ауто-ТГСК сопровождалось высокими показателями 4-летней ВБП независимо от наличия или отсутствия поддерживающей терапии леналидомидом (58% против 46%,  $p=0,3$ ). Назначение поддерживающей терапии больным с МОБ-позитивным статусом после ауто-ТГСК оказывает влияние на ВБП.

**Тема VI: Оптимизация программы диагностики, лечения и мониторинга неопухолевых орфанных заболеваний системы крови у взрослых на основе**

## **молекулярно-генетических, биохимических, иммунофенотипических параметров**

Впервые в РФ создан Регистр пациентов с болезнью Гоше (БГ), который включил 320 взрослых пациентов (92 % от общей популяции), позволяющий получить достоверную информацию о фенотипической характеристике болезни и динамике клинических и лабораторных показателей в процессе патогенетической терапии. Исследование высокоспецифичных биомаркеров - хемокина CCL18 и гликозилсфингозина, могут использоваться как дополнительные показатели в индивидуальной программе комплексной оценки активности болезни Гоше, особенно у спленэктомированных пациентов. Изучение параметров ответа на лечение имеет важное практическое значение: пациенты, достигшие целей лечения БГ могут своевременно переводиться на поддерживающий режим заместительной ферментной терапии.

Разработаны алгоритмы диагностики гипо- и гиперкоагуляционных состояний, новых подходов и возможностей к назначению терапии наследственных коагулопатий, разнообразных схем антикоагулянтной терапии у больных с тромботическими осложнениями и акушерскими неудачами, позволяющие контролировать кровотечения в группе больных с гипокоагуляционными изменениями и предотвращать повторные тромботические случаи у больных гиперкоагуляционными нарушениями. Разрабатываются индивидуализированные программы заместительной гемостатической терапии и профилактики осложнений в послеоперационном периоде у пациентов с тяжелой формой гемофилии А, что улучшит качество жизни пациентов и позволит уменьшить экономические затраты здравоохранения на лечение осложнений у данной группы больных.

## **Тема VII: Совершенствование различных этапов выполнения трансплантации аллогенных и аутологичных гемопоэтических стволовых клеток и разработка новых подходов профилактики и терапии посттрансплантационных осложнений**

Определены особенности течения рецидива множественной миеломы (ММ) после трансплантации аутологичных гемопоэтических стволовых клеток, сопоставление клинического течения рецидива ММ после ауто-ТГСК в зависимости от сроков его развития. Ранний иммунохимический рецидив был диагностирован у 20% больных и развился в период от 3,9 до 11,8 мес (медиана 7,1 мес). Поздний иммунохимический рецидив – у 80% больных в период от 12,6 до 66,7 мес (медиана 29,2 мес) ( $p=0,00023$ ). 5-летняя общая выживаемость составила 93,0% в группе пациентов с поздним рецидивом, а в группе пациентов с ранним рецидивом - 58,2%. ( $p=0,0039$ ). При наличии костных плазмочитом в дебюте заболевания, иммунохимический рецидив после аутологичной трансплантации

достоверно вдвое чаще развивается в ранние сроки (84,6% против 42,3%,  $p=0,01$ ). Значимым прогностическим фактором является ответ на +100 день ауто-ТГСК. У пациентов, достигших полной ремиссии, рецидив развивается позже и протекает подобно моноклональным гаммапатиям.

Выявлено, что у пациентов после аллогенной трансплантации, отсутствие HLA-лиганда у пациента для KIR донора значительно улучшает безрецидивную выживаемость (85% vs. 36%,  $p=0.0131$ ), хотя при этом не выявлено влияния на показатели общей выживаемости (68% vs. 54.6%,  $p=0.077$ ). При этом, такое усиление реакции «трансплантат против лейкоза» (РТПЛ) не влечет увеличение вероятности развития РТПХ, как острой («нет лиганда» - 21% против «есть лиганд» - 26%,  $p=0.6733$ ), так и хронической (18% против 10.5%,  $p=0.5777$ ).

### **Тема VIII: Разработка диагностических наборов реагентов для молекулярно-генетического выявления онкогенных транскриптов с целью ранней диагностики и мониторинга минимальной остаточной болезни при острых лейкозах**

В рамках запланированной на 2020г работы было проведен анализ данных, опубликованных в открытых источниках, в результате были выбраны 14 перспективных для создания диагностических тест систем генетических маркеров – онкогенных химерных транскриптов, определяющих максимальное число случаев острых лейкозов у взрослых, а именно: PICALM-MLLT10, PML-RARa, MLL-AF4, MLL-AF6, MLL-AF9, MLL-AF10, MLL-ENL, MLL-ELL, CBFB-MYH11, AML1-ETO, ETV6-RUNX1, E2A-PBX1, BCR (190 и 230)-ABL1. Кроме того, в качестве дополнительных маркеров повышающих возможности ранней диагностики и мониторинга терапии острых лейкозов были выбраны показатели экспрессии мРНК эмбриональных генов: WT1, PRAME, EVI1, HMGA2. Проведен поиск и теоретическая разработка дизайна олигонуклеотидных праймеров и зондов, а также их оптимальных комбинаций для выполнения реакции мультиплексном формате ПЦР-РВ. Проведена разработка стандартных образцов искомым олигонуклеотидных последовательностей и выполнена оптимизация реакций ПЦР-РВ, и проведена оценка аналитической чувствительности методик. Проведены предварительные исследования по разработке методов детекции исследуемых маркеров в образцах «сухих пятен» крови, а также по разработке оригинальных наноманитных конструкций для этапа выделения нуклеиновых кислот. Проведены избирательные сравнительные исследования выявления химерных транскриптов в образцах с результатами, полученными в независимых лабораториях. Выполнены предварительные исследования образцов венозной крови 55 пациентов с острыми лейкозами, продемонстрированы сравнимые с литературными данными характеристики диагностической чувствительности разрабатываемых тест-систем.