

КРАТКИЙ АНАЛИТИЧЕСКИЙ ОТЧЕТ

Тема 1 Изучение молекулярно-биологических и биофизических механизмов реализации патологических процессов при заболеваниях системы крови

Разработаны системы мутационного анализа и проведен поиск патологических вариантов генов фон Виллебранда, факторов V, VII, VIII, XI и XII. Определены мутации с разными типами болезни Виллебранда. Всего идентифицировано 11 различных генных дефектов. Две миссенс-мутации оказались новыми (Pro2527His и Ala2178Ser). Наиболее распространенной была микроделеция c.2430delC, чаще всего встречающаяся у пациентов с 3-м типом заболевания. Показано, что высокая частота встречаемости миссенс-мутации His634Arg в Свердловской области, вызывающей легкую форму гемофилии А, обусловлена эффектом основателя. Идентифицированы мутации в гене F8 у 30 пациентов с ингибиторной формой гемофилии А. У подавляющего большинства выявлены тяжелые мутации (инверсии, нонсенс-мутации, frameshift-мутации, масштабные делеции). Миссенс-мутации найдены только у 3-х пациентов. Такое распределение вполне соответствует представлениям о существующей корреляции между степенью тяжести генетического дефекта и развитием ингибиторной формы заболевания. У пациентов с гипоконвертинемией и болезнью Хагемана найдены как новые, так и мажорные для отечественной популяции мутации в генах F7 и F12. Разработаны и успешно апробированы системы полномасштабного мутационного анализа для генов факторов V и XI. Найдены новые мутации в гене F5 (Cys684Tyr) и F11 (c.1767 delG).

Фенотип системы Резус определен у 3269 человек. Проблемы идентификации антигенов С и D возникли у 46 человек, которым было выполнено генотипирование. Генотипирование позволило выявить присутствие редкого гена RHCE*Ce09.01 у двух лиц, подтвердить присутствие гена. Обнаружены два человека с парциальными антигенами

DVII и DNB, подтвержденное на молекулярном уровне. Впервые выявлены и охарактеризованы антигены Dweak type 67 (1) и Dweak type G763A(1), идентифицированные секвенированием. Выполнено генотипирование 36 лицам с ослабленным антигеном D. У 11 выявлен Dweak type 1, у 5 -Dweak type 2, у 19 -Dweak type 3, у 1 - Dweak type 15. Для разрешения неоднозначностей генотипирования методом аллель-специфической ПЦР разработаны и успешно апробированы высокоспецифичные ПЦР-системы для дифференциального тестирования генотипов RHD и RHCE. В отчетный период были проведены работы по регистрации агрегации тромбоцитов в условиях высокого сдвигового напряжения в вискозиметре. Количество и размеры агрегатов анализировались по микроснимкам с помощью скриптов (готовых инструментов) Python. По серии экспериментов было установлено, что увеличение скорости сдвига приводит к уменьшению количества агрегатов за счет увеличения их размеров до 100 микрометров.

Была усовершенствована математическая модель, описывающая гидродинамическую активацию тромбоцитов в условиях переходного режима течений.

Тема 2 Изучение иммуногенности вариантных пептидов, кодируемых геномными полиморфизмами человека

Разработан метод быстрого генотипирования на отобранную панель полиморфизмов, который основан на ПЦР в реальном времени с использованием флуоресцентных зондов.

Созданы контрольные ДНК-матрицы, кодирующие все аллельные варианты для каждого полиморфизма.

Тема 3 Изучение молекулярных, цитогенетических, иммуноморфологических основ патогенеза клональных заболеваний системы крови

Исследование экспрессии MUM1 при фолликулярной лимфоме выявило отсутствие связи с программой химиотерапии - вне зависимости от выбора терапии 5-летняя ОВ составила 100%. Возможно, отчасти обусловлено хорошим противоопухолевым Т-клеточным ответом, о чем свидетельствует выявление парафолликулярного расположения Т-лимфоцитов, а также хорошо выраженная сеть ФДК.

Разработаны высокочувствительные количественные методики определения мутаций RHOA G17V; STAT3 Y640F; STAT3 D661Y. Определена специфичность и чувствительность исследования данных мутаций при ангиоиммунобластной Т-клеточной лимфоме (Т-АИТЛ) и Т-клеточном лейкозе из больших гранулированных лимфоцитов (Т-ЛБГЛ). Для тестирования специфичности методов исследована большая контрольная группа пациентов с различными гематологическими заболеваниями. Впервые мы применили метод LNA-модифицированных праймеров, для оценки данных мутаций, что повысило чувствительность определения опухолевых клеток до 0,02%, и было достаточно для мониторинга минимальной остаточной болезни (МОБ) и оценки количества опухолевых клеток в разных тканях.

Обнаружены существенные различия в репертуаре генов IGHV для ХЛЛ, ВКЛ и СЛКМЗ. Различается частота встречаемости семейств и отдельных генов иммуноглобулинов. Обнаружена тенденция к стереотипии антигенных В-клеточных рецепторов при СЛКМЗ и ЛМЗ. Потенциальные САР при СЛКМЗ и ЛМЗ также отличаются от таковых при ХЛЛ.

При прогрессирующем В-клеточном хроническом лимфолейкозе доля CD80 и CD86 на опухолевых клетках ниже, чем у первичных пациентов с ХЛЛ, а у пациентов в стадии С доля В-клеток с экспрессией этих антигенов оказалась ниже, чем у больных в стадиях А и В. В результате наших исследований было установлено, что доля CD95-CD28+ Т-хелперов ниже у пациентов с прогрессией заболеванием, чем у доноров и первичных пациентов. Доля наивных цитотоксических Т-лимфоцитов была ниже среди

пациентов 1-й и 2-й групп, чем у доноров, причем доля CD95-CD28+ цитотоксических Т-клеток была ниже у пациентов в стадии прогрессии по сравнению с «первичными» пациентами. Уменьшение пула CD95-CD28+ Т-клеток у пациентов с ХЛЛ в стадии прогрессии могло быть связано с воздействием предшествующей терапии или угнетающего действия опухолевых клеток ХЛЛ. Нами так же было установлено, что Т-клетки лиц с прогрессирующим ХЛЛ характеризуются большей экспрессией PD-1, чем у первичных пациентов. Было показано, что Т-клетки (CD4+ и CD8+) ХЛЛ имеют так называемый истощенный фенотип (CD4+PD-1+ и CD8+PD-1+), т. е. имеют гиперэкспрессию PD-1, а также нарушена их секреторная функция. Полученные нами данные могут свидетельствовать о постоянном антигенном воздействии опухолевых клеток на Т-лимфоциты, истощении пула CD95–CD28+ Т-клеток, увеличении доли Т-клеток памяти и Т-эффекторных клеток и повышении доли Т-клеток с ко-экспрессией PD-1.

Множественная миелома (ММ) характеризуется выраженной геномной гетерогенностью, обусловленной множеством численных и структурных изменений хромосом, которые играют важную роль в онкогенезе, приводя к геному дисбалансу, изменению структуры и функции генов и, вследствие к нарушению регуляции клеточного цикла и дифференцировки клеток. До начала лечения выполнен FISH-анализ мононуклеаров и CD138+клеток костного мозга для выявления tIgH: t(11;14), t(4;14), t(14;16), t(14;20), t(6;14), del13q14/-13, del17p13/TP53, amp(1q21), del1p32, t(8q24)/cMYC, трисомий 5,9,15. В результате исследования t(14q32)/IGH выявлены у 35,7%, трисомии – у 44 % пациентов, в 9,7% случаев они сочетались между собой, в 10,6% случаев первичные хромосомные нарушения не обнаружены. Частота встречаемости отдельных t(14q32) составила: t(11;14) – 21,3%; t(4;14) – 13,9%; t(14;16) – 4,2%; t(14;20) – 1,3%; t(6;14) - 0,9% больных, хромосомный партнер не установлен в 4,2% случаев. Del13q14/-13 обнаружена в 45,4%; amp1q21 – в 38,4%; t(8q24) – 13,4%; del17p13/TP53 - в 12%; del1p32 – в 5,1%; amp(8q24)/cMYC – 3,2%. У 20 из 22 (90,9%) пациентов при FISH-

исследовании не было выявлено изменения цитогенетической картины заболевания в ходе прогрессии, в то время как у 2 из 22 (9,1%) больных обнаружено появление $amp1q21$. Из-за малого количества больных, которым был выполнен FISH-анализ как в дебюте, как и в рецидиве/прогрессии миеломы, мы не можем четко утверждать, что появление именно этой aberrации обуславливает прогрессию опухоли. Кроме того, эта aberrация выявлена у 45,5% больных уже в дебюте заболевания, а также известно, что в прогрессии частота выявления $amp1q21$ растет. Выполнение FISH-исследования как в дебюте заболевания, так и в прогрессии является важным для клинической практики, поскольку выявление новых хромосомных нарушений может являться обоснованием для своевременного изменения тактики лечения пациентов ММ.

Определена вероятность сохранения МОБ-негативного статуса после трансплантации аутологичных стволовых клеток крови, она составила 60% в течение 3,5 лет. Количество остаточных aberrантных плазматических клеток в костном мозге на 100-й день после аутотрансплантации достоверно влияло на показатели выживаемости, так медиана ВВП при наличии более 0,05% составила 8 месяцев против 23 месяцев при выявлении менее 0,05% aberrантных плазматических клеток.

В группе рефрактерных пациентов апластической анемией доля НКТ-клеток, $CD4+$ “клеток памяти”, а также активированных ($CD25+$) $CD4+$ клеток была достоверно выше, чем у здоровых доноров ($p < 0,024$), а количество “наивных” $CD4+$, а также $CD4+$ и $CD8+$ клеток, экспрессирующих PD-L1, было ниже, чем в контрольной группе ($p < 0,0187$). У первичных пациентов по сравнению с группой здоровых доноров доли “эффektorных” $CD4+$ и $CD8+$ клеток, а также доля $CD4+$ “клеток памяти” были выше ($p < 0,04$), а количество “наивных” $CD4+$ и $CD8+$ клеток и $CD4+PD-L1+$ клеток было ниже ($p < 0,02$). Количество НКТ-клеток в группе первичных пациентов было ниже, чем в группе рефрактерных пациентов ($p = 0,03$). В группе пациентов в ремиссии количество $CD4+$ “наивных” клеток и

регуляторных Т-клеток было ниже, чем в контрольной группе ($p < 0,048$), а пропорция CD4+ “эффекторных” и “клеток памяти” была выше ($p < 0,025$). По сравнению с группой рефрактерных пациентов в группе пациентов в ремиссии было обнаружено большее количество CD4+PD-L1+ клеток и меньшая доля CD4+CD25+ лимфоцитов.

При анализе динамики изменения долей различных субпопуляций Т-клеток у первичных пациентов было обнаружено, что в процессе терапии увеличивается относительное количество NKT-клеток, CD3+CD4-CD8-клеток, а также количество активированных Т-клеток. Также было обнаружено, что относительное количество регуляторных Т-клеток и эффекторных CD4+ клеток снизилось в процессе терапии.

У всех первичных пациентов АА была обнаружена экспансия хотя бы одного V β субклона среди CD8+ клеток. У пациентов в ремиссии среди Т-клеток не всегда обнаруживалась экспансия субклонов, что свидетельствует о влиянии терапии на субпопуляционный состав Т-клеток.

Выявлено 50 (15%) ванкомицин-устойчивых *E. faecium* (Vancomycin-resistant Enterococcus –VRE), из них 33 (66%) имели ген резистентности к гликопептидам *vanA*, 17 (34%) – ген *vanB* (34%). В 2012 г был выделен один изолят *E. faecium*, устойчивый к линезолиду (МПК 16 мкг/мл). При секвенировании линезолид-устойчивого *E. faecium* были определены мутации в гене, кодирующем 23S рРНК. В исследовании был выделен один изолят *E. faecalis* умеренно-резистентный к ванкомицину с генотипом резистентности *vanD* и один изолят *E. gallinarum*, устойчивый к ванкомицину, несущий гены устойчивости *vanC1* и *vanB*.

Образование биопленок было исследовано у 109 изолятов *Candida* spp. (*C. albicans* n = 22, *C. parapsilosis* n = 22, *C. tropicalis* n = 22, *C. krusei* n = 21, *C. glabrata* n = 22), выделенных из гемокультуры. Формирование биопленок было определено у 54% (n = 59) *Candida* spp. Частота образования биопленок была выше среди *Candida* не-*albicans* (60%) в сравнении с *C. albicans* (32%, $p = 0,02$). Изоляты *C. tropicalis* (82%) и *C. krusei* (81%) значительно чаще

формировали биоплёнки в сравнении с *C. parapsilosis* (50%), *C. albicans* (32%) и *C. glabrata* (27%, $p > 0,05$). Распределения генов *bla*CTX-M, *bla*TEM и *bla*SHV было изучено у 499 изолятов Enterobacterales с продукцией БЛРС. Гены *bla*CTX-M были наиболее распространенными (82,6%), далее следовали гены *bla*TEM (73,7%) и *bla*SHV (53,7%). У 1,4% (n=7) изолятов Enterobacterales с продукцией БЛРС исследуемые гены *bla*CTX-M, *bla*TEM, *bla*SHV не были выявлены. Гены *bla*CTX-M были обнаружены у 84,9% *K. pneumoniae*, 89,8% *E. coli* и 42,6% *Enterobacter cloacae*. Гены *bla*CTX-M принадлежали к кластерам *bla*CTX-M-1 (88,8%), *bla*CTX-M-9 (14,8%) и *bla*CTX-M-2 (0,2%). Доля изолятов, имеющих сочетание генов двух разных кластеров *bla*CTX-M, составила 4,1%.

С учетом данных молекулярно-генетических исследований на материале образцов крови/костного мозга была выделена группа пациентов с Ph-негативными миелопролиферативными заболеваниями с наличием мутации *Jak2* V617F. Качество собранной коллекции ДНК/РНК подтверждена с молекулярными исследованиями драйверных мутаций *Jak2*V617F, *MPL*W515L/K и 9 экзона гена *CALR*. Вся коллекция согласно по протоколу исследований хранятся в морозильниках при -60°C .

Нарушения в регионе 3q26, сопровождающиеся изменением экспрессии *EVI1* характерны для миелодиспластического синдрома (МДС) и острого миелоидного лейкоза (ОМЛ). Перенос гематопоезического энхансера *GATA2*(G2DHE)/3q21 в область промотора *EVI1* и последующая активация экспрессии *EVI1* являются фундаментальными молекулярными событиями, лежащими в основе *inv*(3)/*t*(3;3). Аномальная экспрессия *EVI1* возникает и при образовании химерных генов *EVI1*/*RUNX1*, *EVI1*/*ETV6* в результате транслокаций *t*(3;21)(q26;q22) и *t*(3;12)(q26;p13) соответственно. Возможности стандартного цитогенетического исследования (СЦИ) ограничены низкой разрешающей способностью этого метода. Молекулярно-цитогенетические методы - флюоресцентная гибридизация *in situ* на интерфазных ядрах (FISH), 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. С января 2014 г. по октябрь 2018 г. в результате СЦИ клеток костного мозга больных МДС (n=661) и ОМЛ (n=284) (исключая случаи острого промиелоцитарного лейкоза) нарушения в 3q26 выявлены у 1,8% больных МДС и у 5,6% больных ОМЛ (всего 28 больных: 14 мужчин и 14 женщин, средний возраст 45,6 лет). Нарушения в локусе гена EVI1 методами СЦИ и FISH выявлены у 1% больных МДС и у 3,8% ОМЛ, это 76% от всех выявленных при СЦИ аномалий 3q (n=28) у больных МДС/ОМЛ за указанный период. Методом FISH подтверждены $inv(3)(q21q26)$ и $t(3;3)(q21;q26)$ во всех обнаруженных при СЦИ случаях. При этом, обнаружены $t(3;3)(q21;q26)$ с делецией 5' EVI1 и $inv(3)(q21;q26)$ с делецией в регионе 3q21/RPN1, по одному случаю каждая. Исключая эти два случая точки разрыва в регионе 3q26/EVI1 были типичными. В одном случае ОМЛ выявлена крайне редкая транслокация $t(3;3)(p24;q26)$ с перестройкой в 5' EVI1. В шести случаях $inv(3)/t(3;3)$ обнаружена истинная моносомия 7. У пяти больных обнаружена $t(3;21)(q26;q22)$, у одного из них без вовлечения в транслокацию локусов генов EVI1 и RUNX1. СЦИ лимфоцитов периферической крови в ремиссии заболевания позволили предположить конституциональный характер хромосомной аномалии у этого больного. В четырех случаях ОМЛ обнаружена $t(3;5)(q25-26;q34)$, из них в трех случаях без перестройки EVI1, в одном случае недостаточно исследуемого материала для выполнения исследования методом FISH. В одном случае обнаружена транслокация $t(2;3)(p21;q26)$ с вовлечением гена EVI1. У одной больной выявлена $t(2;3)(q24;q25-q26)$ без перестройки EVI1, описания подобных случаев в настоящее время нет. Недостаточное количество исследуемого материала не позволило выполнить mBAND для более точной идентификации регионов, вовлеченных в транслокацию. Мы рекомендуем

всем больным с аномалиями в 3q выполнение FISH-исследования на наличие перестроек в локусе гена EVI1, при выявлении нетипичных точек разрыва проводить исследования методами mFISH, mBand для более полной характеристики структуры aberrаций и дальнейшего изучения этой группы больных. В случаях выявления при СЦИ во всех клетках костного мозга сбалансированных транслокаций с вовлечением региона 3q26 и отсутствия перестроек EVI1 при FISH необходимо СЦИ лимфоцитов периферической крови в ремиссии заболевания для исключения наследственной патологии.

Сведения о частоте возникновения онкогематологических заболеваний у индивидов с конституциональными перестройками как аутосом, так и половых хромосом мало отражены в литературе и противоречивы. Нарушениям наследственного аппарата принадлежит важное место в патологии человека. Значительная часть нарушений онтогенеза связана с численными или структурными aberrациями всего генома или отдельных хромосом. Генетически сбалансированные хромосомные aberrации (транслокации, инсерции, инверсии), как правило, не сказываются на фенотипе носителя. Хромосомный мозаицизм при хромосомных болезнях описан для половых хромосом, многих аутосом. Высокая частота развития лейкемии при некоторых наследственных синдромах доказана многочисленными исследованиями. Клиническая симптоматология анемии Фанкони непосредственно связана с хромосомной нестабильностью, больные подвержены высокому риску развития у них злокачественных новообразований. 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. Конституциональные структурные aberrации с контрольными точками, похожими на лейкоз-ассоциированные контрольные точки, были зарегистрированы у пациентов с онкогематологическими заболеваниями. В отчет включены данные по абсолютному числу конституциональных

перестроек у пациентов НМИЦ Гематологии по результатам стандартного цитогенетического исследования за 2018 год. Всего вошло 1085 пациентов. Цитогенетические находки обнаружены у 26 пациентов (из них женщин – 14, мужчин - 12) в возрасте от 20 до 78 летс различными гематологическими заболеваниями, которым было выполнено стандартное цитогенетическое исследование костного мозга, а также подтвержден конституциональный характер перестроек при цитогенетическом анализе ФГА-стимулированных лимфоцитов периферической крови (ЛПК). Было выявлено шесть транслокаций (t) : из них 3 реципрокные (2-у женщин, 1- у мужчины) и 3 робертсоновские (1 – у женщины, 2 – у мужчин). Проанализированы нормальные варианты полиморфизма хромосом. Количество выявленных структурных аномалий, частота которых в популяции известна, значительно ниже популяционной величины. Проведен тест с дизэпоксибутаном (ДЭБ-тест) 32 пациентам с миелодиспластическим синдромом и острым лейкозом для выявления хромосомной нестабильности. В 2018 году по результатам ДЭБ-теста пациенты с хромосомной нестабильностью не выявлены.

Определена оценка эффективности использования DSP30 в сочетании с IL2 при культивировании опухолевых клеток больных ХЛЛ для выявления aberrантного кариотипа. Выполняли две серии постановки культур: с добавлением стимулятора деления олигонуклеотида DSP30 и интерлейкин-2 (DSP30+IL2) и с применением стандартного сочетания митогенов LPS и TPA (LPS+TPA). Проанализировано 32 больных ХЛЛ, наблюдавшихся в период с января 2018 по декабрь 2018 года, которым проводились стандартное цитогенетическое исследование (СЦИ) и флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH) в лаборатории кариологии ФГБУ НМИЦ гематологии Минздрава РФ, из них 21 мужчин и 11 женщин в возрасте от 35 до 81 года (медиана возраста 61 лет). Транслокация t(11;14)(q13;q32) была выявлена у 3 больных. У одного больного был сформулирован диагноз диффузная крупноклеточная лимфома и у одного больного – лимфома маргинальной зоны селезенки. Данные больные были исключены из последующего анализа. Таким образом,

в исследование включено 27 больных ХЛЛ. 19 больным исследование проводилось до начала лечения и 8 пациентам с резистентным и рецидивирующим течением. В результате культивирования с DSP30+IL2 СЦИ успешно выполнено 21 (78%) больному. Аберратный кариотип выявлен у 11 (41%) пациентов: у одного из них была найдена одна аберрация, у 3 (11%) – две и у 7 (26%) – три или более аберраций (комплексные нарушения кариотипа). Нормальный кариотип выявлен у 10 (37%) пациентов, но у 6 из них при FISH-исследовании были выявлена делеция 13q14. В двух случаях при отсутствии митозов в культуре с DSP30+IL2 хромосомные нарушения были выявлены в культуре с LPS+TPA. При культивировании с LPS+TPA СЦИ успешно выполнено 23 (85%) больным. Аберратный кариотип в культуре с LPS+TPA выявлен в 9 (33%) случаях: в 4 (15%) - две и в 6 (22%) – комплексные нарушения кариотипа. Нормальный кариотип выявлен у 14 (27%) пациентов. У 2 (7%) больных с нормальным кариотипом в культуре с LPS+TPA при культивировании с DSP30+IL2 выявлены клональные хромосомные аберрации. Сравнение результатов кариотипирования показало наибольшую выявляемость комплексного кариотипа при культивировании с DSP30+IL2 - 7 (26%) пациентов. В 3 случаях выявленные при FISH делеции 13q14 и 17p13 по результатам СЦИ сопровождались сбалансированными или несбалансированными транслокациями в этих локусах. Таким образом, СЦИ является важным методом, позволяющим уточнять структуру хромосомных нарушений, выявлять дополнительные аберрации, и, что особенно важно, выделять группу пациентов самого высокого риска ХЛЛ – с комплексными нарушениями кариотипа для определения тактики их лечения.

Тема 4 Исследование взаимосвязи структурного состояния и механизма действия новых гемостатических и антикоагулянтных средств

За отчетный период были разработаны и приготовлены новые композиционные растворы на основе хитозана с введением в его структура раствора фибрин-мономера, альгината натрия, каррагинана с использованием

различных растворителей (ДВ, 0,5 % УК, 0,5 % МК). На их основе изготовлены 20 различных видов образцов аппликационных губок. Проведено 1284 эксперимента, из них *in vivo* 64, *in vitro* 900, оценка физико-химических свойств 320 измерений. В целом, полученные результаты выявили широкий спектр изменений гемостатических реакций как *in vitro*, так и *in vivo*. Все исследованные образцы губок на основе естественных полимеров в различных растворителях при достаточно кратковременном контакте с кровью (в течение 1 минуты) ускоряли процесс образования первичного тромба на контактной поверхности, но сформировавшийся сгусток имел недостаточно плотную структуру и поэтому при аппликации образцов в форме губки на раневую поверхность печени животного быстро смывался сильным кровотоком, кроме образцов в форме губки на основе хитозана с добавлением в её структуру фибрин-мономера. Доказано, что губки с использованием в качестве растворителя дистиллированную воду (рН $7,57 \pm 0,30$) после контакта с кровью мало влияли на содержание основных субстратов свертывания крови – тромбоцитов и фибриногена. Ситуация значительно изменилась при обеспечении кислой среды (рН $2,90 \pm 0,02$) в процессе приготовления губок. Доказано влияние на гемостатическую активность массовой доли полимера, плотности и общей пористости исследуемых губок. Для дальнейшего уточнения взаимосвязи структурного состояния и механизма действия новых гемостатических средств требуется расширение исследований с увеличением массовой доли исследуемых полимеров и введение в работу еще одного полимера на основе бактериальной целлюлозы. Сульфат целлюлозы со степенью сульфатирования 1.3, проявляющий антикоагулянтную активность (АК), и аминоксидозоксибутил целлюлозы гидрохлорид с молекулярной массой (ММ) 15–25 кДа (степень замещения 0.9–1.0) с АК и антитромбоцитарной активностями - могут быть использованы для получения тромборезистентных поверхностей для биоматериалов. Перспективы использования конъюгата целлюлозы с диборнолом и дезоксицеллюлозы с

ММ 33 кДа (степень замещения 1.0 и 1.5) в конструкциях для доставки лекарственных средств связаны с продолжением оценки их влияния на эритроциты человека.

Тема 5 Изучение иммуномодулирующих свойств мультипотентных мезенхимных стромальных клеток для повышения эффективности их использования в клинической практике для лечения и профилактики острой реакции трансплантат против хозяина

В результате проспективного рандомизированного клинического исследования впервые показано, что введение МСК, полученных от донора гемопоэтических клеток, в момент восстановления общего числа лейкоцитов до $1 \cdot 10^9$ /л достоверно увеличивает общую выживаемость больных после трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток. В исследование было включено 147 пациентов, вошедших в рандомизацию. Шестидесяти девяти из них вводили МСК для профилактики РТПХ, а 78 вошли в контрольную группу. Общая выживаемость достоверно ($p < 0,05$) выше у пациентов, получавших, кроме стандартной профилактики МСК. Безрецидивная выживаемость также была выше в этой группе больных. Совокупность полученных данных указывает на то, что этот эффект связан со снижением вероятности рецидива и развития РТПХ. У 105 больных источником трансплантата был костный мозг (49 в группе введения МСК и 56 в группе стандартной профилактики). МСК для таких больных были получены из костного мозга донора гемопоэтических клеток. Общая и безрецидивная выживаемость в группе введения МСК была достоверно выше чем в контрольной. Вероятность развития острой РТПХ в группу введения МСК была ниже, но не достоверно. Введение МСК от стороннего донора не оказывает подобного эффекта.

Тема 6 Определение клинически релевантных минорных антигенов гистосовместимости при HLA-идентичной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток

С помощью разработанного метода генотипирования была генотипирована когорта здоровых доноров. Для каждого полиморфизма определены частоты встречаемости в Российской популяции. Создана коллекция образцов периферической крови от здоровых доноров гомозиготных по неиммуногенному варианту полиморфизма.

Тема 7 Изменения стромального микроокружения костного мозга под действием цитотоксических препаратов и опухолевых клеток в процессе лечения больных гемобластозами

Основная задача проекта состоит в анализе состояния стромальных предшественников из костного мозга больных лейкозами в момент диагностики заболевания, в процессе химиотерапии, в случае последующей трансплантации костного.

Был проведен сравнительный анализ собранного материал по концентрации КОЕф в момент диагностики заболевания и во всех точках анализа в костном мозге пациентов с ОМЛ, ОЛЛ, ХМЛ и ДВККЛ. в момент диагностики заболевания в костном мозге пациентов с ОМЛ и ОЛЛ существенно и статистически достоверно снижена концентрация КОЕ-Ф, а время, необходимое для формирования конфлуентного монослоя после первичной посадки КМ, увеличено во всех исследованных нозологиях (ОМЛ, ОЛЛ, ХМЛ). Суммарная клеточная продукция достоверно не отличалась от таковой в культурах МСК здоровых доноров. 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 КМ больных

Концентрация КОЕф снижена у больных в дебюте заболевания, по мере лечения она восстанавливается, но не достигает значения у здоровых доноров соответствующего возраста. В КОЕф больных значительно повышен дифференцировочный потенциал. У больных острыми лейкозами он снижается по мере лечения, тогда как у больных ХМЛ повышается еще больше. Суммарная клеточная продукция МСК в дебюте заболевания снижена у больных острыми лейкозами и повышена у больных ХМЛ. По мере лечения она восстанавливается у больных острыми лейкозами и еще больше возрастает у больных ХМЛ. При этом экспрессия провоспалительных факторов в МСК сильно повышается в дебюте заболевания и остается повышенной, экспрессия дифференцировочных факторов снижена в дебюте заболевания и продолжает снижаться в процессе лечения. Хуже всего дело обстоит с факторами, регулирующими кроветворение. Их экспрессия не сильно изменена в дебюте заболевания и снижается в десятки раз по мере лечения. Очевидно, что количественные и качественные характеристики клеток-предшественниц стромального микроокружения в дебюте лейкозов изменяются под воздействием опухолевых клеток. При лечении происходит восстановление количественных характеристик стромальных клеток предшественниц, однако, качественные характеристики страдают еще сильнее от воздействия терапии и не восстанавливаются в исследованные сроки наблюдения. Функция поддержания кроветворения нарушена у больных лейкозами на всех исследованных этапах терапии.