

## КРАТКИЙ АНАЛИТИЧЕСКИЙ ОТЧЕТ

**Тема: Молекулярные, генетические и клеточные механизмы реализации патологических процессов в организме человека при заболеваниях системы крови (отчет заключительный).**

Выявлены мутации в гене фактора VIII у 191 неродственного пациента преимущественно с тяжелой формой гемофилии А и мутации в гене фактора IX у 61 пациента с гемофилией В. Найдены новые мутации – 37 в гене FVIII и 20 в гене FIX. Установлено, что мажорная инверсия inv22, вызывающая тяжелую форму гемофилии А, происходит преимущественно в сперматогенезе. Показано, что некоторые олигоА-тракты в гене FVIII являются горячими точками мутагенеза, и возникающие в них микроделеции и микроинсерции имеют полифилетическое происхождение. Показано также, что среди мутаций, ассоциированных с ингибиторной формой гемофилии А преобладает инверсия inv22. В ходе реализации данного проекта был расширен спектр изучаемых заболеваний и начато молекулярно-генетическое исследование редких коагулопатий (различные варианты фибриногемии и дефицит фактора VII), а также болезни Хагемана, ассоциированной со снижением активности фактора XII. Выявлены новые мутации в генах альфа-, бета- и гамма-субъединиц фибриногена и в гене FVII. Показано наличие мажорных для отечественной популяции мутаций в генах факторов VII и XII.

Исследования позволили у 48,5% пациентов с АИГА обнаружить моноклональность Т-лимфоцитов, за счет клональной экспансии CD8+ популяции лимфоцитов. Данные иммунные клоны сохраняются в период ремиссий, не коррелируют с тяжестью болезни, длительностью заболевания, уровнем гемоглобина, что может говорить об отсутствии прямой связи между обнаружением данных клонов и аутоиммунным процессом. Процент выявления моноклональных результатов у здоровых людей был существенно ниже, чем при АИГА. У здоровых доноров и добровольцев моноклональность выявлялась в 11,3% по генам TCRG и в 3,2% случаев по генам TCRB. Анализ изолированных популяций лимфоцитов у доноров показал, что наличие клональных продуктов, характерно для CD8+CD57+ клеток и не является патологией. У большинства обследованных здоровых людей (у 21 из 25) CD8-CD57- популяция клеток остается поликлональной. Таким образом, выявлено, что Т-клеточный иммунный статус претерпевает существенные изменения у пациентов с аутоиммунными патологиями. Основные репертуарные сдвиги, такие как клональная и олигоклональная экспансия клеток, обеднение репертуара, происходят в CD8+CD57+ популяции лимфоцитов.

Разработана стандартизованная методика выращивания тромбов в интенсивном потоке для изучения их растворения под действием различных воздействий. Проведены калибровочные эксперименты по разрушению сформированных тромбов в потоке под действием различных факторов

(гидродинамических, фибринолитических и т.д.). Разработан протокол экспериментального исследования гидродинамической активации тромбоцитов, собрана и отлажена экспериментальная установка. Выполнены калибровочные эксперименты целью определения критических режимов гидродинамического потока, вызывающих активацию тромбоцитов. Изучено влияние некоторых (доступных) форм ингибиторов тиоловых изомераз на свертывание крови в потоке.

**Тема: Изучение иммуномодулирующих свойств мультипотентных мезенхимных стромальных клеток с целью повышения терапевтической эффективности у больных после трансплантации аллогенных стволовых клеток (отчет промежуточный).**

Выявлено, что культивирование ММСК с 500 ед/мл интерфероном (ИФН) в течение 4-х часов с последующей сменой среды позволяет избежать дополнительных усилий по наращиванию большого количества ММСК. Длительное культивирование ММСК в присутствии 500 ед/мл ИФН не приводило к достоверным изменениям в относительном уровне экспрессии всех изученных иммуномодулирующих генов. При культивировании ММСК с той же концентрацией ИФН в течение 4-х часов с последующей сменой среды уровень экспрессии IDO1 повышается в 360 раз. Уровень экспрессии этого гена после добавления ИФН сильно варьирует, что указывает на то, что ММСК имеют индивидуальные различия. Достоверно и дозозависимо повышается уровень экспрессии IL6 и CSF1 в 2,4-2,5 и 5,5-7 раз соответственно ( $p < 0,05$ ).

Непродолжительная инкубация ММСК с ИФН не изменяет их пролиферативный потенциал и молекулы HLA не успевают начать экспрессироваться на поверхности клеток, однако, по мере пребывания ММСК в организме на них должны начать экспрессироваться HLA-DR и клетки станут иммунокомпетентными. При ко-культивировании ММСК с лимфоцитами происходит взаимовлияние этих клеток друг на друга. Изменяются не только субпопуляции лимфоцитов, но и основные свойства ММСК и ИФН-ММСК. Изменения в ММСК при ко-культивировании с лимфоцитами более выражены, чем при активации этих клеток ИФН. Ко-культивирование с ММСК или ИФН-МСК препятствует переходу наивных Т-лимфоцитов в эффекторное состояние. ММСК также, как и ИФН-ММСК оказывают влияние на переход активированных лимфоцитов между состояниями. ММСК также влияют на проявление маркеров активации ФГА-лимфоцитов. В 5 из 7 случаев после внутрикостного введения МСК у больных отмечалось восстановление донорского кроветворения.

**Тема: Изучение молекулярных, цитогенетических, морфологических основ заболеваний системы крови с целью выявления молекулярно-биологических маркеров, улучшения диагностики, адекватного подбора дифференциальной терапии и мониторинга заболевания (отчет заключительный).**

Выявлена характерная динамика изменения как абсолютного, так и относительного количества гемопоэтических клеток предшественников у

пациентов с гемобластозами после проведенной спленэктомии. При анализе относительного изменения числа лейкоцитов в периферической крови обнаружено, что через сутки после операции происходит значительное увеличение их количества, а потом происходит последовательное снижение их числа.

Выявлено, что наличие ПНГ-клона у больных апластической анемией до проведения иммуносупрессивной терапии можно расценивать как фактор благоприятного прогноза эффективности иммуносупрессивной терапии, фактор более раннего и более полного ответа на проводимое лечение.

Определение экспрессии генов JAK2, MAL, PDL1, PDL2, TRAF1 позволяет провести дифференциальную диагностику первичной медиастинальной В-клеточной лимфомы и диффузной В-крупноклеточной лимфомы с изолированным поражением лимфоузлов средостения. Обнаружение минимальной диссеминированной болезни на момент верификации диагноза не является предиктором неудач терапии.

Определение Т-клеточной клональности по реарранжировкам гамма-цепи Т-клеточного рецептора в костном мозге и/или периферической крови у больных грибовидным микозом/синдромом Сезари является неблагоприятным прогностическим фактором.

Генотипирование 19 продуцентов БЛРС из гемокультуры выявило генетическую идентичность только у двух изолятов *E. coli*, выделенных от одного пациента с интервалом в два месяца. При попарном генотипировании продуцентов БЛРС, выделенных из гемокультуры и со слизистой прямой кишки, генетически родственными были 26% пар изолятов, подтверждая тем самым эндогенный путь инфицирования. Вероятность колонизации кишечника продуцентами БЛРС у больных лимфомами составила 91%, ОМЛ – 84%. Вероятность сохранения колонизации продуцентами БЛРС составила 30,3%. У 13 (39%) из 33 больных вновь возникла колонизация БЛРС-положительными энтеробактериями с медианой в 37 дней. Вероятность возврата колонизации продуцентами БЛРС составила 49,4%. Значимыми факторами риска колонизации слизистой оболочки кишечника БЛРС-положительными бактериями были применение парентерального питания ( $p=0,05$ ) и непрерывное пребывание в стационаре ( $p=0,002$ ).

Del17p13/TP53, t(8q24)/cMYC и ampl1q21 при наличии более, чем 1 дополнительной копии локуса 1q21 являются факторами неблагоприятного прогноза у больных множественной миеломой. Повышенная экспрессия гена c-MYC может являться неблагоприятным прогностическим фактором, только в случае, если активирован MAPK сигнальный путь за счет мутантного гена RAS. Гистологическая картина костного мозга у больных ММ с экстрамедуллярной плазмоцитомой отличается от таковой у больных с костной плазмоцитомой и без плазмоцитомы. Отмечено негативное влияние сочетания CD56+ и c-MYC- в плазмоцитоме на течение заболевания, «чувствительность» опухоли к лечебным препаратам, что диктует необходимость проведения дальнейших молекулярно-биологических исследований опухолевого субстрата при ММ.

Разработан высокочувствительный и высокоспецифичный молекулярный метод диагностики мутаций генов JAK2, MPL, CALR, SRSF2 и SF3B1. Установлено, что при Rh-негативном миелопролиферативных заболеваниях (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.

Разработана система для исследования в гене RHOA на основе аллель-специфичной ПЦР. Изучены нуклеотидные последовательности генов IgVH были определены для 45 пациентов селезеночной В-клеточной лимфомой из клеток маргинальной зоны (СЛКМЗ), так, было выявлено 23 пациента с немутированными VH-генами (51%) и 22 пациента с мутированными (49%). В исследуемой группе VH-гены 23 пациента (51%) принадлежали к семейству VH1, в 12 случаях (26,7%) были выявлены гены семейства VH3 (из них 3 – ген VH3-7), в 8 случаях (18%) – гены семейства VH4. Семейства VH6 и VH7 были выявлены по одному разу (2%). Данное распределение по встречаемости семейств VH1 и VH3 существенно отличается от распределения для В-ХЛЛ и для нормальных В-клеток. При СЛКМЗ в нашей выборке все случаи, относящиеся к семейству VH1 (за исключением одного), экспрессировали генIGHV1-2 (49% от всей выборки). При ХЛЛ этот ген встречается в 5% случаев. Кроме того, при ХЛЛ данный ген существенно чаще бывает немутированным (84%), в то время как при СЛКМЗ количество мутированных и немутированных случаев одинаково.

В результате исследования комплексного кариотипа больных МДС и ОМЛ (n=36) молекулярно-цитогенетическими методами обнаружено в среднем 6 аномалий на кариотип (от 2 до 16). Хромосомные нарушения представлены преимущественно транслокациями (97%). Делеции обнаружены у 94% больных. Найдены дополнительные аномалии и/или дополнительные точки разрыва хромосом у 36,1% больных. Выявлено наибольшее количество нарушений с вовлечением хромосомы 5 (80,6%), хромосома 7(63,9%), хромосома 11 (36,1%), хромосома 17(38,9%). Истинная моносомия 7 обнаружена у одного больного, для хромосом 5 и 17 истинных моносомии не найдено. 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. Для анализа комплексного кариотипа только стандартного цитогенетического исследования G-дифференциально окрашенных хромосом недостаточно, необходимо дополнение молекулярно-цитогенетическими методами исследования. Стратификация больных на группы риска основана на результатах стандартного цитогенетического исследования, однако, нельзя исключить того, что такая детализация комплексных кариотипов с применением современных молекулярно-цитогенетических методов исследования сможет оказать влияние на выбор терапевтической тактики.

Выявлено, что при культивировании DSP30 и IL-2 достоверно увеличивается частота выявления аберрантного кариотипа у больных ХЛЛ по сравнению с митозами, полученными при культивировании LPS+TPA.

Отмечено, что клиничко-лабораторные проявления при миелоидных/лимфоидных новообразованиях с реарранжировкой гена PDGFRA в большинстве случаев соответствуют миелопролиферативным заболеваниям (МПЗ); при лимфаденопатии, которая встречается в 30% случаев, высока вероятность бифенотипического варианта заболевания, что требует подтверждения с определением экспрессии гена PDGFRA в лимфоидных клетках лимфоузла. Установлено, что подтверждение клональности при PDGFRA-позитивных миело/лимфопролиферативных новообразованиях целесообразно только при использовании молекулярно-генетических методов исследования, так как стандартное цитогенетическое исследование (СЦИ) не выявляет хромосомных aberrаций.

**Тема: Определение клинически релевантных минорных антигенов гистосовместимости при HLA-идентичной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (отчет промежуточный).**

Показано, что клетки, специфичные к минорным антигенам гистосовместимости (МАГ) могут быть обнаружены при культивации клеток периферической крови больного после трансплантации с синтетическими антигенными пептидами. Создана коллекция клеточных линий (лимфобластоидные клетки) от больных и доноров, проходящих процедуру аллогенной трансплантации стволовых клеток крови. Продемонстрировано, что МАГ-специфичные Т-клетки при стимуляции клетками, презентующими несопадающий МАГ, экспрессируют гамма-интерферон и могут опосредовать цитотоксичность клеток-мишеней, в то время как аутологичные клетки (представляющие пептид с одной аминокислотной заменой в своих МНС) защищены от цитотоксичности. Клоны Т-лимфоцитов ко-культивировались с лимфобластоидными клетками пациента и донора. С помощью проточной цитофлуорометрии был оценен уровень цитотоксичности Т-лимфоцитов на клетки-мишени. С помощью обратной транскрипции, клонирования полученной кДНК и сенкверинирования по Сенгеру были расшифрованы последовательности бета-цепи ТКР клонов цитотоксических Т-лимфоцитов, специфичных к минорным антигенам HA-1 и HA-2.

**Тема: Изменения стромального микроокружения костного мозга под действием цитотоксических препаратов и опухолевых клеток в процессе лечения больных гемобластозами (отчет промежуточный).**

Показано, что в момент диагностики заболевания в костном мозге (КМ) пациентов с ОМЛ и ОЛЛ существенно и статистически достоверно снижена концентрация КОЕ-Ф, а время, необходимое для формирования конfluентного монослоя после первичной посадки КМ, увеличено во всех исследованных нозологиях (ОМЛ, ОЛЛ, ХМЛ). Суммарная клеточная продукция достоверно не отличалась от таковой в культурах ММСК здоровых доноров. При анализе

относительного уровня экспрессии генов в ММСК больных до начала лечения были выявлены достоверные изменения экспрессии различных ростовых факторов, маркеров дифференцировки и других регуляторных молекул. Совокупность полученных данных указывает на то, что стромальное микроокружение костного мозга изменяется при любом из изученных вариантов лейкозов. Эти изменения не одинаковы и зависят от нозологии. По мере лечения восстанавливаются отдельные характеристики стромальных клеток предшественниц, другие изменения сохраняются долгие годы после достижения ремиссии. Возможно дальнейшее изучения изменения стромального микроокружения позволит уточнить патогенез различных гемобластозов, выявить отдаленные последствия их терапии и в конечном счете оптимизировать лечение.

Генеральный директор  
ФГБУ «НМИЦ гематологии»  
Минздрава России, академик РАН



  
В.Г. Савченко