

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

# **ВЕСТНИК ГЕМАТОЛОГИИ**

**THE BULLETIN OF HEMATOLOGY**

**Том IX № 2 2013**

Ежеквартальный научно-практический журнал  
Основан в сентябре 2004 года

## **Главный редактор**

заслуженный деятель науки Российской Федерации  
профессор  
*К. М. Абдулкадыров*

## **Заместитель главного редактора**

профессор  
*С. С. Бессмельцев*

Санкт-Петербург  
2013

### **Редакционная коллегия:**

*К. М. Абдулкадыров* (главный редактор); *С. С. Бессмельцев* (заместитель главного редактора);  
*М. И. Блинов*; *А. Н. Богданов*; *Л. Н. Бубнова*; *Т. В. Глазанова* (ответственный секретарь);  
*С. А. Гусева*; *А. Ю. Зарицкий*; *Н. М. Калинина*; *Л. П. Папаян*; *В. Г. Радченко*;  
*В. И. Ругаль*; *О. А. Рукавицын*; *В. Н. Чеботкевич*.

### **Редакционный совет:**

*Б. В. Афанасьев* (Санкт-Петербург); *В. В. Базарный* (Екатеринбург);  
*М. Л. Гершанович* (Санкт-Петербург); *К. Г. Дуткевич* (Санкт-Петербург); *Г. А. Зайцева* (Киров);  
*Ю. М. Захаров* (Челябинск); *Л. Г. Ковалева* (Москва); *А. В. Литвинов* (Смоленск);  
*В. И. Мазуров* (Санкт-Петербург); *И. В. Поддубная* (Москва); *Т. Н. Поспелова* (Новосибирск);  
*А. Г. Румянцев* (Москва); *В. Г. Савченко* (Москва); *Н. Н. Третьяк* (Киев); *Н. П. Шабалов* (Санкт-Петербург).

Зав. редакцией — *Е. Р. Шилова*, тел.: (812) 717-58-57

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

### **Адрес редакции:**

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

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

За содержание рекламных объявлений редакция ответственности не несет.

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

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

Редактор *П. Ф. Костевят*

Обложка и художественное оформление *О. С. Дмитриева*

Компьютерная верстка *О. С. Дмитриева*

---

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

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

Подписано в печать 25.03.2013 г. Формат бумаги 60 × 90 1/8.

Бумага офсетная. Печать офсетная. Тираж 500 экз. Заказ 124.

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

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

## СОДЕРЖАНИЕ

<b>Всероссийская научно-практическая конференция «Молекулярно-генетические и иммуногенетические методы диагностики в практике врача гематолога» .....</b>	<b>6</b>
Материалы конференции.....	7
<b>Генетические методы диагностики гемобластозов.....</b>	<b>7</b>
<b>Иммуногенетика в гематологии.....</b>	<b>57</b>
Авторский указатель .....	68

### **Оригинальные статьи**

Ващенко В. И., Вильянинов В. Н., Павлова Е. А., Сороколетова Е. Ф., Лесничий В. В., Ващенко Т. Н., Гусев С. В., Титулова Т. Б. ПОКАЗАТЕЛИ СИСТЕМЫ ГЕМОСТАЗА И МОРФОЛОГИЧЕСКОГО СОСТАВА КРОВИ У ДОНОРОВ КЛЕТОК КРОВИ ПРИ ИЗМЕНЕНИИ СОЛНЕЧНОЙ АКТИВНОСТИ В ТЕЧЕНИЕ ГОДА .....	70
---	----

### **CONTENTS**

#### **Original articles**

Vashchenko V. I., Vilyaninov V. N., Pavlova E. A., Sorokoletova T. F., Lesnichij V. V., Vashchenko T. N., Gusev S. V., Titulova N. B. INDICES OF HEMOSTATIC SYSTEM AND DIFFERENTIAL BLOOD COUNTS IN BLOOD DONORS UPON CHANGES IN ANNUAL SOLAR ACTIVITY AND ITS RANDOM PERTURBANCES .....	70
--	----

**«МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ И ИММУНОГЕНЕТИЧЕСКИЕ  
МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ В ПРАКТИКЕ ВРАЧА ГЕМАТОЛОГА»**

**ВСЕРОССИЙСКАЯ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ**

**Санкт-Петербург**

**25–26 апреля 2013 г.**

**Организаторы конференции:**

Федеральное медико-биологическое агентство России

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

**Тематика конференции:**

1. Цитогенетические и молекулярно-генетические методы исследования в онкогематологии;
2. Место генетических методов исследования в диагностике и мониторинге современной терапии ХМЛ и других миелоидных неоплазий;
3. Применение цитогенетических и молекулярно-генетических методов анализа в диагностике и мониторинге минимальной остаточной болезни при миелодиспластическом синдроме и острых лейкозах;
4. Детекция прогностически значимых генетических маркеров у больных лимфопролиферативными заболеваниями;
5. Современные проблемы подбора гистосовместимых пар донор-реципиент при аллогенной трансплантации ГСК и деятельности Регистра доноров ГСК;
6. Актуальные вопросы диагностики ПНГ;
7. Гены иммуноглобулинподобных рецепторов киллерных клеток;
8. Гены цитокинов;
9. Гены системы НРА.

**Оргкомитет конференции:**

**Председатель оргкомитета:**

д.м.н., профессор *С. С. Бессмельцев* — заместитель директора Российского научно-исследовательского института гематологии и трансфузиологии

**Заместители председателя оргкомитета:**

д.м.н., профессор *Л. Н. Бубнова* — руководитель лаборатории иммуногематологии  
д.б.н. *И. С. Мартынкевич* — руководитель лаборатории молекулярной генетики

**Члены оргкомитета:**

д.м.н. *Глазанова Т. В.*; *Гавровская С. В.*;  
д.м.н. *Павлова И. Е.*; *Заварзина О. А.*;  
к.м.н. *Иванова М. П.*; *Иванова Л. Ю.*;  
к.б.н. *Соколова Ю. В.*; *Цыбакова Н. Ю.*

**Редколлегия материалов конференции:**

**Ответственный редактор:** *С. С. Бессмельцев.*

**Заместители ответственного редактора:** *Л. Н. Бубнова; И. С. Мартынкевич.*

**Члены редколлегии:** *Глазанова Т. В.; Иванова М. П.; Козловская М. А.; Павлова И. Е.*

Абдулкадыров К. М.<sup>1</sup>, Ломаиа Е. Г.<sup>2</sup>, Шуваев В. А.<sup>1</sup>, Абдулкадырова А. С.<sup>1</sup>, Лазорко Н. С.<sup>2</sup>, Мартынкевич И. С.<sup>1</sup>, Никулина Т. С.<sup>2</sup>, Удальева В. Ю.<sup>1</sup>, Усачева Е. И.<sup>1</sup>, Зотова И. И.<sup>1</sup>, Головченко Р. А.<sup>1</sup>, Фоминых М. С.<sup>1</sup>, Иванова М. О.<sup>3</sup>, Мачюлайтене Е. Р.<sup>3</sup>, Позняк Е. И.<sup>3</sup>, Ильина Н. В.<sup>4</sup>, Карягина Е. В.<sup>4</sup>, Романова Е. Г.<sup>2</sup>, Холопова И. В.<sup>2</sup>, Сбитякова Е. Г.<sup>2</sup>, Шнейдер Т. В.<sup>5</sup>, Зарицкий А. Ю.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии, Санкт-Петербург, Россия.

<sup>2</sup> Федеральный центр сердца, крови и эндокринологии им. В. А. Алмазова, Санкт-Петербург, Россия.

<sup>3</sup> Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. И. П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия.

<sup>4</sup> Городская больница № 15, Санкт-Петербург, Россия.

<sup>5</sup> Ленинградская областная клиническая больница, Санкт-Петербург, Россия.

## ЗАБОЛЕВАЕМОСТЬ И РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ ХРОНИЧЕСКИМ МИЕЛОЛЕЙКОЗОМ ЗА 2006–2011 В САНКТ-ПЕТЕРБУРГЕ И ЛЕНИНГРАДСКОЙ ОБЛАСТИ

**Цель.** По литературным данным регистрируемая ежегодная заболеваемость хроническим миелолейкозом варьирует в разных странах от 0,6 до 1,9 случаев на 100 тысяч населения. Хотя известно, что чаще заболевают люди пожилого возраста, эти данные также несколько отличаются в разных популяционных регистрах. Целью данного исследования является оценка заболеваемости хроническим миелолейкозом в Санкт-Петербурге и Ленинградской области с учетом стандартизации по возрасту.

**Материалы и методы исследования.** В 2005 г. впервые была создана популяционная база данных пациентов хроническим миелолейкозом (ХМЛ) в Санкт-Петербурге (СПб) и Ленинградской области (ЛО). В дальнейшем данная база обновлялась не реже 2-х раз в год с включением всех пациентов с подтвержденным Ph и/или bcr-abl позитивным ХМЛ. Популяция СПб и ЛО учитывалась по опубликованным данным переписи населения в России от 2010 г. Для коррекции случаев заболеваемости по возрасту были учтены 3 наиболее используемых стандартных распределения населения по возрасту: по Segi («Мировая»), Скандинавский («Европейская») и по ВОЗ (основанный на средней мировой популяции между 2000–2025).

**Результаты:** За период 2006–2011 в СПб и ЛО было зарегистрировано 258 (242 в хронической, 9 в фазе акселерации и 7 в бластном кризе) вновь выявленных случаев ХМЛ у взрослого населения старше 15 лет. Медиана возраста составила 53 года (48,5 и 55,5 лет для мужчин и для женщин соответственно). Sokal риск удалось определить у 209 пациентов. Он был низким у 37%, средним у 35% и высоким у 28% больных. Средняя частота ежегодной заболеваемости была несколько выше у мужчин с соотношением мужчины:женщины 1,2:1. Средняя ежегодная заболеваемость со-

ставляла 0,74 на 100 000 среди взрослого населения СПб и ЛО старше 15 лет. Этот показатель был выше при коррекции численности населения данной возрастной группы с учетом стандартов популяции по Segi (0,94), по Скандинавии (0,84) и по ВОЗ (0,88). В возрастных группах старше 65 лет заболеваемость была значимо ниже, чем по данным регистров других стран. Заболеваемость общая и скорректированная по возрасту представлена в таблице 1. Большинство пациентов получали или получают терапию иматинибом (98%). Новые ингибиторы тирозин киназ получают в качестве первой и последующей линии 5% и 18% пациентов. Аллогенная трансплантация стволовых клеток проведена всего в 8/258 (3%) пациентов. За период наблюдения всего 25/235 (7,5%) пациентов прогрессировали из хронической в фазу акселерации и/или бластного криза. Умерло 29/258 (11%) пациентов, при этом 21 из-за прогрессии ХМЛ. Вероятность 5 летней общей выживаемости составила 91,5%. Количество живых пациентов на 100 000 населения СПб и ЛО в конце каждого года наблюдения за период 2006–2011 составила 3.15, 3.76, 3.89, 4.45, 4.72 and 5.29 соответственно. Средний ежегодный прирост количества пациентов в нашем регионе составил 11%.

**Заключение.** Заболеваемость во всех возрастных группах кроме группы старше 65 лет была сопоставима с данными популяционных регистров других стран. Причины низкого выявления ХМЛ у лиц пожилого возраста требуют дальнейшего исследования. Практически все пациенты в СПб и ЛО получают терапию ингибиторами тирозин киназ, что обуславливает высокие показатели выживаемости и быстрое увеличение популяции пациентов с ХМЛ в нашем регионе.

Таблица 1.

Средняя общая и скорректированная по возрасту заболеваемость ХМЛ в СПб и ЛО между 2006–2011 гг.

Возрастные группы (годы)	Заболеваемость ХМЛ на 100 000 населения			
	Общая	По Segi («Мировая»)	По Скандинавии («Европейская»)	По ВОЗ
15–19	0,25	0,14	0,18	0,15
20–24	0,29	0,32	0,36	0,31
25–29	0,38	0,41	0,47	0,41
30–34	0,70	0,93	0,79	0,73
35–39	0,45	0,55	0,47	0,46
40–44	0,92	1,01	0,87	0,92
45–49	0,73	0,93	0,79	0,92
50–54	1,02	1,67	1,19	1,55
55–59	1,10	2,02	1,35	1,78
60–64	1,30	2,08	1,67	2,24
65–69	1,17	1,18	0,88	1,20
70–74	0,96	2,40	1,60	2,17
75–79	0,79	2,27	1,14	1,50
80–84	0,77	3,54	1,77	1,94
85+	0,40	1,01	0,51	0,80

Алланазарова Б. Р., Ассесорова Ю. Ю.

Научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Министерства здравоохранения Республики Узбекистан, г. Ташкент.

### ЗНАЧЕНИЕ ОПТИМИЗАЦИИ МЕТОДА СТАНДАРТНОГО ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

В настоящее время накоплена обширная информация о хромосомных aberrациях, как маркерных, так и сопутствующих, при гемобластозах. Значительная часть этой информации получена с использованием стандартной методики дифференцированного окрашивания хромосом, которая дает возможность комплексной оценки всего генома. Однако стандартное цитогенетическое исследование (СЦИ) при гемобластозах часто затруднено вследствие целого ряда факторов, в числе которых низкая митотическая активность определенных типов клеток, их небольшое содержание в костном мозге и периферической крови на ранних стадиях заболевания и на определенных этапах антилейкемической терапии, индивидуальная чувствительность клеток отдельных больных к компонентам среды культивирования, стабилизации митотического цикла, гипотонизации, фиксации и др.

Лаборатория медицинской генетики НИИГ и ПК МЗ РУз существует только 2 года, в течение которых накапливался опыт выявления хромосомных aberrаций при различных видах гемобластозов. Использование методик СЦИ,

применяемых в других цитогенетических лабораториях, не всегда позволяло получать достаточное количество метафазных пластин, пригодных для анализа количественных и структурных перестроек хромосом. Так, при использовании стандартизированных методик, хромосомные и геномные изменения удалось обнаружить у 48,4% больных острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ), у 67,1% больных хроническим лимфобластным лейкозом (ХЛЛ) и у 55,6% больных хроническим миелобластным лейкозом (ХМЛ), причем у 47,6% больных находившихся в хронической стадии, у 6,3% — в стадии акселерации и у 1,6% — в стадии бластного криза.

*Целью данной работы* явилось модифицирование СЦИ для обнаружения диагностически значимых хромосомных aberrаций у больных с гемобластозами.

Использование различных сроков культивирования гемобластных клеток, варьирование соотношением, концентрацией и временем воздействия отдельных компонентов, используемых в методике СЦИ, дало возможность увеличить число регистрируемых митозов и повысить ка-

чество метафазных пластин. Модифицирование стандартной методики цитогенетических исследований в соответствии с условиями лаборатории, позволило выявить изменения хромосом у 74,8% больных ОЛЛ, у 66,7% больных острым нелимфобластным лейкозом (ОНЛЛ), у 83,3% больных ХМЛ (70,8% больных в,находившихся в хронической стадии, 8,3% — в стадии акселерации и 4,2% — в стадии бластного криза).

Таким образом, оптимизация стандартных методик цитогенетического анализа позволяет существенно улучшить результаты исследования, и, следовательно, имеет огромное значение для своевременной диагностики и классификации гемобластозов, выбора адекватной терапии и мониторинга ее эффективности.

*Березина О. В., Вайнер А. С., Воропаева Е. Н., Поспелова Т. И., Филипенко М. Л.*

*Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Новосибирск. Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского Отделения Российской Академии Наук, Новосибирск.*

### ГЕНЫ ФОЛАТНОГО ЦИКЛА КАК МАРКЕРЫ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТИ К РАЗВИТИЮ НЕХОДЖКИНСКИХ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ЛИМФОМ

**Актуальность.** Неходжкинские злокачественные лимфомы — это гетерогенная группа злокачественных лимфопролиферативных заболеваний, которые имеют различную скорость опухолевой прогрессии, что может быть связано не только с мутациями, приобретенными подвергшимися озлокачествлению клетками в фазу инициации, промоции и прогрессии лимфомы, но и с исходными генетическими характеристиками клеток, то есть полиморфизмами генов.

**Цель работы.** Изучить влияние аллельных вариантов генов ключевых ферментов фолатного цикла С677Т и А1298С гена *MTHFR*, А2756G гена *MTR*, А66G гена *MTRR*, G1958A гена *MTHFD1*, С1420Т гена *SHMT1*, Т833С/844ins68 гена *CBS* на предрасположенность к развитию неходжкинских злокачественных лимфом (НХЗЛ).

**Материал и методы.** Обследовано 146 больных неходжкинскими злокачественными лимфомами. Контрольную группу составили 549 доноров Новосибирского центра крови. Определение полиморфных вариантов генов *MTHFD1* и *CBS* проводилось методом ПЦР-ПДРФ; генов *MTHFR*, *MTRR*, *MTR* и *SHMT1* — методом ПЦР в режиме реального времени с использованием конкурирующих TaqMan-зондов, комплементарных полиморфной последовательности ДНК. Поиск публикаций для мета-анализа проводился с помощью базы данных PubMed ([www.pubmed.gov](http://www.pubmed.gov)), обработка данных осуществ-

лялась с использованием пакета GenABEL; gmeta для языка R (версия 2.6.0).

**Результаты.** В обеих группах распределение генотипов для всех исследуемых полиморфных локусов соответствовало распределению Харди-Вайнберга. Не выявлено статистически значимых различий в частотах встречаемости аллелей и генотипов полиморфных локусов генов *MTHFR*, *MTRR*, *CBS*, *SHMT1* между больными НХЗЛ и контролем. Для полиморфного локуса G1258A гена *MTHFD1* выявлена ассоциация мутантного 1958A-аллеля (OR = 0,578, С.И. [0.415–0.805],  $p < 0,001$ ) и А/А-генотипа (OR = 0,283, С.И. [0.130–0.613],  $p < 0,00079$ ) со снижением риска возникновения агрессивных лимфом. При проведении мета-анализа в большинстве исследований отмечена ассоциация мутантного 2756G-аллеля А2756G гена *MTR* со сниженным риском развития НХЗЛ, и при расчете объединенного отношения шансов данная ассоциация оказалась статистически значимой (OR = 0,902; С.И. [0.821–0.991],  $p = 0,03$ ), что подтвердило вклад данной замены в предрасположенность к НХЗЛ.

**Заключение.** Полиморфные локусы G1958A гена *MTHFD1* и А2756G гена *MTR* вносят вклад в предрасположенность к развитию НХЗЛ, при этом мутантные аллели и генотипы данных полиморфизмов обуславливают протективный эффект в отношении НХЗЛ.

Бобоев К. Т., Содикова Ш. Э., Шамсутдинова Д. Б.

Научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Министерства здравоохранения Республики Узбекистан, г. Ташкент.

## РОЛЬ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ДЕТЕРМИНАНТОВ ТРОМБОФИЛИИ В КЛИНИЧЕСКОМ ТЕЧЕНИИ ГЕМОФИЛИИ

В последнее время в литературе появилось сообщение о том, что пенетрантность и клиническая характеристика гемофилии определяется не только спектром мутаций в генах факторов VIII свертывания крови, но и влиянием других генетических факторов, участвующих в гемостазе. К таким относятся мутации в генах факторов протромбина II (G20210A) и V (G1691A Лейден), приводящие к наследственной тромбофилии. Однако подобные исследования малочисленны, а полученные результаты противоречивы, что делает их недостаточными для подтверждения гипотезы о значимости основных тромбофилических мутаций в клиническом течении гемофилии.

**Целью данной работы** явилось изучение взаимосвязи между мутациями генов плазменных факторов гемостаза — протромбина II и FV с клиническим течением гемофилии А.

Материалами для исследования явились образцы ДНК 74 больных гемофилией А (ГА) (38 — с легкой и 36 — с тяжелой формой заболевания) и 75 условно здоровых доноров (контрольная группа).

Образцы геномной ДНК выделяли из лейкоцитарной фракции в соответствии со стандартной методикой. Полиморфизм генов FII (G20210A) и FV (Лейден) определяли методом ПЦР при помощи программируемого термоциклера фирмы Applied Biosystems-2720 (США). Статистический анализ результатов проведен с использованием пакета статистических программ «OpenEpi 2009, Version 2.3».

Частота встречаемости аллельного полиморфизма G20210A гена FII протромбина в изученной группе здоровых доноров, была достаточно низкой 1.3% (1/75), что говорит о популяционной особенности данного генетического маркера.

В обследованной группе больных ГА частота встречаемости данного маркера составила 2.8% (2/74). При этом, различие в частоте распределения данного полиморфизма среди исследованных групп оказалось статистически недостоверным ( $X^2 = 0.3$ ;  $P = 0.5$ ;  $OR = 2.0$ ; 95% CI 1824-23.17).

Установлено, что в подгруппе больных с легкой формой ГА данная мутация выявляется недостоверно в 2 раза чаще, чем в контрольной группе (2.6% и 1.3% соответственно,  $X^2 = 0.2$ ;  $P = 0.6$ ;  $OR = 2.0$ ; 95% CI 0.1217, 32.88). Кроме того, различия по этому показателю между данной подгруппой больных и подгруппой больных с тяжелой формы ГА также оказались незначительными (2.6% и 2.8%, соответственно,  $P > 0.05$ ).

Мутантный аллель — Leiden гена FV среди контрольной группы был обнаружен в 2 случаях (2.7%), а в группе больных частота данного полиморфизма составила 4.0% (3/74). При этом, различие в частоте носительства данного генетического маркера среди этих групп также оказалось статистически недостоверным ( $X^2 = 0.2$ ;  $P = 0.6$ ;  $OR = 1.5$ ; 95% CI 0.2502–9.506).

В обследованной подгруппе больных с легкой формы ГА мутантный аллель — Leiden встречался более чем в 2 раза чаще, чем в контрольной группе (5.3% и 2.7%, соответственно). Однако, такое различие также оказалось статистически недостоверным ( $X^2 = 0.5$ ;  $P = 0.5$ ;  $OR = 2.03$ ; 95% CI 0.2744, 14.98). Сравнительный анализ частоты данной мутации в подгруппах больных с легкой и тяжелой формами ГА также показал статистически незначимые различия (5.3% и 2.8%, соответственно,  $P > 0.05$ ). Необходимо подчеркнуть, что у больных с наличием тромбофилических мутаций клинических проявлений тромбозов и их осложнений не наблюдалось.

Таким образом, полученные нами результаты не достаточно достоверно подтверждают версии некоторых авторов о наличии генетико-компенсаторного механизма в организме больных гемофилией в виде возникновения дефекта в генах противосвёртывающей и фибринолитической систем гемостаза.

Однако для окончательного вывода, по видимому, требуется большее количество исследуемых пациентов, и расширение круга исследуемых генов-детерминантов систем гемостаза.



Вальчук М. А.<sup>1</sup>, Лукьянова А. С.<sup>1</sup>, Зотова Е. В.<sup>1</sup>, Борковска К.<sup>2</sup>,  
Пеньковска-Греля Б.<sup>2</sup>, Корольчук О. С.<sup>1</sup>, Логинский В. Е.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ГУ «Институт патологии крови и трансфузионной медицины НАМН Украины», Львов;

<sup>2</sup> Онкологический центр — Институт им. М. Склодовской-Кюри, Варшава.

## СЛУЧАЙ СЛОЖНОЙ ТРАНСЛОКАЦИИ ХРОМОСОМ 2, 18 и 5 ПРИ ФОЛЛИКУЛЯРНОЙ ЛИМФОМЕ

**Введение.** Фолликулярная лимфома (ФЛ) — опухоль из В-клеток герминальных центров лимфоидных фолликулов с преимущественным поражением периферических лимфоузлов, реже — глубоких лимфоузлов, селезенки, в 50–60% случаев — костного мозга, изредка — экстранодальных областей (желудочно-кишечного тракта, кожи). Для ФЛ характерна транслокация t(14;18)(q32;q21). Ключевым моментом в патогенезе этой лимфомы является перенесение гена *BCL2* с хромосомы 18 на хромосому 14 (локус *IGH*). Возможны также варианты транслокации t(2;18)(p12;q21) и t(18;22)(q21;q11) с участием генов легких цепей иммуноглобулинов *IGK* и *IGL* на хромосомах 2 и 22. При ФЛ и диффузной В-крупноклеточной лимфоме изредка встречается транслокация t(5;18)(p11;q21), в которой также участвует ген *BCL2*. В данной работе описан случай сложной транслокации t(2;18;5)(p11;q21;q21) у больного с диагнозом ФЛ.

**Цель исследования** — определить состав выявленной сложной транслокации.

**Материал и методы.** Больной О., возраст — 56 лет, обратился с жалобами на общую слабость и увеличение периферических лимфатических узлов, лимфоузлов брюшной полости и печени. Были проведены общеклинические исследования; биопсия периферического лимфоузла оказалась неинформативной. Диагноз ФЛ установлен на основании результатов клинико-гематологического и инструментального обследования, гистологического и иммуногистохимического исследований повторной биопсии. Цитогенетическое исследование клеток полученного биопсийного материала было проведено по стандартной методике. При проведении метода флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH) использованы метки *BCL2* Break Apart, *IGK* Break Apart, а также метки к целым хромосом (WCP) 2 и 5. Все FISH-исследования проведены в лаборатории цитогенетики Онкологического центра — Института им. М. Склодовской-Кюри (Варшава, Польша). При кариотипировании анализировали 20 мета-

фазных пластинок, при FISH-исследовании — не менее 200 интерфазных ядер. При анализе и описании кариотипа руководствовались критериями *International System for Human Cytogenetic Nomenclature* — ISCN, 2009.

**Результаты.** Во всех проанализированных метафазных пластинках обнаружены изменения структуры хромосом 2, 5 и 18, что позволило предположить наличие сложной транслокации. FISH-анализ на метафазных пластинках с использованием меток к целым хромосомам 2 и 5 показал наличие фрагмента хромосомы 5 на коротком плече хромосомы 2, деривата хромосомы 5 с дополнительным материалом и фрагмента хромосомы 2 на деривате хромосомы 18. Сопоставление полученного результата с результатом анализа кариотипа позволило установить наличие транслокации t(2;18;5)(p11;q21;q21). Дополнительные FISH-исследования с использованием меток Break Apart к генам *IGK* (локус 2p11) и *BCL2* (локус 18q21) показали наличие реарранжировок указанных генов. Пациенту было проведено 5 курсов химиотерапии по схеме COP, что привело к ремиссии. В данный момент пациент находится под наблюдением.

**Выводы.** Нами описан случай сложной транслокации t(2;18;5)(p11;q21;q21). В обнаруженной перестройке принимал участие ген *BCL2* с точками разрыва, характерными для ФЛ, а партнером транслокации был ген *IGK* на хромосоме 2. Несмотря на то, что при ФЛ варианты транслокации встречаются очень редко, в некоторых случаях в активации гена *BCL2* может участвовать не только ген *IGH*, но и другие гены иммуноглобулинов. В связи с этим можно предполагать, что FISH-анализ при ФЛ может быть более информативен при использовании метки типа Break Apart, а не транслокационной метки *IGH/BCL2*. Наблюдение за результатом лечения больного может в будущем дать дополнительную информацию относительно влияния вариантной транслокации *IGK/BCL2* на прогноз.

Воропаева Е. Н., Поспелова Т. И., Воевода М. И.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт терапии» Сибирского отделения Российской Академии медицинских наук, Бюджетное государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Новосибирск.

## ЗНАЧЕНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА rs1625895 ГЕНА TP53 У БОЛЬНЫХ НЕХОДЖКИНСКИМИ ЛИМФОМАМИ ВЫСОКОЙ СТЕПЕНИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОСТИ

**Актуальность.** Антионкоген TP53 является ключевым участником контроля клеточного цикла и запуска апоптоза. Дефицит его функции аргіогі может быть одним из механизмов формирования резистентности к лечению опухолевых заболеваний, в том числе неходжкинских злокачественных лимфом (НХЗЛ). Поскольку частота мутаций TP53 при НХЗЛ (3–12%) крайне низка, в отличие от солидных опухолей (60–80%), полиморфизмы данного гена, в том числе rs1625895, могут быть одним из значимых механизмов модификации его активности при данных формах гемобластозов.

**Цель исследования.** Изучить ассоциацию rs1625895 гена TP53 с эффективностью терапии агрессивных НХЗЛ.

**Материал и методы.** Группу обследования составили 61 пациент Городского гематологического центра г. Новосибирска с агрессивными В-клеточными НХЗЛ, диагностированными в 2004–2008 гг. Больные в зависимости от стадии заболевания, а также прогностической группы, согласно R-IP1, в качестве терапии первой линии получили от 4-х (при I–II стадии) до 6–8 (при III–IV стадии) курсов иммунополихимиотерапии, включающей препарат анти-CD20 моноклональных антител Ритуксимаб. В терапии использовались протоколы — R-CHOP, R-CHOP2, R-ESHAP. Исследование rs1625895 гена TP53 проводилось методом ПЦР с последующим ПДРФ-анализом. 5-летнюю выживаемость пациентов исследовали с помощью метода Каплана — Майера с расчетом непараметрического log-rank-критерия. Для оценки значимости генотипа rs1625895 гена TP53 в качестве независимого предиктора выживаемости применялась модель пропорциональных рисков регрессии Кокса.

**Результаты.** Гомозиготный генотип G/G был обнаружен у 72% больных агрессивными лимфомами, гомозиготный генотип A/A — у 3,4% и гетерозиготный генотип G/A — у 24,6% пациентов.

Частота ремиссий в группе обследованных больных составила 54,1%. В подгруппе паци-

ентов с G/G генотипом ремиссия получена у 40,9% человек, что было статистически значимо ( $p=0,0008$ ) ниже, чем в подгруппе больных с G/A и A/A генотипами — 88,2%.

Законченное 5-летнее наблюдение к настоящему моменту имеют 41 пациент. При анализе показателей 5-летней выживаемости в данной группе больных агрессивными НХЗЛ были получены следующие результаты: общая выживаемость составила 36,6%, безрецидивная — 24,4%. Проведенный сравнительный анализ ассоциации генотипа rs1625895 гена TP53 у больных агрессивными НХЗЛ с 5-летней выживаемостью выявил наличие ассоциации G/G генотипа со статистически значимым ухудшением показателей общей 21,4% и безрецидивной 10,7% выживаемости против 69,2% ( $p=0,004$ ) и 53,9% ( $p=0,0006$ ) при G/A и A/A генотипах, соответственно.

Оценка влияния генотипа rs1625895 гена TP53 на 5-летнюю выживаемость в модели пропорциональных рисков регрессии Кокса также показала, что генотип данного полиморфизма может служить независимым предиктором как общей, так и безрецидивной 5-летней выживаемости. При G/G генотипе в сравнении с G/A и A/A генотипами показано достоверное повышение риска ухудшения в 3,3 раза ( $p=0,016$ ) общей, в 3,6 раза безрецидивной ( $p=0,006$ ) выживаемости.

**Выводы.** В 1996 году на совместной конференции Американского общества клинических онкологов и Национального института рака США эффекты терапии новообразований были разделены по мере убывания значимости: 1 — общая выживаемость, 2 — качество жизни, 3 — опухолевый ответ, 4 — безрецидивная выживаемость. Полиморфизм rs1625895 гена TP53 можно использовать, как один из независимых предикторов как вероятности достижения ремиссии, так и общей и безрецидивной 5-летней выживаемости больных агрессивными НХЗЛ.

*Гиндина Т. Л., Морозова Е. В., Станчева Н. В., Бондаренко С. Н., Власова М. Е., Николаева Е. С., Петрова И. А., Афанасьев Б. В.*

*Институт детской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р. М. Горбачевой, Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. академика И. П. Павлова, Санкт-Петербург.*

## **ВЫЖИВАЕМОСТЬ БОЛЬНЫХ МДС ПОСЛЕ АЛЛО-ТГСК В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКОГО ПРОФИЛЯ**

Хромосомные аномалии встречаются примерно у половины пациентов с первичным миелодиспластическим синдромом (МДС) и являются важным прогностическим фактором. Согласно новой международной системе оценки риска при МДС (R-IPSS) выделено пять прогностических цитогенетических групп (J.Schanz et al, 2012). В первую группу с очень хорошим прогнозом вошли такие аномалии, как делеция 11q и потеря Y. Вторую группу с хорошим прогнозом формируют больные с нормальным кариотипом, делециями 5q, 12p, 20q и двойные хромосомные перестройки, сочетающиеся с 5q делецией. Третью промежуточную группу составляют делеции 7q, трисомии 8 и 19, изохромосома 17 по длинному плечу и другие двойные аномалии. Хромосомные aberrации, формирующие четвертую группу с плохим прогнозом включают перестройки с вовлечением 3q, моносомия 7, двойные aberrации с моносомией 7 или делецией 7q, сложные перестройки с повреждением трёх хромосом. Пятую цитогенетическую группу с очень плохим прогнозом составляют сложные хромосомные нарушения с вовлечением более трех хромосом. Показано, что новые прогностические группы более точно определяют исход заболевания и вероятность рецидива, в том числе и после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК) (H. J. Deeg et al, 2012).

В данной работе проанализированы результаты цитогенетического исследования 46 больных (22 мужчин и 24 женщин) с первичным МДС, которым в нашем институте была проведена алло-ТГСК в период с 2009 по 2013 год. Возраст больных от 10 мес до 58 лет (медиана  $26,2 \pm 2,8$  лет), из них 16 детей в возрасте до 14 лет (35%), 7 подростков от 14 до 21 года (15%), и 23 взрослых старше 21 года (50%). Основную когорту формировали пациенты с рефрактерной анемией с избытком бластов (РАИБ-1 и РАИБ-2) — 75%,

пациенты с рефрактерной цитопенией с мультилинейной дисплазией составляли 22% и с рефрактерной анемией с кольцевыми сидеробластами — 3%.

Численные и/или структурные хромосомные перестройки были обнаружены у 34 больных (74%), нормальный кариотип — у 12 человек (26%). Распределение по пяти прогностическим цитогенетическим вариантам было следующим: очень хороший прогноз — 4% больных, хороший — 31%, промежуточный — 20%, плохой — 41%, очень плохой — 4%. Ввиду малочисленности первой и пятой групп при проведении статистического анализа мы объединили цитогенетические группы с очень хорошим и хорошим прогнозом, а также группы с очень плохим и плохим прогнозом. К прогностически благоприятным цитогенетическим факторам был отнесен нормальный кариотип ( $n=12$ ), делеции 5q ( $n=2$ ) и 11q ( $n=2$ ). Группу с кариотипом промежуточного прогноза составили больные с трисомиями 8( $n=4$ ), 21( $n=1$ ), 22( $n=1$ ) хромосомы,  $der(1;7)(q10;p10)(n=2)$  и  $dic(1;15)(n=1)$ . Неблагоприятные хромосомные аномалии составляли моносомия 7( $n=13$ ), реаранжировки 3q26 локуса ( $n=5$ ) и сложные хромосомные aberrации с тремя и более перестройками ( $n=3$ ). Проведенное исследование подтвердило, что общая выживаемость после алло-ТГСК была наименьшая в группе пациентов, имеющих неблагоприятный кариотип. Обнаружена достоверная разница между общей выживаемостью в цитогенетических группах с благоприятной и неблагоприятной цитогенетикой. Предварительные данные показывают, что хороший прогноз после алло-ТГСК может быть также связан с наличием реакции трансплантат против хозяина (РТПХ).

Горбунова А. В., Лепик К. В., Бархатов И. М., Мамаев Н. Н.

Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова», Санкт-Петербург

## ДЕТЕКЦИЯ МУТАЦИИ T315I В ГЕНЕ BCR-ABL У ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКИМ МИЕЛОЛЕЙКОЗОМ С ПОМОЩЬЮ АЛЛЕЛЬ-СПЕЦИФИЧНОЙ ПЦР

Мутация T315I в гене *BCR-ABL* обуславливает развитие резистентности ко всем ингибиторам тирозинкиназ, применяемым в настоящее время в клинической практике в качестве первой и второй линий терапии хронического миелолейкоза. Как правило, пациенты с выявленной мутацией T315I нуждаются в проведении аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток.

Для детекции мутаций в киназном домене гена *BCR-ABL* применяется метод прямого ферментативного секвенирования по Сэнгеру. Метод позволяет выявлять все возможные типы мутаций в киназном домене, однако его низкая чувствительность не позволяет обнаружить мутантный клон, если он не превышает 20% *BCR-ABL* позитивных клеток. В то же время, выявление пациентов, имеющих мутацию T315I в небольшом количестве транскриптов, позволило бы иметь больше времени для поиска неродственного донора и подготовки к трансплантации.

В настоящей работе предложен новый метод детекции мутации T315I у пациентов с хроническим миелолейкозом, обладающий высокой чувствительностью и позволяющий проводить количественную оценку мутантного клона. Метод основан на аллель-специфичной полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в режиме реального времени.

**Методы и материалы.** Было проанализировано 46 образцов периферической крови, полученных от больных хроническим миелолейкозом. В качестве контроля использовали *BCR-ABL* позитивную клеточную линию к562, не имеющую мутаций в киназном домене, а также 10 образцов периферической крови больных *BCR-ABL* негативными лимфопролиферативными заболеваниями.

Тотальную РНК выделяли из периферической крови. Синтез кДНК осуществляли с использованием случайных гексамерных праймеров. Во всех образцах определяли уровень относительной экспрессии гена *BCR-ABL*.

В *BCR-ABL* позитивных образцах с помощью прямого секвенирования исследовали мутационный статус киназного домена гена *BCR-ABL*.

Последовательность кДНК киназного домена амплифицировали в два этапа и затем секвенировали в обоих направлениях с использованием реактивов Big Dye 3.1. (Applied Biosystems, США). Нуклеотидную последовательность сравнивали с референсной последовательностью транскрипта *c-abl 1* (NCBI Reference Sequence: NM-005157.4).

Аллель-специфичную (АС) ПЦР для детекции точечной мутации T315I и количественной оценки содержания мутантных транскриптов проводили также в два этапа. На первом этапе амплифицировали фрагмент химерного транскрипта *bcr-abl*, второй этап предусматривал проведение двух отдельных ПЦР с детекцией сигнала в режиме реального времени с аллель-специфичными праймерами.

**Результаты.** С помощью АС ПЦР мутация T315I была обнаружена во всех образцах, наличие мутации в которых было установлено по методу прямого секвенирования (n=10) и не была выявлена ни в одном из контрольных образцов, полученных от больных *BCR-ABL*-отрицательными лимфопролиферативными заболеваниями (n=10) и клеточной линии к-562. Кроме того, было проанализировано 11 образцов пациентов, в которых с помощью прямого секвенирования не было обнаружено мутации T315I, но были выявлены другие мутации в киназном домене гена *BCR-ABL*: Y253H (n=3), F317L (n=3), E255K (n=3), G250E (n=2). Ни в одном из этих случаев АС ПЦР не выявила мутации T315I.

Чувствительность метода была определена на серийных разведениях, полученных в результате смешивания образцов кДНК, полученных от больных с мутацией T315I, и клеточной линии к-562. Положительные контрольные образцы, а также разведения 1:10 и 1:100, были положительными по результатам АС ПЦР в 100% случаев, разведения 1:500 — в 80% случаев, разведения 1:1000 — в 75% случаев.

Ретроспективный анализ серии образцов, полученных от пациента с мутацией T315I, показал, что АС ПЦР позволяет выявить возникновение мутантного клона на 6 месяцев раньше,

чем традиционно используемый метод прямого секвенирования, однако мутация не обнаруживается в образцах, полученных за 12 и 9 месяцев до момента обнаружения мутации с помощью прямого секвенирования.

**Выводы.** По сравнению с методом прямого секвенирования аллель-специфичная ПЦР дает возможность обнаруживать небольшие коли-

чества (1% и менее) транскриптов с мутацией T315I в присутствии транскриптов дикого типа. Таким образом, пациенты, для которых проведение аллогенной трансплантации гемопоэтических клеток представляется целесообразным, могут быть выявлены на несколько месяцев раньше, чем при использовании прямого секвенирования.

*Загоскина Т. П., Овсепян В. А., Зотина Е. Н., Баранчикова С. В., Криницына Е. Е.*

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

### **ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА КЛЕТОК С ДЕЛЕЦИЕЙ 13q14 У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ЛИМФОЛЕЙКОЗОМ**

Наличие изолированной делеции 13q14 (del13q14) у больных хроническим лимфолейкозом (ХЛЛ) считается благоприятным фактором прогноза течения заболевания. Однако больные ХЛЛ отличаются друг от друга по количеству клеток, имеющих данное хромосомное нарушение.

**Целью настоящего исследования** явилась оценка прогностического значения количества клеток с del13q14 у больных ХЛЛ.

**Материалы и методы.** В исследование было включено 124 больных ХЛЛ с del13q14. Медиана возраста составила 61 год. Стадия А по Vinet была установлена у 25 (20%) больных, стадия В — у 84 (68%), стадия С — у 15 (12%) пациентов. Хромосомные нарушения определяли методом FISH в момент постановки диагноза до начала специфической терапии.

**Результаты.** В качестве единственной хромосомной аномалии del13q14 была обнаружена у 77 (62%) больных, в сочетании с другими хромосомными нарушениями — у 47 (38%) пациентов. Больные с единственной del13q14 были разделены на 2 группы в зависимости от количества клеток, имеющих данную aberrацию. Пороговое значение количества клеток с del13q14 равнялось 60%. Для определения порогового значения использовали ROC-анализ. В 1 группу вошли 41 (53%) больной с del13q14 в  $\geq 60\%$  клеток, во 2 группу — 36 (47%) пациентов с del13q14 в  $< 60\%$  клеток. Медиана наблюдения

за больными составила 68 мес. Медиана ОВ у пациентов с del13q14 в  $< 60\%$  клеток равнялась 144 мес, медиана выживаемости, свободной от лечения, составила 42 мес. У больных с del13q14 в  $\geq 60\%$  клеток медиана ОВ равнялась 65 мес, а медиана выживаемости, свободной от лечения, — 13 мес ( $p=0,034$  и  $p=0,002$ , соответственно). При проведении многофакторного анализа в исследование были включены следующие параметры: возраст, пол, стадия заболевания по Vinet, соматический статус по шкале ECOG, уровень экспрессия белка Zap-70, содержание ТК и  $\beta_2$ -микроглобулина в сыворотке крови, а также количество клеток с del13q14 (пороговое значение — 60%). Оказалось, что независимыми факторами прогноза ОВ и выживаемости, свободной от лечения, у больных ХЛЛ явились уровень экспрессии Zap-70 ( $p=0,014$  и  $p=0,023$ ), содержание ТК ( $p=0,036$  и  $p=0,009$ ) и  $\beta_2$ -микроглобулина в сыворотке крови ( $p=0,012$  и  $p=0,031$ ), а также количество клеток с del13q14 ( $p=0,016$  и  $p=0,025$ ).

Таким образом, больные с del13q14 в  $\geq 60\%$  клеток имеют менее благоприятный прогноз по сравнению с больными с del13q14 в  $< 60\%$  клеток. Для более точной стратификации пациентов на группы риска следует использовать одновременно комплекс факторов, включающий количество клеток с del13q14, Zap-70, ТК и  $\beta_2$ -микроглобулин, который позволит более точно идентифицировать больных с неблагоприятным прогнозом.

Зарицкий А. Ю.<sup>1</sup>, Ломаиа Е. Г.<sup>1</sup>, Абдулкадырова А. С.<sup>2</sup>, Мартынкевич И. С.<sup>2</sup>, Мачюлайтене Е. Р.<sup>3</sup>, Мартыненко Л. С.<sup>2</sup>, Иванова М. П.<sup>2</sup>, Цыбакова Н. Ю.<sup>2</sup>, Петрова Е. В.<sup>2</sup>, Козловская М. А.<sup>2</sup>, Никулина Т. С.<sup>1</sup>, Удальева В. Ю.<sup>2</sup>, Усачева Е. И.<sup>2</sup>, Зотова И. И.<sup>2</sup>, Головченко Р. А.<sup>2</sup>, Фоминых М. С.<sup>2</sup>, Иванова М. О.<sup>3</sup>, Лазорко Н. С.<sup>1</sup>, Ильина Н. А.<sup>1</sup>, Романова Е. Г.<sup>1</sup>, Сбитякова Е. Г.<sup>1</sup>, Шнейдер Т. А.<sup>4</sup>, Холопова И. В.<sup>1</sup>, Шуваев В. А.<sup>2</sup>, Абдулкадыров К. М.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Федеральный центр сердца, крови и эндокринологии им. В. А. Алмазова, Санкт-Петербург, Россия.

<sup>2</sup> Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии, Санкт-Петербург, Россия.

<sup>3</sup> Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. И. П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия.

<sup>4</sup> Ленинградская областная клиническая больница, Санкт-Петербург, Россия.

## ПРОГНОСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ ШКАЛЫ ХАММЕРСМИТ ПРИ ТЕРАПИИ ИНГИБИТОРАМИ ТИРОЗИНКИНАЗ ВТОРОГО ПОКОЛЕНИЯ В ХРОНИЧЕСКОЙ ФАЗЕ ХРОНИЧЕСКОГО МИЕЛОЛЕЙКОЗА

**Цель.** Ингибиторы тирозинкиназ (ИТК) второго поколения высокоэффективны у пациентов, с неудачей терапии иматинибом. Однако около половины пациентов не достигают цитогенетической ремиссии. Шкала Хаммерсмит была разработана для прогнозирования результатов терапии ИТК второго поколения. Целью данной работы является оценка возможности прогнозирования эффективности ИТК с помощью данной шкалы в нашей группе пациентов, с резистентностью или непереносимостью иматиниба.

**Материалы и методы.** Шкала Хаммерсмит включает группы риска Sokal на момент постановки диагноза ХМЛ, наличия нейтропений, а также уровень цитогенетического ответа на предшествующей терапии иматинибом. Группы риска по данной шкале была оценена у 44 из 62 пациентов, получающих терапию ИТК второго поколения нилотинибом или дазатинибом. Соотношение мужчин и женщин было 21:23. Медиана возраста на момент начала данной терапии составила 50,5 лет (26–72 лет). Пациенты получали терапию нилотинибом 800 мг/д (n=30), дазатинибом 100(n=12) и дазатинибом 140 мг (n=2) в день. Медиана предшествующей терапии иматинибом составила 15 мес (2–59 мес).

Медиана наблюдения от начала ИТК второго поколения составила 32 мес (2–90 мес). Терапия прекращена у 24/44 (54%) пациентов. Группы риска по шкале Хаммерсмит были следующими: низкая у 11 (25%), средняя у 27 (61%) и высокая у 6 (14%).

**Результаты.** Частота полного цитогенетического ответа (ПЦГО) составила в общей группе 42%. Этот показатель составил 63,6% и 48% в группах низкого и среднего риска, тогда как ни один пациент с высоким риском по шкале Хаммерсмит ПЦГО не достиг (p<0,05). Вероятность достижения ПЦГО к 12 мес в группе низкого, среднего и высокого риска по данной шкале также достоверно различалась и составила соответственно 78%, 40% и 0% (p<0,05). За время наблюдения погибли 11 (25%) пациентов, большинство из них из-за прогрессии ХМЛ. Вероятность 5-летней общей выживаемости составила 70%.

**Заключение.** Терапия ИТК второго поколения эффективна у пациентов с неудачей терапии иматинибом. Для прогнозирования эффективности данной терапии целесообразно определение группы риска пациента по шкале Хаммерсмит.

Зарицкий А. Ю.<sup>1</sup>, Мартынкевич И. С.<sup>2</sup>, Шуваев В. А.<sup>2</sup>, Абдулкадырова А. С.<sup>2</sup>, Мартыненко Л. С.<sup>2</sup>, Иванова М. П.<sup>2</sup>, Цыбакова Н. Ю.<sup>2</sup>, Петрова Е. В.<sup>2</sup>, Козловская М. А.<sup>2</sup>, Никулина Т. С.<sup>1</sup>, Удальева В. Ю.<sup>2</sup>, Усачева Е. И.<sup>2</sup>, Зотова И. И.<sup>2</sup>, Головченко Р. А.<sup>2</sup>, Фоминых М. С.<sup>2</sup>, Иванова М. О.<sup>3</sup>, Мачюлайтене Е. Р.<sup>3</sup>, Ильина Н. А.<sup>1</sup>, Дохина Н. Н.<sup>1</sup>, Романова Е. Г.<sup>1</sup>, Сбитякова Е. Г.<sup>1</sup>, Холопова И. В.<sup>1</sup>, Ломаиа Е. Г.<sup>1</sup>, Абдулкадыров К. М.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Федеральный центр сердца, крови и эндокринологии им. В. А. Алмазова, Санкт-Петербург, Россия.

<sup>2</sup> Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии, Санкт-Петербург, Россия.

<sup>3</sup> Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. И. П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия.

## КОРРЕЛЯЦИЯ МЕЖДУ УРОВНЕМ Ph-ХРОМОСОМЫ И ТРАНСКРИПЦИЕЙ ГЕНА *bcr-abl* У ПАЦИЕНТОВ ХРОНИЧЕСКИМ МИЕЛОЛЕЙКОЗОМ

**Цели.** В литературе появились данные о прогностической значимости снижения уровня транскрипции гена *bcr-abl* <10% к 3 мес, 6 мес

и <1% к 12 мес терапии ингибиторами тирозинкиназ (ИТК) у пациентов хроническим миелолейкозом (ХМЛ). Между тем, как данные

других, так и собственные данные четко подтверждают прогностическую роль получения большого и полного цитогенетического ответов к 6 и 12 мес терапии ИТК. Обсуждается возможность мониторинга результатов терапии только с помощью количественного определения уровня bcr-abl методом полимеразно цепной реакции (ПЦР). Целью данной работы является изучить корреляцию результатов цитогенетического исследования и количественного определения ПЦР у пациентов ХМЛ.

**Материалы и методы исследования.** В исследование включено 203 цитогенетического и ПЦР анализа от 126 пациентов. Все анализы выполнены в молекулярно-генетических лабораториях ФЦСКЭ им ВА Алмазова и РосНИИГиТ. Обе лаборатории имеют международный сертификат по стандартизации метода ПЦР. Условием отбора проб был промежуток между выполнением ЦГ и ПЦР анализа у пациента, который не должен был превышать 14 дней.

**Результаты.** Распределение пациентов по цитогенетическому ответу было следующим: полный (Ph 0%), частичный (Ph 1–34%), малый (Ph 35–64%), минимальный (Ph 65–94%) и без (Ph 95–100%) ответа имели соответственно 98/203 (48,2%), 29/203 (14,2%), 11/203 (5,4%), 21/203 (10,2) и 44/203 (22%) пациента.

Неопределяемый уровень bcr-abl транскрипта имели 25/203 (12,3%). У остальных пациентов, с определяемым транскриптом, были следующие ответы: большой молекулярный ответ (БМО) у 32/203 (15,8%), уровень bcr-abl >0,1–<1% у 40/203 (19,7%), 1–<10% у 43/203 (21,2%) и >10% у 63/203 (31%) пациентов. Результаты сопоставления ЦГ и ПЦР данных представлены в таблице. Подавляющее количество пациентов с ПЦГО имели уровень bcr-abl <1%. Так, данный уровень bcr-abl был у 90/98 (92%) пациентов с ПЦГО. Все 97 пациентов с уровнем bcr-abl транскрипта менее 1% имели полный (93%) или частичный (7%) ЦГ ответы. У большинства 56/65 (86%) пациентов с высоким уровнем Ph (≥65%) транскрипт bcr-abl также был высоким (≥10%). Следует отметить, что в зоне bcr-abl 1–<10% распределение пациентов по разным цитогенетическим группам было менее четким. Так, хотя 42% пациентов данной группы имели частичный ЦГ ответ, частота случаев с ПЦГО (19%), малого (19%) и минимального + отсутствием ЦГ ответа (21%) была сопоставима.

**Заключение.** В целом исследование показало отчетливую корреляцию между результатами ЦГ и ПЦР ответов. Однако при уровне транскрипта bcr-abl в промежутке 1–<10% выявлена значительная вариабельность ЦГ ответов.

Таблица.

**Корреляция между результатами ЦГ и ПЦР анализа.**

Уровень Ph+	Уровень Bcr-abl/abl					Всего
	0% (n=25)	>0–0,1% (n=32)	>0,1–<1% (n=40)	1–<10% (n=43)	≥10% (n=63)	
Полный ЦГО (0%) (n=98)	25	31	34	8	0	98 (48,2%)
Частичный ЦГО (1–34%) (n=29)	0	1	6	18	4	29 (14,2%)
Малый ЦГО (35–64%) (n=11)	0	0	0	8	3	11 (5,4%)
Минимальный (65–94%) (n=21)	0	0	0	5	16	21 (10,2)
Нет ЦГО (95–100%) (n=44)	0	0	0	4	40	44 (22%)
<b>Всего</b>	<b>25 (12,3%)</b>	<b>32 (15,8%)</b>	<b>40 (19,7%)</b>	<b>43 (21,2%)</b>	<b>63 (31%)</b>	

Сокращения: ЦГО цитогенетический ответ

Зотова Е. В.<sup>1</sup>, Лукьянова А. С.<sup>1</sup>, Вальчук М. А.<sup>1</sup>, Рымар М. М.<sup>1</sup>,  
Кароль Ю. С.<sup>1</sup>, Мишарина Ж. А.<sup>2</sup>, Логинский В. Е.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ГУ «Институт патологии крови и трансфузионной медицины НАМН Украины», Львов.

<sup>2</sup> ГУ «Научный центр радиационной медицины НАМН Украины», Киев.

## ХРОМОСОМНЫЕ ПЕРЕСТРОЙКИ ПРИ ОСТРЫХ ЛИМФОБЛАСТНЫХ ЛЕЙКОЗАХ

**Введение.** У больных острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ), по данным литературы, при цитогенетическом исследовании злокачественных клеток клональные хромосомные перестройки определяют в 60–85 % случаев. Довольно часто (10–20 %) у больных ОЛЛ митозы отсутствуют либо их качество неудовлетворительное. Особенно сложно бывает провести цитогенетическое исследование при массивной гиперплоидии из-за плохого разброса, взаимных наложений и низкого качества хромосом. Нередко существуют случаи субмикроскопических перестроек, которые не вызывают изменений морфологии хромосом и, следовательно, не обнаруживаются стандартным цитогенетическим методом. Поэтому, помимо обязательного анализа дифференциально окрашенных хромосом, у больных ОЛЛ необходимо применять метод флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH) для выявления «скрытых» перестроек.

**Цель исследования** — оценить диагностическое и прогностическое значение цитогенетических перестроек у больных ОЛЛ.

**Материал и методы.** Обследовано 19 больных в возрасте от 23 до 82 лет. Диагноз ОЛЛ устанавливали на основании результатов клинико-гематологических, цитологических и иммунофенотипических исследований. Образцы лейкоэмических клеток от больных получали путем аспирационной биопсии костного мозга и при венопункции. Использовали общепринятый метод 24- и 48-часового культивирования клеток костного мозга и/или периферической крови *in vitro*. Обработку клеток проводили по общепринятой методике, которая включала действие колхицина, гипотонизацию, фиксацию и приготовление препаратов. Анализ метафазных хромосом проводили с применением G-методики дифференциальной окраски. Проводили анализ не менее 20 метафазных пластинок. При анализе и описании кариотипа руководствовались критериями *International System for Human Cytogenetic Nomenclature* — ISCN, 2009. В части случаев дополнительно применен метод FISH с соответствующими метками.

**Результаты.** Цитогенетические аномалии различного характера наблюдали у 14 (74 %) из 19 обследованных пациентов. В образцах, полученных от 5 (26 %) больных, обнаружен нормальный кариотип. Полученные результаты анализа кариотипа позволили распределить пациентов с ОЛЛ на три группы риска. Первая группа включала 8 пациентов с неблагоприятными цитогенетическими маркерами, а именно 2 случая с комплексным кариотипом ( $\geq 3$  аномалий), 2 случая с  $t(4;11)(q21;q23)$  и 4 случая с  $t(9;22)(q34;q11)$ . У 3 из 4 больных с  $t(9;22)(q34;q11)$  наличие этой перестройки было подтверждено методом FISH с меткой BCR/ABL DC DF. Вторая группа — 9 пациентов, у которых не было обнаружено значимых цитогенетических маркеров. Это группа с промежуточным или неопределенным прогнозом. В ее состав вошли 4 больных ОЛЛ с редкими ( $i(7)(q10)$ ,  $t(8;14)(q24;q11)$ ,  $t(8;14)(q24;q32)$ ) или нетипичными хромосомными абберациями ( $ins(1;10)(q22;q23q26)$ ) и с нормальным кариотипом (5 случаев). В третью группу вошли 2 пациента с благоприятными цитогенетическими маркерами (гиперплоидный кариотип).

Распределение больных на группы риска позволило подобрать оптимальную тактику их лечения, а именно: интенсивность проводимой терапии, необходимость, назначения ингибиторов тирозинкиназы при ОЛЛ с  $t(9;22)$ , необходимость проведения трансплантации костного мозга при ОЛЛ с  $t(4;11)$  и  $t(9;22)$ . Ингибиторы тирозинкиназы были добавлены к высокодозной полихимиотерапии у 2 из 4 обследованных больных Ph-позитивным ОЛЛ, что в одном случае позволило улучшить результаты лечения — достичь полной ремиссии с общей выживаемостью в течение 24 месяцев. У больной с  $t(4;11)$  проведена трансплантация костного мозга, что позволило быстро достичь ремиссии с длительным периодом безрецидивного выживания (28 мес.).

**Выводы.** Цитогенетические аномалии различного характера обнаружены у 14 (74 %) из 19 больных ОЛЛ, что совпадает с данными литературы. На основании анализа кариотипа больные классифицированы на группы риска: группа больных с неблагоприятными цитогенетически-



ми маркерами, группа промежуточного риска без значимых маркеров прогноза и группа с благоприятными факторами прогноза, что позволило подобрать оптимальную тактику их лечения.

Таким образом, хромосомные перестройки служат не только одним из главных факторов прогноза течения болезни, но являются основой для выбора более эффективных схем лечения ОЛЛ.

Казакова А. Н.<sup>1</sup>, Матвеева Е. А.<sup>1</sup>, Тимофеева Н. М.<sup>1</sup>, Чекуменева Ю. Ю.<sup>1</sup>, Лагойко С. Н.<sup>1</sup>, Румянцев Ю. В.<sup>1</sup>, Байдун Л. В.<sup>2</sup>, Цаур Г. А.<sup>3</sup>, Наседкина Т. В.<sup>4</sup>, Быданов О. И.<sup>5</sup>, Алейникова О. В.<sup>5</sup>, Ольшанская Ю. В.<sup>1</sup>, Карачунский А. И.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва.

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российская детская клиническая больница» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва.

<sup>3</sup> Центр детской гематологии и онкологии, Областная детская клиническая больница № 1», Екатеринбург.

<sup>4</sup> Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН, Москва.

<sup>5</sup> Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии, Минск, Беларусь.

### В-ОСТРЫЙ ЛИМФОБЛАСТНЫЙ ЛЕЙКОЗ С $t(12;21)$ . МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ. РЕЗУЛЬТАТЫ ТЕРАПИИ ПО ПРОТОКОЛУ МВ-2008

В-клеточный острый лимфобластный лейкоз (В-ОЛЛ) с  $t(12;21)(p13;q22)$  и образованием химерного гена ETV6/RUNX1 встречается в 25% случаев всех В-ОЛЛ у детей и имеет благоприятный прогноз.

**Целью нашего исследования** было определение частоты встречаемости, основных клинических характеристик, прогностического значения данной генетической группы в рамках протокола МВ-2008.

С сентября 2009 г. по сентябрь 2012 г. было проанализировано 1707 образцов костного мозга пациентов с первичным В-ОЛЛ методом флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH), ПЦР и биологических микрочипов. Пациенты получали терапию согласно протоколу МВ-2008, с режимом длительного применения L-аспаргиназы, пролонгированной интратекальной терапией тремя препаратами и заменой дексаметазона на преднизолон.

$t(12;21)$  выявлена у 282 пациентов (16,5%). Частота  $t(12;21)$  среди пациентов, тестируемых методом FISH, составила 25% (92 из 362 пациентов). Дополнительные генетические аномалии при этом были выявлены в 80% случаев: делеция гена ETV6, не вовлеченного в транслокацию — 67%, дополнительная копия 21 хромосомы — 24%, дополнительная копия химерного гена — 23%.

На момент постановки диагноза медиана возраста составила 4,3 года, соотношение м/д — 1.2/1; медиана количества лейкоцитов —  $9.8 \times 10^9/L$ , поражение центральной нервной системы было у 2 пациентов. Во всех случаях иммунофенотип был представлен В-клеточным вариантом с частой экспрессией миелоидных маркеров CD13 и/или CD33.

К группе стандартного риска были отнесены 182 пациента (64,6%), промежуточного риска — 96 (34%), высокого риска — 4 (1,4%). 10 пациентов (3,6%) умерли в состоянии ремиссии от инфекционных осложнений, рецидив возник у 3 пациентов (1,1%), 5-летняя бессобытийная и общая выживаемость составили  $92\% \pm 3\%$  и  $95\% \pm 3\%$  соответственно. Кумулятивный риск развития рецидива составил  $3,36\% \pm 0,13\%$ .

**Таким образом**, несмотря на то, что большинство пациентов с  $t(12;21)$  не получали более интенсивные режимы химиотерапии, данная группа характеризуется высокими показателями выживаемости. Основной проблемой в настоящий момент является высокий уровень летальности от инфекционных осложнений в ремиссии заболевания, по-видимому, требующий оптимизации стандартов сопроводительной терапии.

Каримов Х. Я., Алланазарова Б. Р., Плаксина Е. А., Ибрагимов З. З.,  
Шамсутдинова Д. Б., Резванов А. С., Бобоев К. Т.

Научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Министерства Здравоохранения Республики Узбекистан, г. Ташкент.

### ЗНАЧЕНИЕ МУТАЦИИ ГЕНА *JAK2V617F* ПРИ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКЕ Ph(-) ОТРИЦАТЕЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИХ МИЕЛОПРОЛИФЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Хронические миелопролиферативные заболевания (ХМПЗ) — это группа, включающая несколько клональных Ph-негативных гематологических болезней. К самым частым миелопролиферативным заболеваниям относятся эритремия, хронический мегакариоцитарный лейкоз и сублейкемический миелоз.

Несмотря на сохраняющиеся сложности в диагностике ХМПЗ, исследование на наличие мутации V617F гена *Jak2* — необходимое условие для установления правильного диагноза. Данная мутация является соматической и происходит в гемопоэтических клетках-предшественницах. В связи с этим присутствие мутации *Jak2 V617F* теперь рассматривается как главный критерий для верификации ХМПЗ.

**Цель работы.** Изучить мутацию гена *JAK2V617F* при различных клинических вариантах Ph(-) отрицательных ХМПЗ и определить её значимость при верификации данных заболеваний.

Для выявления частоты встречаемости мутации V617F в гене *JAK2* был использован высокоспецифичный метод полимеразной цепной реакции (ПЦР). Исследования проведены у

63 больных с диагнозом эритремия, эссенциальная тромбоцитопения, сублейкемический миелоз, а также у 14 больных Ph(+) хроническим миелолейкозом и 16 здоровых доноров.

Анализ частоты встречаемости мутации V617F в гене *JAK2* показал, что в группе из шестнадцати здоровых доноров данная мутация не была выявлена. В группе больных с положительным BCR-ABL хроническим миелолейкозом мутация V617F в гене *JAK2* также не была выявлена ни у одного из пациентов (14 обследованных). При эритремии мутантный ген обнаруживался у 74,1% (23/31), при эссенциальной тромбоцитопении — у 50,0% (5/10), при сублейкемическом миелозе — у 27,3% (6/22) пациентов. У трех пациентов с эритремией эта мутация в клетках-предшественницах гемопоэза представлена в гомозиготной форме. Известно, что наличие гомозиготной формы данной мутации происходит за счет митотической рекомбинации и дупликации мутантного аллеля.

**Таким образом,** наши предварительные данные также подтверждают необходимость использования анализа на наличие мутации *JAK2V617F* у больных Ph(-) ХМПЗ при верификации диагноза заболевания.

Каримов Х. Я., Содикова Ш. Э., Шамсутдинова Д. Б., Бобоев К. Т.

Научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Министерства Здравоохранения Республики Узбекистан, г. Ташкент.

### АНАЛИЗ ПОЛИМОРФИЗМА 4G/5G ГЕНА *PAI-1* У ОНКОГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ С РАЗЛИЧНЫМИ ТРОМБОЭМБОЛИЧЕСКИМИ ОСЛОЖНЕНИЯМИ

Белок активатора плазминогена I типа (PAI-1) регулирует тканевые/урокиназные активаторы плазминогена и является одним из важнейших генов плазменного звена гемостаза.

К настоящему времени описан ряд полиморфных маркеров гена *PAI-1*, ассоциированных с гиперкоагуляционным состоянием организма. Наиболее часто в исследованиях встречается мононуклеотидный полиморфизм типа делеция/вставка, расположенный в промоторной области

в положении -675 (4G(-675)5G). У носителей аллеля 4G, как в гетеро-, так и в гомозиготном состоянии отмечается и более высокий уровень PAI-1 в плазме и больший риск развития тромбоэмболических осложнений.

**Целью нашего исследования** была оценка возможной связи полиморфных аллелей 4G(-675)5G гена *PAI-1* с различными тромбоэмболическими осложнениями у онкогематологических больных.

*Материалами для исследования* явились образцы ДНК 84 больных с гемобластозами (ХМЛ, ОЛЛ, эритремия), имевших в анамнезе различные тромбоэмболические осложнения и наблюдавшихся в клинических отделениях НИИ гематологии и переливания крови МЗ РУз. Для контрольной группы приглашены 48 добровольцев (условно здоровые доноры) без каких-либо признаков тромбоза.

Образцы геномной ДНК выделяли из лейкоцитарной фракции в соответствии со стандартной методикой. Тестирование полиморфизма 4G/5G гена PA1-1 проводили методом стандартной ПЦР при помощи программируемого термоциклера фирмы Applied Biosystems-2720 (США). Визуализацию фрагментов ДНК проводили в проходящем ультрафиолетовом свете после окрашивания геля бромистым этидием. Статистический анализ результатов проведен с использованием пакета статистических программ «OpenEpi 2009, Version 2.3».

Распределение частот генотипов в исследованных группах соответствовало равновесию Харди-Вайнберга. В группе больных суммарная частота мутантных генотипов данного полиморфизма составила 53.6% (45/84), а в контрольной группе — 30.0% (16/48). Согласно рассчитанному коэффициенту соотношения шансов,

увеличение частоты аллеля 4G гена PA1-1 достоверно увеличивало риск развития тромбоза более чем в 2.3 раза ( $X^2=7.4$ ;  $P=0.006$ ;  $OR=2.3$ ; 95% CI 1.257–4.295), что подтверждает версию о вовлеченности данного маркера в развитие тромботических осложнений.

Среди обследованных больных с венозными тромбозами статистически значимым оказалось преобладание носителей генотипа 4G/4G. При этом, в основной группе у 13.1% пациентов (11/84) был обнаружен гомозиготный генотип данного полиморфизма, тогда как в контрольной группе данный генотип был обнаружен лишь у 2.1% доноров (1/47). При наличии у пациентов данного варианта генотипа шанс развития болезни более чем в 8.5 раз достоверно выше, чем у пациентов без него ( $X^2=4.5$ ;  $P=0.03$ ;  $OR=7.1$ ; 95% CI 0.8852–56.66). В группе больных в 1.5 раза чаще, чем в контрольной группе, встречались носители и гетерозиготного генотипа 4G/5G гена PA1-1. Однако, такие различия были статистически недостоверными ( $X^2=1.5$ ;  $P=0.1$ ;  $OR=1.5$ ; 95% CI 0.7068–3.167). Вероятнее всего это связано с небольшим количеством обследованных больных.

*Таким образом*, в проведенном нами исследовании подтверждена ассоциативная связь аллеля 4G гена PA1-1 в генотипе больных гемобластозами с дисфункцией плазменного звена гемостаза.

*Каримов Х. Я., Шамсутдинова Д. Б., Бобоев К. Т.*

*Научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Министерства Здравоохранения Республики Узбекистан, г. Ташкент.*

### **ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ МУТАЦИИ JAK2 V617F И ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ ТРОМБОФИЛИИ В РАЗВИТИИ ТРОМБОЭМБОЛИЧЕСКИХ ОСЛОЖНЕНИЙ У БОЛЬНЫХ С МЕЛОПРОЛИФЕРАТИВНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ**

Одними из главных осложнений миелопролиферативных заболеваний (МПЗ), является развитие гиперкоагуляционного (тромбофилического) состояния в виде венозных тромбозов. Причины развития тромбофилического состояния связаны с наличием мутации V617F в гене JAK2, хотя также известно, что подобными причинами могут быть и полиморфные варианты генов МТГФР (С677Т), протромбина II (G20210A), V (Leiden) и PAI-I (4G/5G).

*Целью данной работы* явилось изучение взаимосвязи между мутацией гена JAK2(V617F) и полиморфными вариантами генов МТГФР (С677Т), FII (G20210A), V (Leiden) и PAI-I (4G/5G) с венозными тромбозами у больных МПЗ.

*Материалами для наших исследований* явились образцы ДНК 55 больных МПЗ (эритремия, эссенциальная тромбоцитемия и сублейкемический миелоз) с тромбоэмболическими осложнениями (тромбоз глубоких вен нижней конечности, тромбоз воротной вены и т.д.) с наличием или отсутствием мутации гена JAK2(V617F). Контрольную группу составил 71 здоровый донор, без каких-либо тромбоз-ассоциированных заболеваний. Статистический анализ результатов проведен с использованием пакета статистических программ «OpenEpi 2009, Version 2.3».

*В результате исследования* у 13 (23.6%) больных была обнаружена мутация в гене JAK2 V617F, тогда как у 42 (76.4%) данная мутация

отсутствовала. Среди больных с наличием мутации JAK2 V617F у 12 были обнаружены тромбофилические маркеры — FV-Leiden (7.7%), МТГФР (38.5%) и PAI-I (46.1%). Здесь необходимо подчеркнуть, что у некоторых больных были обнаружены случаи одновременного носительства двух или более вышеуказанных мутаций. Полиморфный маркер FII (G20210A) в данной группе больных не выявлен. У 42 больных с отсутствием мутации JAK2 V617F частоты тромбофилических генов оказались следующими: FII (2.4%), FV-Leiden (2.4%), МТГФР (28.5%) и PAI-I (45.2%). В данной группе больных также было обнаружено одновременное носительство вариантов функционально ослабленных вышеуказанных мутантных аллелей. Сравнительный анализ частот вышеуказанных мутаций в исследованных двух группах как по отдельности, так и в сочетаниях не выявил

статистически достоверных различий ( $X^2=1.2$ ;  $P=0.2$ ).

В обследованной группе здоровых доноров мутация JAK2 V617F, как и ожидалось, выявлена не была. Суммарная частота тромбофилических маркеров в этой группе оказалась статистически достоверно низкой в сравнении с группой больных ( $X^2=14.4$ ;  $P=0.0002$ ;  $OR=4.6$ ; 95% CI 2.022-10.6).

Таким образом, эти данные могут свидетельствовать о высокой роли носительства генетических маркеров тромбофилии и мутации JAK2 V617F как по отдельности, так и в сочетаниях, в развитии тромбоэмболических осложнений различной локализации у больных МПЗ, что диктует необходимость подбора оптимальной и безопасной схемы терапии больных, направленной на компенсацию тромбофилических осложнений.

*Каримов Х. Я., Алланазарова Б. Р., Ассесорова Ю. Ю., Бобоев К. Т.*

*Научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Министерства Здравоохранения Республики Узбекистан, г. Ташкент.*

## РОЛЬ СТАНДАРТНОГО ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ В ВЫЯВЛЕНИИ НАРУШЕНИЙ КАРИОТИПА ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ МИЕЛОЛЕЙКОЗЕ

Хронический миелолейкоз (ХМЛ) — самое распространенное из миелопролиферативных заболеваний. Известно, что развитие всех патологических проявлений ХМЛ обусловлено возникновением химерного гена BCR-ABL, локализованного на генетически измененной 22-й, (Ph-хромосомы). Выявление данной маркерной хромосомной перестройки — первичного и главного цитогенетического признака ХМЛ — является важным фактором диагностики и прогноза. Стандартное цитогенетическое исследование (СЦИ) позволяет обнаружить классическую Ph-хромосому в 90–95% клинически диагностированных случаев ХМЛ.

Методом СЦИ было проведено цитогенетическое исследование периферической крови и костного мозга 24 больных ХМЛ. Известно, что G-метод дифференциальной окраски в ряде случаев не позволяет выявить Ph-хромосому вследствие недостаточного количества и качества метафазных пластин, небольшого количества Ph-положительных клеток в дебюте заболевания, а также случаев Ph-негативного, но BCR-ABL-позитивного ХМЛ.

В нашем исследовании из 24-х больных ХМЛ у 20 (83,3%) были получены метафазные пла-

стинки, пригодные для цитогенетического анализа. Классическая Ph-хромосома была выявлена у 11 больных (55%); из них 72,7% больных находились в хронической стадии заболевания, 18,2% — в стадии акселерации и 9,1% — в стадии бластного криза. При этом филадельфийская хромосома была обнаружена в 72,7% случаев у мужчин и 27,3% — у женщин, хотя достоверная разница в частоте её выявления по половому признаку не описана в мировой литературе.

В последнее время всё большее значение придается изучению дополнительных хромосомных аномалий при ХМЛ, так называемой клональной эволюции, поскольку некоторые из них непосредственно влияют на характер течения заболевания и важны для оценки эффективности терапии и прогноза. При прогрессировании заболевания нередко обнаруживаются дополнительные Ph-хромосомы. Из 20 больных ХМЛ дополнительная Ph-хромосома была выявлена нами у одного больного (5%) в стадии бластного криза. У двух больных (10%) была обнаружена трисомия по 21-й паре хромосом (в том числе у одного из них — в стадии бластного криза) и у одного больного —

дополнительная 8-я хромосома. Кроме того, у трех пациентов — в стадии акселерации (10%) и в стадии бластного криза (5%) — нами была зарегистрирована гипоплоидия, а у 5 больных (25%) — гипердиплоидия. Причем среди последних у троих пациентов заболевание находилось в хронической стадии, у одного — в стадии акселерации и у одного — в стадии бластного криза. Трисомия по 21-й хромосоме, гипоплоидия и гипердиплоидия сочетались с наличием Ph-хромосомы.

Таким образом, несмотря на то, что использование обычного G-дифференциального окрашивания не позволяет выявить Ph-хромосому в абсолютном большинстве исследований, СЦИ позволяет проанализировать весь кариотип и обнаружить дополнительные нарушения, имеющие самостоятельное значение для оценки течения ХМЛ и прогноза. У пациентов с Ph-положительным ХМЛ присутствие дополнительных хромосомных и геномных нарушений значительно чаще наблюдается в стадии акселерации и бластного криза.

*Каримов Х. Я., Казакбаева Х. М., Бобоев К. Т.*

*Научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Министерства Здравоохранения Республики Узбекистан, г. Ташкент.*

### НОВЫЙ МЕТОД ДЕТЕКЦИИ И МОНИТОРИНГА ЛЕЧЕНИЯ МИНИМАЛЬНОЙ РЕЗИДУАЛЬНОЙ БОЛЕЗНИ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ МИЕЛОЛЕЙКОЗЕ

Молекулярный мониторинг экспрессии *BCR-ABL* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени является в настоящее время обязательным методом контроля лечения хронического миелолейкоза (ХМЛ) у пациентов, проходящих терапию ингибиторами тирозинкиназ. Достижение большого молекулярного ответа признано показателем оптимальной терапии и важным прогностическим фактором безрецидивной выживаемости больных ХМЛ.

Несмотря на высокую эффективность современного таргетного лечения препаратом «Гливек», планомерный молекулярный мониторинг минимальной остаточной болезни и своевременное терапевтическое воздействие в период молекулярного рецидива позволит в гораздо большей степени улучшить общие результаты терапии ХМЛ.

**Цель работы.** Изучить информативность нового экспресс метода исследований экспрессии химерного транскрипта *BCR-ABL* на различных этапах терапии ХМЛ для определения уровня минимальной остаточной болезни у больных с полной клинико-гематологической ремиссией.

**Материалом для нашей работы** явились 75 больные с клинически установленным диагнозом ХМЛ, наблюдавшихся в гематологическом отделении НИИ гематологии и переливания крови МЗ РУз.

Диагноз ХМЛ устанавливали на основании данных клинико-лабораторных (морфологического и цитохимического) и молекулярно-биологических методов (стандартного цитогенетиче-

ского и ОТ-ПЦР) исследования крови и костного мозга (всего 75-больных).

Новый экспресс-метод ПЦР в реальном времени проводили на оригинальном приборе закрытого типа «GeneXpert» (Cepheid, США), стандартизованном по международной шкале в референс лаборатории Гематологического Центра г. Сиэтла (США). Преимуществами данного метода заключается в том, что, для исследования не требуется мануальной экстракции нуклеиновых кислот — аппарат автоматически выполняет этот процесс. Проба подготовка, ПЦР-анализ и интерпретация полученных результатов занимает не более двух часов рабочего времени.

Особенностью всех включенных в исследование пациентов было достижение ими полной клинико-гематологической ремиссии на фоне проводимой таргетной терапии ингибитором тирозинкиназ (Гливек). Из обследованных больных у 13,3% (10/75) больных выявлен низкий уровень критической значимости, т.е. установлено отсутствие экспрессии (<0.01%) гена *BCR-ABL* (полный молекулярный ответ на терапию Гливек). У 33.3% (25/75) больных уровень экспрессии онкогена составил от 0.01% до 0.05% (слабоположительный ответ — наличие остаточного опухолевого клона клеток). В остальных 53.3% (40/75) случаях уровень экспрессии гена *BCR-ABL* составил более чем 0.05%, что свидетельствует о выраженной экспрессии данного гена в этой группе больных, несмотря на получение ими препарата Гливек.

Для сравнения использованного нами метода молекулярной диагностики было проведено сопоставление значений экспрессии *BCR-ABL*, полученных методом ПЦР в реальном времени на амплификаторе Rotor-Gene 6000 («Corbett Reseach», Австралия, тест-система компании «Интерлабсервис»). Сопоставление данных осуществлялось одновременно на 30-ти пациентах этой же группы больных ХМЛ. Было достоверно подтверждено наличие положительной корреляции между уровнем экспрессии химерного

транскрипта *BCR-ABL* между использованными методик ( $p < 0,05$ ).

*Таким образом*, полученные значения чувствительности использованного нами метода удовлетворяют требованиям, предъявляемым международными исследовательскими группами для количественного определения экспрессии гена *BCR-ABL*. Этот метод позволяет количественно оценивать уровень экспрессии гена *BCR-ABL*, что дает возможность правильно судить об эффективности выбранной тактики терапии ингибитором тирозинкиназы — Гливеком.

*Каримов Х. Я., Бобоев К. Т.*

*Научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Министерства Здравоохранения Республики Узбекистан, г. Ташкент.*

### **ВНЕДРЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДЫ В ДИАГНОСТИКЕ ЗАБОЛЕВАНИЙ СИСТЕМЫ КРОВИ В УЗБЕКИСТАНЕ**

Молекулярно-биологические исследования гематологических патологий в Узбекистане проводятся в основном в отделе молекулярной медицины и клеточной технологии НИИГ и ПК МЗ РУз, и пока касаются лишь наиболее частых и социально значимых заболеваний, и число таких исследований увеличивается. Необходимо отметить, что лаборатория располагает серьезной материально-технической базой, укомплектованной всем необходимым ультрасовременным импортным оборудованием, отвечающим международным стандартам.

К настоящему времени в лаборатории проводится работа по разработке эффективных способов раннего прогнозирования развития наследственной тромбофилии и идеопатической тромбоцитопенической пурпуры. Впервые в узбекской популяции изучены частоты и вклад полиморфизмов генов факторов дисфункции плазменного и тромбоцитарного звеньев гемостаза -FII, FV (Лейден), MTGFR, MTRR, MTR, PAII, ApoE, GP и eNOS в развитие наследственной тромбофилии, а также цитокинов — TNF- $\alpha$ , CTLA4, RANTES, GSTT1, GSTM1, IL-4 и рецептора IL-4 в развитие аутоиммунных состояний. В результате этих исследований разработаны эффективные критерии прогнозирования развития и течения данных патологий.

С целью усовершенствования методов обследования больных гемобластозами оптимизированы методы культивирования и цитогенетического исследования клеток костного мозга и периферической крови. Разработаны новые способы

диагностики и контроля эффективности лечения хронического миелолейкоза и острого лимфобластного лейкоза, путем оптимизации и внедрения высокочувствительных молекулярно-биологических методов детекции и оценки экспрессии химерного онкогена *BCR/ABL* (маркеры p190 и p210) методами ОТ-ПЦР и ПЦР в режиме реального времени. Следует отметить, что некоторые результаты этих исследований уже внедрены в клиническую практику института.

Проводятся работы по совершенствованию методов диагностики, верификации форм и мониторинга эффективности терапии больных с хроническими миелопролиферативными заболеваниями (ХМПЗ). К настоящему времени в клиническую практику внедрено молекулярное тестирование генной мутации V617F-JAK2 у больных с ХМПЗ. Разрабатывается методологический подход к выявлению ключевых генов, контролирующих синтез и работу ферментов метаболизма лекарственных средств и канцерогенов, в частности изоферментов цитохрома P-450 и ферментов II фазы биотрансформации (глутатион SH-S-трансферазы). На основе этих данных будут разработаны эффективные критерии раннего прогнозирования развития резистентных опухолевых субклонов к полихимиотерапии и монотерапии у больных с гемобластомами. Результаты фармакогенетического тестирования позволяют клиницисту провести персонализированный подбор лекарственного средства и режима его дозирования, обеспечивая тем самым максимальную эффективность и безопасность терапии.

В целом, проблема внедрения молекулярно-биологических методов обследования генных и хромосомных заболеваний системы крови в лаборатории, по сути, принципиально решена. Дальнейший прогресс этих исследований будет

достигнут на пути широкого привлечения методов молекулярной цитогенетики (FISH-анализ) и секвенирования генных последовательностей, которые позволят более детально анализировать структурные изменения генома человека.

*Князева А. С., Страмбовская Н. Н.*

*Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования Читинская государственная медицинская академия Министерства здравоохранения России, г. Чита.*

**ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА ЦИТОКИНА TNF (G-308A)  
У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКОЙ ИШЕМИЕЙ МОЗГА В ЗАБАЙКАЛЬСКОМ КРАЕ**

Сосудистые заболевания головного мозга находятся на втором месте среди причин общей смертности, поэтому изучение патогенетических механизмов, обеспеченных системами иммунитета, гемостаза и неспецифической резистентности организма, составляющими единую интегрированную клеточно-гуморальную систему защиты особенно актуально. Одним из связующих звеньев в этой системе являются цитокины, гены которых обладают чрезвычайно высокой степенью полиморфизма и изменяют функцию белка.

**Цель работы.** Изучить частоту генетического полиморфизма провоспалительного цитокина TNF (G-308A) у больных хронической недостаточностью мозгового кровообращения с синдромом когнитивной дисфункции и без него.

**Материалы и методы.** Цельная кровь, взятая на цитрате натрия в соотношении 1:9, сыворотка крови 195 больных хронической цереброваскулярной патологией с синдромом когнитивной дисфункции (ХИГМ с Д)(62,5±4,95 лет), находящимся на стационарном лечении в ЛПУ г. Читы, 149 здоровых резидентов соответствующего возраста (51±4,24), не имеющих объективных признаков цереброваскулярной патологии, 99 больных хронической цереброваскулярной патологии

без синдрома когнитивной дисфункции (ХИГМ без Д)(53,3±4,52). В качестве критериев включения для ХИГМ с Д использовались оценочные баллы: MMSE — 19,95±1,31; Хачински — 6,47±0,97; Гамильтон — 7,3±1,97. В качестве критериев включения для ХИГМ без Д использовались оценочные баллы: MMSE — 30; Хачински — 5,11±0,32; Гамильтон — 7,79±1,5. Генотипирование проводилось на ДНК лейкоцитов венозной крови с помощью полимеразной цепной реакции (тест-система для определения генетического полиморфизма TNF (G-308A) (НПФ «Литех», Москва)) с детекцией продукта амплификации в агарозном геле. Соответствие распределение генотипов TNF (G-308A) оценивалось согласно закону Харди-Вайнберга. Степень риска развития ХИГМ оценивали по величине отношения шансов (odds ratio (OR)) с расчетом для него 95% доверительного интервала (CI).

**Результаты.** В результате исследования обнаружены все искомые аллели в гомо- и гетерозиготном состоянии с частотным подчинением закону Харди-Вайнберга (таблица 1).

Частота генотипов и аллелей полиморфизма TNF (G-308A) у здоровых резидентов, пациентов, страдающих хронической ишемией головного мозга с когнитивным дефектом и без него.

*Таблица 1.*

	<b>Аллель</b>	<b>Частота аллеля, P</b>	<b>Генотип</b>	<b>Частота генотипа, %</b>
Контроль	308G	0,93	308GG	87,92
	308A	0,07	308GA	10,14
			308AA	2,03
ХИГМ с Д	308G	0,89	308GG	81,03
	308A	0,11	308GA	16,41*
			308AA	2,56

Продолжение таблицы

	Аллель	Частота аллеля, P	Генотип	Частота генотипа, %
ХИГМ без Д	308G	0,84	308GG	69,70
	308A	0,16	308GA	28,28**
			308AA	2,02

\* —  $p < 0,05$  при сравнении частоты в группах здоровых исследуемых и больных ХИГМ с когнитивным дефектом; \*\* —  $p < 0,001$  при сравнении частоты в группах здоровых исследуемых и больных ХИГМ без когнитивного дефекта.

Наблюдалось почти 1,6-кратное преобладание носителей гетерозиготного генотипа по изучаемому полиморфизму среди больных ХИГМ с Д (OR = 1,8, 95% CI: 1,24–2,45). Относительный риск развития ХИГМ с Д у носителей TNF308AA в 1,65 раза больше, чем у лиц с генотипом TNF308GG (95% CI: 1,13–2,14). Среди пациентов ХИГМ без Д преобладание носителей гете-

розиготного генотипа по изучаемому полиморфизму по отношению к контрольной группе составила в 2,8 раза (OR = 3,4 95% CI: 1,7–5,1). Относительный риск развития ХИГМ без Д носителей TNF308AA в 2,8 раза больше, чем у лиц с генотипом TNF308GG (95% CI: 1,11–4,49).

**Выводы.** Носительство мутантного аллеля TNF308A преобладает в группе больных ХИГМ что, вероятно, играет роль в повышенной экспрессией фактора некроза опухолей с последующей активацией синтеза провоспалительных цитокинов, расстройством микроциркуляции, приводящей к вторичной ишемии головного мозга.

Князева А. С., Страмбовская Н. Н.

Государственное бюджетное образовательное учреждение Высшего Профессионального Образования Читинская государственная медицинская академия Министерства здравоохранения России, г. Чита.

### ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА ЦИТОКИНА IL-1 $\beta$ (T-31C) У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКОЙ ИШЕМИЕЙ МОЗГА В ЗАБАЙКАЛЬСКОМ КРАЕ

Смертность от сосудистых заболеваний головного мозга занимает второе место среди всех причин болезней системы кровообращения и первое место в качестве причины инвалидизации населения РФ. В последние годы обращает внимание роль латентного воспаления при развитии атеросклероза в сосудах, поэтому все большее исследователей изучают патогенетическую роль медиаторов межклеточных коммуникаций — цитокинов, участвующих в развитии реакций ишемического каскада, в том числе при хронической ишемии мозга.

**Цель работы.** Изучить частоту генетического полиморфизма провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$  (T-31C) у больных хронической недостаточностью мозгового кровообращения с синдромом когнитивной дисфункции и без него.

**Материалы и методы.** Цельная кровь, взятая на цитрате натрия в соотношении 1:9, сыворотка крови 195 больных хронической цереброваскулярной патологией с синдромом когнитивной дисфункции (ХИГМ с Д) (62,5 ± 4,95 лет), 149 здоровых резидентов соответствующего возраста (51 ± 4,24), не имеющих объективных признаков цереброваскулярной патологии, 99 больных хронической цереброваскулярной патологией без синдрома ког-

нитивной дисфункции (ХИГМ без Д) (53,3 ± 4,52). В качестве критериев включения для ХИГМ с Д использовались оценочные баллы: MMSE — 19,95 ± 1,31; Хачински — 6,47 ± 0,97; Гамильтон — 7,3 ± 1,97. В качестве критериев включения для ХИГМ без Д использовались оценочные баллы: MMSE — 30; Хачински — 5,11 ± 0,32; Гамильтон — 7,79 ± 1,5. Генотипирование проводилось на ДНК лейкоцитов венозной крови с помощью полимеразной цепной реакции (тест-система для определения генетического полиморфизма IL-1 $\beta$  (T-31C) (НПФ «Литех», Москва)) с детекцией продукта амплификации в агарозном геле. Соответствие распределение генотипов IL-1 $\beta$  (T-31C) оценивалось согласно закону Харди-Вайнберга. Степень риска развития ХИГМ оценивали по величине отношения шансов (odds ratio (OR)) с расчетом для него 95% доверительного интервала (CI).

**Результаты.** В результате исследования обнаружены все искомые аллели в гомо- и гетерозиготном состоянии с частотным подчинением закону Харди-Вайнберга (таблица 1).

Частота генотипов и аллелей полиморфизма IL-1 $\beta$  (T-31C) у здоровых резидентов, пациентов, страдающих хронической ишемией головного мозга с когнитивным дефектом и без него.



	Аллель	Частота аллеля, Р	Генотип	Частота генотипа, %
Здоровые резиденты	31Т	0,76	31ТТ	60,40
	31С	0,24	31ТС	30,87
			31СС	8,72
ХИГМ с Д	31Т	0,66	31ТТ	50,26
	31С	0,34	31ТС	31,79
			31СС	17,95**
ХИГМ без Д	31Т	0,57	31ТТ	28,28
	31С	0,43	31ТС	57,58*
			31СС	14,14**

\* —  $p < 0,05$  при сравнении частоты в группах здоровых исследуемых и больных ХИГМ без когнитивного дефекта; \*\* —  $p < 0,001$  при сравнении частоты в группах здоровых исследуемых и больных ХИГМ и без него.

При сравнении наблюдалось почти 2-х кратное преобладание носителей гомозиготного генотипа по изучаемому полиморфизму среди больных ХИГМ (OR=1,8, 95% CI: 1,42–2,19). Относительный риск развития хронической ишемии мозга у носителей IL-1b-31CC в 1,7 раза больше, чем у лиц с генотипом IL-1b-31TT (95% CI: 1,13–2,14). Среди пациентов ХИГМ без когнитивного дефекта преобладание носителей гетерозиготного генотипа по изучаемому

полиморфизму по отношению к контрольной группе составила в 1,86 раза и 1,6 раза преобладание носителей гомозиготного генотипа по сравнению к контрольной группе (OR=2,5 95% CI: 1,6–3,94). Относительный риск развития хронической ишемии головного мозга без когнитивного дефекта у носителей IL-1b-31CC в 2 раза больше, чем у лиц с генотипом IL-1b-31TT (95% CI: 1,43–2,78).

**Выводы.** Носительство мутантного аллеля IL-1b-31C преобладает в группе больных ХИГМ что, вероятно, играет роль в развитии воспалительного процесса в сосудистой стенке, приводящей к хронической ишемии головного мозга.

*Козловская М. А., Мартынкевич И. С., Петрова Е. В., Мартыненко Л. С., Цыбакова Н. Ю., Иванова М. П., Шуваев В. А., Шабанова Е. С., Абдулкадыров К. М.*

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

### ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА Rh-ОТРИЦАТЕЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИХ МИЕЛОПРОЛИФЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ (ХМПЗ)

Молекулярные события, лежащие в основе патогенеза ХМПЗ, связаны с дефектами генов, кодирующих белки, которые обеспечивают нормальное поддержание миелопоэза. По литературным данным частота встречаемости диагностически значимых при ХМПЗ мутаций (V617F гена *JAK2*, в 12 экзоне гена *JAK2*, гена *MPL*) варьирует при различных нозологиях. Вместе с этим ряд исследователей пытаются объяснить клональный гемопоэз при Rh-отрицательных ХМПЗ, основываясь на результатах цитогенетических исследований клеток костного мозга.

**Целью нашего исследования** было определение частоты встречаемости мутаций генов *JAK2* и *MPL* и выявление прогностических особенностей течения заболевания в зависимости от

характера цитогенетических aberrаций у пациентов с Rh-отрицательными ХМПЗ. В исследование были включены 619 пациентов — с истинной полицитемией (ИП) 249 больных, с эссенциальной тромбоцитемией (ЭТ) — 120, с хроническим идиопатическим миелофиброзом (ХИМФ) — 110 и 140 пациентов обследовались с целью дифференциальной диагностики с Rh(-) ХМПЗ. Возраст больных варьировал от 18 до 80 лет, медиана при этом составила 52 года. Пик заболеваемости приходится на возраст от 50 до 60 лет, в этой возрастной категории было 88 пациентов. Для детекции V617F мутации гена *JAK2* использовался метод аллель-специфической ПЦР, мутации 12 экзона гена *JAK2* определялись методом сиквенирования, мутации в гене *MPL* определя-

лись методом Real-time PCR в двух повторностях. В результате проведенных исследований было выявлено, что частота встречаемости мутации V617F в гене *JAK2* варьировала у пациентов в зависимости от варианта заболевания. Так при ИП мутация V617F в гене *JAK2* определялась у 245 из 249 (98,3%) исследуемых больных, при ЭТ — у 65 из 120 (54,2%) пациентов, при ХИМФ — у 54 из 110 (49,1%) проанализированных больных. У 140 больных не гематологического профиля, обследованных с целью дифференциальной диагностики с Ph(-) ХМПЗ, V617F в гене *JAK2* обнаружена у 12 (8,6%), что позволило достоверно подтвердить Ph(-) ХМПЗ. Мутация в 12 экзоне гена *JAK2* выявлялась у 2 из 69 (2,9%) исследуемых V617F/*JAK2*-отрицательных больных исключительно с диагнозом ИП. В то время как мутация W515L гена *MPL* обнаруживалась при ЭТ и ХИМФ в 2,2% (у 1 из 46) и 2% (1 из 51) больных, соответственно. Цитогенетические исследования клеток костного мозга у 129 больных ХМПЗ позволили стратифицировать больных по прогностическим группам. Так нормальный кариотип обнаружен у 110 (85,3%) из 129 исследу-

емых. Среди 19 (14,7%) пациентов с патологическим кариотипом, у 5 (3,9%) из 129 выявлены изолированные хромосомные aberrации (del(20q), del(13q)), обуславливающие благоприятное течение заболевания, у 8 (6,2%) пациентов — аномалии кариотипа промежуточного риска, и у 6 (4,7%) из 129 — комплексные нарушения кариотипа, относящиеся к неблагоприятным вариантам кариотипа. Причем хромосомные aberrации благоприятного прогноза достоверно чаще ( $p=,0000$ ) встречались у больных с ИП в сравнении ХИМФ, а частота встречаемости множественных комплексных нарушений кариотипа была достоверно выше у больных с ХИМФ, чем у больных с ИП и ЭТ ( $p=0,0000$ ). Причем 2 из 6 больных с комплексным кариотипом констатирована трансформация заболевания в ОМЛ.

**Таким образом,** установлено, что мутации в генах *JAK2* и *MPL* являются высокоспецифичными диагностическими маркерами пациентов с Ph-отрицательными ХМПЗ, а включение цитогенетических исследований в алгоритм обследования больных в дебюте заболевания позволяет стратифицировать пациентов на группы риска.

*Колубаева С. Н., Иванов А. М., Сухина И. А., Никитин В. Ю., Исакова Т. В., Дмитриева О. В., Поляков А. С., Бондарчук С. В.*

*Федеральное государственное казенное военно-образовательное учреждение высшего профессионального образования «Военно-медицинская академия имени С. М. Кирова» Министерства обороны Российской Федерации, Санкт-Петербург.*

### **ВОЗМОЖНАЯ КОРРЕЛЯЦИЯ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С МЕТАБОЛИЗМОМ ВАРФАРИНА И ФОЛАТОВ У БОЛЬНЫХ С ХРОНИЧЕСКИМ ЛИМФОЦИТАРНЫМ ЛЕЙКОЗОМ**

В последние годы получены данные в пользу того, что одним из важных факторов развития и прогрессирования злокачественных опухолей, в том числе и хронического лимфоцитарного лейкоза (ХЛЛ), является функционально значимый полиморфизм генов, кодирующих ферменты системы биотрансформации ксенобиотиков. К ним относится около 90% всех лекарственных препаратов. 1-ая фаза биотрансформации (окислительная) обеспечивается, в основном, семейством генов цитохрома P450. Основной функцией 2-й фазы биотрансформации ксенобиотиков является детоксикация за счет действия гидролаз и трансфераз. И, наконец, 3-я фаза биотрансформации связана с выведением из организма лекарственных форм. Кроме генов, отвечающих за экспрессию энзимов с широкой субстратной специфичностью, в организме имеются гены, обеспечивающие функции

энзимов с узкой направленностью действия. К ним относится ген *MTHFR*, который кодирует энзим метилентетрагидрофолат редуктазу, участвующий в метаболизме фолатов и препаратов, близких по структуре к фолиевой кислоте. В настоящей работе были исследованы цитогенетические повреждения методом флуоресцентной *in situ* гибридизации. Для этого метода применяли ДНК-зонды фирмы *ABBOT*, направленные на детекцию характерных для ХЛЛ повреждений: делеция генов *ATM* и *P53*, делеция в q плече хромосомы 13, трисомия по хромосоме 12. Исследование полиморфизма генов производили только в группе больных ХЛЛ с цитогенетическими повреждениями, предсказывающих хороший прогноз течения заболевания: del (13)(q14.3), del (13)(q34), del (13)(q14.3-34).

**Таким образом,** у одних и тех же больных исследовали полиморфизмы генов, ассоцииро-

ванные с метаболизмом варфарина и фолатного цикла (фирма ДНК-технология), амплификацию проводили на приборе ДТ-прайм (ДНК-технология). В варфариновый цикл входит определение вариантов генов CYP2C9: C>T; CYP2C9 A>C; VKORC1: 1639 G>A; CYP4F2 C>T, CYP2C9. В фолатный цикл входит определение вариантов генов MTR:2756 A>G, MTHFR:1298 A>C, MTHFR: 677 C>T, MTRR:66 A>G. При исследовании больных ХЛЛ с более сложными

хромосомными перестройками в кариотипе чаще выявляются аллельные различия по сравнению с контрольным генотипом. Так, например, у больного с клональной транслокацией между 11 и 13 хромосомами, делецией в локусе (13)(q14–34) выявлены аллельные различия от контроля в трех генах, в отличие от тех случаев, когда при одном хромосомном повреждении (например, del(13)(q14.3) аллельные различия выявляются реже и в меньшем количестве генов.

Кузник Б. И.<sup>3</sup>, Хавинсон В. Х.<sup>1,2</sup>, Тарновская С. И.<sup>2</sup>, Линькова Н. С.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН, Санкт-Петербург.

<sup>2</sup> Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии СЗО РАМН.

<sup>3</sup> ГБОУ ВПО «Читинская государственная медицинская академия», г. Чита.

### ЭПИГЕНЕТИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ РЕГУЛЯТОРНЫХ ПЕПТИДОВ НА ЦИТОКИНОВЫЙ ПРОФИЛЬ И СИСТЕМУ ГЕМОСТАЗА

Многочисленные исследования, проведенные нами и нашими сотрудниками (Хавинсон В. Х. и др., 1982–2012; Кузник Б. И. и др., 1982–2012; Патеюк А. В. и др., 1990–2012), показали, что регуляторные пептиды (РП) — тималин, вилон, эпителиамин, эпителиалон, кортексин и др. — при введении больным с различной патологией способствовали ликвидации вторичных иммунодефицитов, восстанавливали баланс в содержании про- и противовоспалительных цитокинов, а также нормализовали состояние системы гемостаза. Приведенные факты свидетельствовали о том, что существуют общие механизмы действия РП на гуморальные защитные системы организма. Одним из таких механизмов могло быть эпигенетическое влияние РП на систему иммунитета и гемостаза.

Для проверки высказанной гипотезы из базы данных GenBank [Benson D.A., Karsch-Mizrahi] нами были взяты нуклеиновые последовательности генов провоспалительных (IL-1a, IL-6, IL-17A, TNF $\alpha$ ), противовоспалительных (IL-4, IL-10) и иммунных (IL-2, IL-5) цитокинов, а также генов тканевого фактора (TF), антитромбина III (AT-III) и протеина С (PC). Изучалось наличие сайтов связывания в промоторных зонах указанных генов с РП, обладающими геропротекторными и иммуномодулирующими свойствами: Lys-Glu (вилон) и Ala-Glu-Asp-Gly (эпителиалон).

Оказалось, что Lys-Glu способен взаимодействовать с генами про- (IL-6, IL-17A и TNF $\alpha$ ) и противовоспалительных цитокинов (IL-4 и IL-10), а также иммунного цитокина IL-5. Ala-Glu-Asp-

Gly, кроме того, может вступать во взаимосвязь с геном IL-1a и IL-2. Последовательности нуклеотидов, вступающих во взаимодействие с Lys-Glu, представлены GCAG и в меньшей мере — CGTC, а для Ala-Glu-Asp-Gly — ATTTTC, TAAAC, ATTTG, CTTTG и TAAAG. Число сайтов связывания для Lys-Glu и Ala-Glu-Asp-Gly в гене IL-6 одинаково; в гене TNF $\alpha$  для Lys-Glu в 2,5 раза, а IL-17A — в 2 раза больше, чем для Ala-Glu-Asp-Gly. Число последовательностей, связывающихся с Ala-Glu-Asp-Gly, в генах IL-4 и IL-10 в 2–3 раза превышает число таковых для Lys-Glu. Наконец, число последовательностей в гене IL-5, способных реагировать с Ala-Glu-Asp-Gly, в 10 раз превышает содержание таковых для Lys-Glu. В промоторной зоне гена IL-2 не содержатся сайты связывания к Lys-Glu, тогда как к Ala-Glu-Asp-Gly их число достигает 16.

Исследуемые нами РП способны взаимодействовать с последовательностями нуклеотидов генов TF, AT-III и PC. Сайтами связывания в гене TF для Lys-Glu являются последовательности GCAG и комплементарная ей CGTC, а для Ala-Glu-Asp-Gly — CAAAG, CTTTA, CAAAT, GTTTC и CTTTA. Сайты связывания в гене AT-III для Ala-Glu-Asp-Gly представлены последовательностями ATTTTC, GTTTC, TAAAG, CTTTA и CTTTG, а для Lys-Glu — лишь GCAG, встречаемый всего один раз. В промоторном участке гена PC сайтами связывания для Ala-Glu-Asp-Gly служат последовательности: ATTTG, CAAAT, ATTTG, а для Lys-Glu — GCAG.

Влияние РП Lys-Glu и Ala-Glu-Asp-Gly на состояние клеточного и гуморального иммунитета проявляется путем непосредственного действия на иммунокомпетентные клетки, а также на выделяемые ими цитокины. Гораздо сложнее механизм действия исследуемых РП на систему гемостаза. В экспериментах на животных, а также в наблюдениях на пациентах с сердечнососудистыми, инфекционными, эндокринными и другими заболеваниями установлено, что Lys-Glu и Ala-Glu-Asp-Gly ликвидируют явление гиперкоагуляции и вторичной гипокоагуляции. Подобный эффект может быть объяснен усилением экспрессии генов — AT-III и PC и супрессией гена TF.

Но дело заключается не только в этом. Известно, что провоспалительные и иммунные

цитокины усиливают экспрессию TF, но приводят к уменьшению экспрессии протеогликанов и тромбомодулина эндотелиальными клетками, тогда как противовоспалительные цитокины — IL-4 и IL-10 обладают прямо противоположным эффектом. Восстановление нормального баланса между концентрацией про- и противовоспалительных цитокинов, наблюдаемое под воздействием Lys-Glu и Ala-Glu-Asp-Gly, является существенным фактором, приводящим к нормализации состояния системы гемостаза при самых различных заболеваниях. Наши данные также свидетельствуют о том, что геропротекторное действие Lys-Glu и Ala-Glu-Asp-Gly в значительной степени зависит от эпигенетического влияния на состояние иммунитета и системы гемостаза.

Лавров А. В.<sup>1</sup>, Смирнихина С. А.<sup>1</sup>, Адильгереева Э. П.<sup>1</sup>,  
Чельшьева Е. Ю.<sup>2</sup>, Шухов О. А.<sup>2</sup>, Туркина А. Г.<sup>2</sup>, Куцев С. И.<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение «Медико-генетический научный центр» Российской академии медицинских наук, Москва.

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение «Гематологический научный центр» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва.

<sup>3</sup> Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва.

\* e-mail: kutsev@mail.ru

## ПОЛНОЭКЗОМНЫЙ АНАЛИЗ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ МИЕЛОИДНОМ ЛЕЙКОЗЕ

Технологии секвенирования следующего поколения (ССП) и ассоциированные с ними методы биоинформационного анализа больших массивов данных нуклеотидных последовательностей ДНК и РНК на сегодняшний момент являются одними из наиболее перспективных и быстроразвивающихся. ССП и биоинформационный анализ позволяет проводить определение последовательности всей ДНК, включая некодирующие области (полногеномное исследование), только кодирующей части ДНК (полноэкзомное исследование) или секвенирование определенного набора генов (таргетное исследование). Исследования геномов и экзотов пациентов с разными формами миелоидных онкогематологических заболеваний позволили выявить несколько рекуррентных мутаций и оптимизировать составление прогноза для таких пациентов. Кроме того, применение ССП и биоинформационного анализа дало почву для понимания патогенеза этих заболеваний и послужило основой для разработки таргетной терапии. Однако ценность и перспективность исследования патогенеза, оценки эффективности терапии и

разработки таргетной терапии миелоидных онкогематологических заболеваний с использованием технологии секвенирования нового поколения и методов биоинформационного анализа подтверждены пока еще в единичных исследованиях за последние несколько лет.

**Целью настоящего исследования** было изучение экзота опухолевых клеток пациентов с впервые выявленным хроническим миелолейкозом (ХМЛ). Диагноз ХМЛ подтвержден цитогенетическим и молекулярно-генетическим методами. Полноэкзомный анализ опухолевой ткани выполнен на платформе Ion Torrent (Life Technologies).

В настоящий момент проанализированы экзоты 3 пациентов с ХМЛ. Биоинформационный анализ данных, полученных после полноэкзомного секвенирования выявил от 2855 до 3326 несинонимичных однонуклеотидных замен на каждый экзом, среди которых от 774 до 876 являются впервые выявленными (не описанными в базе данных dbSNP129). Дальнейший биоинформационный анализ позволит определить рекуррентные мутации, играющие определенную роль в пато-

генезе ХМЛ. Кроме того, выявлено от 159 до 230 однонуклеотидных замен на каждый экзон в генах, кодирующих малые интерферирующие РНК. По последним данным мРНК играют огромную роль в патогенезе опухолевых заболеваний.

Обнаруженные однонуклеотидные замены могут играть ключевую роль в понимании молекулярных механизмов патогенеза ХМЛ и разработке новых прогностических маркеров эффективности терапии ХМЛ.

Лукьянова А. С.<sup>1</sup>, Зотова Е. В.<sup>1</sup>, Вальчук М. А.<sup>1</sup>, Ризер И.<sup>2</sup>, Котлярчук К. Б.<sup>1</sup>, Кароль Ю. С.<sup>1</sup>, Корольчук О. С.<sup>1</sup>, Лукавецкий Л. М.<sup>1</sup>, Логинский В. Е.<sup>1</sup>, Пеньковска-Греля Б.<sup>2</sup>, Масляк З. В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ГУ «Институт патологии крови и трансфузионной медицины НАМН Украины», г. Львов.

<sup>2</sup> Онкологический центр — Институт им. М. Склодовской-Кюри, г. Варшава.

### ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ АБЕРРАЦИИ, ПРИВОДЯЩИЕ К УВЕЛИЧЕНИЮ КОЛИЧЕСТВА КОПИЙ ГЕНА *BCR/ABL* ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ МИЕЛОЕЙКОЗЕ

**Введение.** Хронический миелолейкоз (ХМЛ) — клональное миелопролиферативное заболевание, характеризующееся наличием специфической хромосомной аномалии —  $t(9;22)(q34;q11)$  — филадельфийской (Ph) хромосомы. Результатом этой транслокации является появление химерного гена *BCR/ABL*, продукт которого вызывает неконтролируемую пролиферацию клеток миелоидного ряда. Увеличение количества копий Ph-хромосомы и, как следствие, количества копий химерного гена, является одним из проявлений клональной эволюции и может являться одной из причин резистентности к терапии ингибиторами тирозинкиназы (ИТК).

**Цель исследования** — проанализировать частоту и характер аномалий, приводивших к увеличению количества копий гена *BCR/ABL*.

**Материал и методы.** Обследовано 285 больных с клинически и цитогенетически подтвержденным диагнозом ХМЛ. Цитогенетическое исследование клеток костного мозга было проведено по стандартной методике. При проведении метода флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH) использована метка *BCR/ABL* DC DF (Vysis, США). Все FISH-исследования проведены в лаборатории цитогенетики Онкологического центра — Института им. М. Склодовской-Кюри (Варшава, Польша). При кариотипировании анализировали 20 метафазных пластинок, при FISH-исследовании — не менее 200 интерфазных ядер. При анализе и описании кариотипа руководствовались критериями *International System for Human Cytogenetic Nomenclature* — ISCN, 2009.

**Результаты.** Из 285 больных ХМЛ клональная эволюция в Ph-позитивных клетках была обнаружена в 50 случаях (17,5% обследованной группы). Среди этих 50 больных цитогенетические аномалии, приводившие к увеличению количества копий гена *BCR/ABL*, были выявлены у

29 (58% случаев клональной эволюции). Данная группа из 29 больных была разделена на 2 подгруппы в зависимости от характера aberrаций.

В первой подгруппе (25 больных, 86% больных с увеличением количества копий гена *BCR/ABL*) представлены случаи с увеличением количества копий Ph-хромосомы без изменения ее структуры. У 23 больных были обнаружены нормальная и измененная хромосомы 9, нормальная копия хромосомы 22 и от 2 до 5 копий Ph-хромосомы. В 1 случае анализ кариотипа показал наличие двух измененных вследствие транслокации  $t(9;22)(q34;q11)$  хромосом 9 и 22 без наличия их нормальных копий. В последнем случае выявлены клетки с нормальными хромосомами 9 и 22 и двумя измененными вследствие транслокации  $t(9;22)(q34;q11)$  хромосомами 9 и 22.

К подгруппе 2 (4 больных, 14%) отнесли случаи, в которых наблюдали изменение структуры производной хромосомы 22. У 3 больных был обнаружен изодериват Ph-хромосомы в количестве 1–2 копий. В 1 случае выявлен изодицентрический дериват Ph-хромосомы в количестве 1–5 копий.

Во всех случаях наличие и характер выявленных нами aberrаций были подтверждены с помощью метода FISH на метафазных пластинках. Количество копий гена *BCR/ABL* в описанных случаях составляло 2–10 копий, в зависимости от характера aberrаций.

Из 29 больных с описанными aberrациями терапию ИТК (иматиниб) получали 24. Из них в 2 случаях после обнаружения дополнительных аномалий был назначен nilотиниб, в 1-дазатиниб. У одного больного (с одной дополнительной копией Ph-хромосомы) после назначения nilотиниба был достигнут полный цитогенетический и молекулярный ответ. У двух остальных больных цитогенетический ответ после смены лечения от-

существовал, а дополнительные аномалии сохранялись. Все остальные пациенты являлись резистентными к терапии ИТК, а смертность в описанной группе составила 62% (18 случаев из 29).

**Выводы.** Частота клональной эволюции в обследованной группе пациентов превысила 17%. Цитогенетические аномалии, вследствие которых увеличивалось количество копий гена *BCR/ABL*, были обнаружены в 58% всех случаев клональной эволюции. Наиболее частым (86% случаев) механизмом увеличения количества копий гена *BCR/ABL* было появление дополнительных

копий Ph-хромосомы без изменений ее структуры. В то же время, в 14% случаев обнаружены изодериваты Ph-хромосомы различного характера. Обнаружение подобных аномалий является прогностически неблагоприятным и требует незамедлительной коррекции лечения, поскольку увеличение количества копий гена *BCR/ABL* является одной из причин неудовлетворительности терапии ИТК. Описанные аберрации также могут представлять интерес с точки зрения исследования механизмов клональной эволюции и патогенеза ХМЛ.

Лямкина А. С., Поспелова Т. И.

Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования  
Новосибирский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения России.

### РОЛЬ ГЕНЕТИЧЕСКИХ И МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕТОДОВ ИССЛЕДОВАНИЯ В ДИАГНОСТИКЕ И МОНИТОРИНГЕ ТЕРАПИИ ХРОНИЧЕСКОГО МИЕЛОЛЕЙКОЗА В НОВОСИБИРСКЕ

**Актуальность.** Появление ингибиторов тирозинкиназы (ИТК) значительно изменило прогноз у больных хроническим миелолейкозом (ХМЛ). Благодаря проведению современных цитогенетических и молекулярных методов исследования с целью диагностики и мониторинга эффективности терапии ингибиторами тирозинкиназы, широкому диапазону доступных в настоящее время подходов к терапии ХМЛ, стало возможным эффективно контролировать ранее неизлечимое заболевание.

**Цель.** Оценить восьмилетние результаты терапии хронического миелолейкоза ингибиторами тирозинкиназы в г. Новосибирске с помощью современных цитогенетических и молекулярных методов исследования.

**Методы.** С января 2004 г. по настоящее время в Городском гематологическом центре г. Новосибирска наблюдались 76 больных ХМЛ: в хронической фазе (ХФ) 65 человек, фазе акселерации (ФА) 7 человек и фазе бластного криза (БК) 5 человек. Из 76 пациентов было 29 мужчин (38,2%) и 47 женщин (61,8%), возраст варьировал от 16 до 78 лет, средний возраст составляет  $44,7 \pm 15,17$  года. У всех пациентов диагноз был подтвержден с помощью цитогенетического исследования костного мозга (Ph-хромосома) и молекулярного метода исследования периферической крови (ген *bcr/c-abl*). В анализ вошли 82,9% пациентов (63 человека): 56 человек в хронической фазе, 5 — в фазе акселерации и 2 в фазе

бластного криза. Больные в хронической фазе начали принимать ИТК в первые 6 месяцев с момента диагностики ХМЛ. Больным в фазе акселерации и бластного криза диагноз был установлен до 2003 года, эти больные были значительно предпочтены различными цитостатическими препаратами. Все пациенты в настоящее время получают терапию различными ингибиторами тирозинкиназы (иматиниб в дозе 400–800 мг в сутки, 3 пациента — нилотиниб в дозе 800 мг в сутки, из них 2 — как терапию первой линии, 2-дазатиниб 100–140 мг в сутки). На фоне терапии ингибиторами тирозинкиназы всем пациентам, согласно международным рекомендациям ELN (European Leukemia Net), проводилось цитогенетическое исследование костного мозга через 6 и 12 месяцев от начала терапии, после достижения полного цитогенетического ответа — 1 раз в год; молекулярное исследование периферической крови — каждые 3 месяца от начала терапии. При недостижении оптимального ответа по данным цитогенетических и молекулярных методов исследования проводилось повышение дозы ИТК или замена препарата. Умерли 13 пациентов (17,1%): 8 больных в хронической фазе по причинам, не связанным с гемобластозом, 2 больных в фазе акселерации и 3 пациентов в фазе бластного криза из-за прогрессирования основного заболевания (6,6%).

**Результаты.** На фоне монотерапии ИТК у больных в хронической фазе полная клинико-ге-

матологическая ремиссия (ПКГР) была получена у 94,6% пациентов, полная цитогенетическая ремиссия (ПЦГР) — у 80%, большой молекулярный ответ (БМО) — у 66,1% обследованных. В фазе акселерации у 4 больных также получена полная клинико-гематологическая ремиссия, а у 3 человек в фазе акселерации и у пациентов в фазе бластного криза — стабилизация процесса.

Проведен анализ выживаемости у пациентов, получающих ИТК, в сравнении с не получавшими ИТК (данные получены на основании ретроспективного анализа историй болезни больных ХМЛ, наблюдавшихся в Городском гематологическом центре г. Новосибирска в 1999–2004 гг.). Для оценки выживаемости использовалась статистическая программа подсчета кумулятивной доли выживших (метод Каплан-Мейера), за критерий достоверности принималось  $p < 0,05$ . В группе, получавшей терапию ИТК, медиана выживаемости не достигнута, 8-летняя выжи-

ваемость составила 82,9%, расчетная 10-летняя выживаемость — более 70%. В группе, получавшей другие цитостатические препараты, медиана выживаемости была равна 4,1 года, расчетная 10-летняя выживаемость — 9%,  $p < 0,000001$ . Общая бессобытийная выживаемость у больных, получающих ИТК, составила 56,6%, в хронической фазе — 68,3%.

**Выводы.** Молекулярные и цитогенетические методы исследования являются надежными способами диагностики и мониторинга эффективности терапии хронического миелолейкоза ингибиторами тирозинкиназы, использование которых и изменение терапевтической тактики в адекватные сроки позволяет в ХФ заболевания добиться высокого процента большого молекулярного ответа, что приводит к значительному повышению общей и бессобытийной выживаемости пациентов.

*Мартынкевич И. С., Мартыненко Л. С., Цыбакова Н. Ю., Иванова М. П.,  
Волошин С. В., Абдулкадыров К. М.*

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

### **РОЛЬ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ИССЛЕДОВАНИЯ В ДИАГНОСТИКЕ И ТЕРАПИИ ХРОНИЧЕСКОГО ЛИМФОЛЕЙКОЗА**

Клинические проявления и прогноз при хроническом лимфолейкозе (ХЛЛ) гетерогенны. Некоторые пациенты живут 20 и более лет, однако у 50% больных наблюдается быстрая прогрессия с последующим неблагоприятным исходом. Становится очевидным, что у этих пациентов терапию необходимо начинать, не дожидаясь прогрессии. И это обусловлено открытием новых прогностических маркеров, отражающих биологию опухолевых клеток. К одним из наиболее важных из них, обуславливающих неблагоприятное течение заболевания, относятся комплексный кариотип, делеция р53-гена (17p) и повреждение ATM-гена.

**Целью** нашего исследования была сравнительная характеристика частоты встречаемости цитогенетических aberrаций у больных ХЛЛ в дебюте заболевания и на различных стадиях прогрессии заболевания.

**Материалы и методы.** В исследование включены 87 больных с хроническим лимфолейкозом (ХЛЛ), составивших две исследуемых группы: 60 пациентов с впервые диагностированным

ХЛЛ (группа 1) и 27 больных, обследованных на различных стадиях прогрессии заболевания (группа 2). По гендерному соотношению группы достоверно ( $p = 0,0034$ ) отличались друг от друга, 31 мужчина (51,7%) и 29 женщин (48,3%) в группе 1, тогда как в группе 2—16 мужчин (59%) и 11 женщин (41%). По возрасту, пациенты не отличались в группах, медиана составила 62 года и 59,3 года, соответственно. В то время как по уровню лейкоцитов были получены достоверные ( $p = 0,0412$ ) отличия между группами —  $52,4 \times 10^9/\text{л}$  в 1 группе и  $97,6 \times 10^9/\text{л}$  во 2 группе. У всех больных проводилось стандартное цитогенетическое исследование (СЦИ) клеток периферической крови, стимулированной В-митогенами (LPS, TPA), и FISH исследование с использованием зондов LSI ATM(11q22), LSI TP53(17p13.1), CEP12 и LSI 13q14 (Abbott).

**Результаты.** При цитогенетическом исследовании пациентов двух исследуемых групп нормальный кариотип определялся у 13 из 60 (21,7%) в группе 1 и у 13 (48,1%) из 27 пациентов группы 2. Как правило, выявленные хро-

мосомные аберрации были высокоспецифичными для лимфопролиферативных заболеваний в обеих группах и обнаружены у 47 (78,3%) из 60 и у 14 (51,9%) из 27 больных, соответственно. Чаще обнаруживались +12 хромосома — у 18 (30%) из 60 и у 4 (14,8%) из 27 больных; del(11q) в точке локализации прогностически значимого ATM-гена — у 14 (23,3%) из 60 и у 8 (29,6%) из 27 пациентов; аномалии 13 хромосомы — у 9 (15%) из 60 и у 5 (18,5%) из 27 исследуемых; делеция p53 гена — у 4 (6,7%) из 60 и у 3 (11,1%) из 27 больных, соответственно. При этом комплексные нарушения кариотипа обнаруживались у 12 (20%) из 60 пациентов в группе 1 и у 8 (29,6%) из 27 больных группы 2.

Сравнительный анализ цитогенетических результатов в двух изучаемых группах пациентов, полученных при проведении стандартного и молекулярно-цитогенетического FISH метода, не показали достоверных отличий в частоте вы-

явления нормального кариотипа ( $p=0,0698$ ) и трисомии +12 хромосомы ( $p=0,2330$ ). Однако аберрации, обуславливающие неблагоприятное течение заболевания (комплексный кариотип ( $p=0,0250$ ); делеция ATM-гена ( $p=0,0509$ ); делеция p53-гена ( $p=0,0001$ )), достоверно чаще встречались в группе резистентных пациентов в сравнении с впервые диагностированным ХЛЛ. Использование FISH анализа параллельно со стандартным кариотипированием позволило нам повысить выявляемость патологического кариотипа у больных ХЛЛ на 36%.

**Таким образом**, цитогенетические исследования, выполненные у больных ХЛЛ, позволяют выделить группу пациентов высокого риска с делецией p53 — и ATM-генов и комплексным кариотипом. В динамике заболевания проведение цитогенетических исследований необходимо для выявления клональной эволюции, свидетельствующей о прогрессии заболевания

Мисюрин А. В.<sup>1,2,3</sup>, Кесаева Л. А.<sup>1,2</sup>, Мисюрина Е. Н.<sup>1,2</sup>, Крутов А. А.<sup>1,2</sup>, Солдатова И. Н.<sup>1,2</sup>, Кайсина К. С.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ООО «ГеноТехнология», Москва.

<sup>2</sup> ФГБУ «ФНКЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева МЗ РФ», Москва.

<sup>3</sup> НИИ ЭД и ТО ФГБУ «РОИЦ им. Н. Н. Блохина» РАМН.

### ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА BCR-ABL ПРИ ХРОНИЧЕСКИХ МИЕЛОПРОЛИФЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

В 2010 году мы обнаружили высокую частоту встречаемости экспрессии гена BCR-ABL (30%) в группе больных с длительно протекающими (более 5 лет) Jak2 V617F-положительными хроническими миелопролиферативными заболеваниями (хМПЗ) с признаками прогрессии и резистентности к терапии гидроксимочевинной и ИНФ-а (ЕНА 2010, #1504). Это свидетельствовало о том, что длительное течение Jak2 V617F-положительных хМПЗ предрасполагает к появлению дополнительного опухолевого клона с экспрессией химерного онкогена BCR-ABL, из-за чего заболевание прогрессирует и развивается резистентность к проводимой терапии. Недавно было опубликовано несколько случаев миелопролиферативных заболеваний, при которых наблюдалось сочетание мутации Jak2 V617F и экспрессии гена BCR-ABL. При этом некоторые авторы устанавливали своим больным диагноз BCR-ABL-положительного ХМЛ с дополнительной мутацией Jak2 V617F, другие — Jak2 V617F-положительного хМПЗ с дополнительной экспрессией гена BCR-ABL (Krämer A. (2007);

Conchon M. R. M. (2008); Jallades L. (2008); Laib S. (2009); Toogeh G. (2010); Bee P. C. (2010)). Отсутствие единого подхода к трактовке подобных случаев и различия мнений при установке диагноза может приводить к выбору неверной терапевтической тактики, поэтому феномен сочетания этих молекулярных маркеров у одного больного требует дальнейшего изучения. В настоящей работе нами был проведен анализ частоты встречаемости экспрессии гена BCR-ABL у первичных больных Jak2 V617F-положительной эритремией. Сочетание этих маркеров было обнаружено только у 2 из 55 больных (3,66%).

**Таким образом**, было обнаружено существенное различие ( $p=0,003$ ) частот встречаемости сочетания экспрессии BCR-ABL и мутации Jak2 V617F у первичных больных эритремией в сравнении с длительно протекающими хМПЗ с признаками прогрессии и резистентности. Мы предположили, что причиной возникновения дополнительного клона с химерным геном BCR-ABL при хМПЗ может быть активация рекомбиназы V(D)J в результате повышенной напряженности



сигнального пути Jak2 из-за мутации V617F. Для проверки этой гипотезы нами был оценен уровень экспрессии генов RAG1 и RAG2 в гранулоцитах больных Jak2 V617F-положительными хМПЗ в сравнении с экспрессией этих ключевых компонентов рекомбиназы V(D)J в гранулоцитах здоровых доноров. Было обнаружено существенное усиление экспрессии этих генов

у Jak2 V617F-положительных больных хМПЗ. Следовательно, возникновение дополнительного клона, экспрессирующего химерный онкоген BCR-ABL, у больных хМПЗ с мутацией Jak2 V617F является естественным результатом повышенной напряженности у таких больных сигнального пути Jak2 и активности рекомбиназы V(D)J.

*Мисюрин А. В.<sup>1,47,48</sup>, Крутов А. А.<sup>1,47</sup>, Солдатова И. Н.<sup>1,47</sup>, Кесаева Л. А.<sup>1,47</sup>, Финашутин Ю. П.<sup>47</sup>, Тихонова В. В.<sup>47</sup>, Солдаткина О. И.<sup>1,47</sup>, Иванова В. Л.<sup>2</sup>, Новицкая Н. В.<sup>2</sup>, Аршанская Е. Г.<sup>2</sup>, Лазарев И. Г.<sup>2</sup>, Волкова М. А.<sup>3</sup>, Поспелова Т. И.<sup>4</sup>, Блажиевич И. А.<sup>4</sup>, Домникова Н. П.<sup>4</sup>, Константинова Т. С.<sup>5</sup>, Высоцкая Л. Л.<sup>6</sup>, Володичева Е. М.<sup>7</sup>, Лапин В. А.<sup>8</sup>, Замятова Л. В.<sup>9</sup>, Давыдкин И. Л.<sup>10</sup>, Туркина А. Г.<sup>11</sup>, Колошейнова Т. И.<sup>11</sup>, Горячева С. Р.<sup>11</sup>, Челышева Е. Ю.<sup>11</sup>, Приступа А. С.<sup>12</sup>, Голубенко Р. А.<sup>13</sup>, Гаврилова Л. В.<sup>14</sup>, Волкова С. А.<sup>15</sup>, Кучма Г. Б.<sup>16</sup>, Анчукова Л. В.<sup>17</sup>, Вопилина Н. А.<sup>18</sup>, Гавриленко А. Н.<sup>19</sup>, Гайсарова Г. А.<sup>20</sup>, Гуцанская И. И.<sup>21</sup>, Дунаев Ю. А.<sup>22</sup>, Есефьева Н. Б.<sup>23</sup>, Калинова Н. А.<sup>24</sup>, Капланов К. Д.<sup>25</sup>, Капорская Т. С.<sup>26</sup>, Кириллова Е. Г.<sup>27</sup>, Киселева Т. А.<sup>28</sup>, Клиточенко Т. Ю.<sup>29</sup>, Косинова М. В.<sup>30</sup>, Лямкина А. С.<sup>4</sup>, Хомчук О. М.<sup>31</sup>, Фалькович О. М.<sup>32</sup>, Митрофанова Г. А.<sup>33</sup>, Молостова В. З.<sup>34</sup>, Мулина И. И.<sup>35</sup>, Пиллюшина В. В.<sup>36</sup>, Попова Ж. В.<sup>37</sup>, Тихонова Т. С.<sup>38</sup>, Скатова В. С.<sup>38</sup>, Толстокожая Т. М.<sup>39</sup>, Тумаков В. А.<sup>40</sup>, Чагорова Т. В.<sup>41</sup>, Чукавина М. М.<sup>42</sup>, Штыбель Р. Г.<sup>43</sup>, Яблокова В. В.<sup>44</sup>, Ялунина Л. М.<sup>30</sup>, Самышина Е. А.<sup>45</sup>, Сокурова Е. В.<sup>46</sup>*

<sup>1</sup> ООО «ГеноТехнология», Москва.

<sup>2</sup> Гематологический Московский городской центр при ГКБ им. С. П. Боткина, Москва.

<sup>3</sup> РОНЦ им. Н.Н. Блохина, Москва.

<sup>4</sup> НГМУ — Новосибирск.

<sup>5</sup> Свердловская ОКБ, Екатеринбург.

<sup>6</sup> МОНИКИ, Москва.

<sup>7</sup> Гематологический Центр Тульской ОКБ, Тула.

<sup>8</sup> Гематологический Центр ЯОКБ № 1, Ярославль.

<sup>9</sup> Астраханская медицинская академия, Астрахань.

<sup>10</sup> СамГМУ, Самара.

<sup>11</sup> ГНЦ МЗСР, Москва.

<sup>12</sup> Рязанская ОКБ, Рязань.

<sup>13</sup> Орловская ОКБ, Орел.

<sup>14</sup> Саранская ГКБ, Саранск.

<sup>15</sup> НГМА, Нижний Новгород.

<sup>16</sup> ОрГМА, Оренбург.

<sup>17</sup> Волгоградская ОБН № 1, Волгоград.

<sup>18</sup> Тамбовская ОКБ, Тамбов.

<sup>19</sup> ЧГБ № 1, Череповец.

<sup>20</sup> РКБ им. Г. Г. Куватова, Уфа.

<sup>21</sup> Брянская ОКБ, Брянск.

<sup>22</sup> Архангельская ОКБ, Архангельск.

<sup>23</sup> Ульяновская ОКБ, Ульяновск.

<sup>24</sup> Тверская ОКБ, Тверь.

<sup>25</sup> Волгоградский ОКОД № 1, Волгоград.

<sup>26</sup> Иркутский областной гематологический центр, Иркутск.

<sup>27</sup> Омская ОКБ, Омск.

<sup>28</sup> РКБ МЗСР Чувашской Республики, Чебоксары.

<sup>29</sup> Волгоградский ОКОД № 1, Волгоград.

<sup>30</sup> Кемеровская ОКБ, Кемерово.

<sup>31</sup> МБУЗ КБ № 5, Тольятти.

<sup>32</sup> Томская ОКБ, Томск.

<sup>33</sup> ГКБ № 29, Новокузнецк.

<sup>34</sup> ККБ № 1, Хабаровск.

<sup>35</sup> РБ № 1-НЦМ, Якутск.

<sup>36</sup> НУЗ «Отделенческая больница на ст. Смоленск» ОАО «РЖД», Смоленск.

<sup>37</sup> Воронежская ОКБ № 1, Воронеж.

<sup>38</sup> Белгородская ОКБ Святого Иоасафа, Белгород.

<sup>39</sup> Калужская ОБ, Калуга.

<sup>40</sup> Ивановская ОКБ, Иваново.

<sup>41</sup> ГБУЗ ООД, Пенза.

<sup>42</sup> МУЗ «Коломенская ЦРБ», Коломна.

<sup>43</sup> Владимирская ОКБ, Владимир.

<sup>44</sup> ЯГМА, Ярославль.

<sup>45</sup> ОД № 4, Москва.

<sup>46</sup> ГП № 9, Владивосток.

<sup>47</sup> ФГБУ «ФНКЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева МЗ РФ», Москва.

<sup>48</sup> НИИ ЭД и ТО ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» РАМН.

### ЧАСТОТА ВСТРЕЧАЕМОСТИ МУТАЦИЙ КИНАЗНОГО ДОМЕНА *BCR-ABL* У БОЛЬНЫХ ХМЛ, РЕЗИСТЕНТНЫХ К ТЕРАПИИ ИМАТИНИБОМ

**Введение.** Основной причиной резистентности больных ХМЛ к терапии иматинибом и другими ингибиторами тирозинкиназ (ИТК) являются мутации, затрагивающие участок между экзонами a3 и a11 гена *ABL*, которые входят в состав химерного онкогена и соответствующей мРНК *BCR-ABL*. Согласно рекомендациям European Leukemia Net (ELN) определение первичной последовательности этого участка мРНК *BCR-ABL* является обязательным видом анализа для всех больных ХМЛ с недостаточным первичным ответом на терапию иматинибом. Этот вид диагно-

стики необходим также в любой момент периода терапии ХМЛ иматинибом при появлении признаков потери ответа на этот препарат. Кроме того, этот анализ является обязательным при переходе на терапию нилотинибом и дазатинибом, так как спектр мутаций *BCR-ABL*, чувствительных к этим препаратам ИТК второй линии, различен. Известно, что нилотиниб не действует в случае возникновения мутаций *E255K/V*, *F359C/V* и *Y253H*, а для дазатиниба резистентными мутациями являются *T317L* и *F317I*. Кроме того, оба этих препарата не действуют при появлении му-

тации T315I. В настоящем сообщении приводятся данные о частоте встречаемости мутаций гена *BCR-ABL* у больных ХМЛ, резистентных к терапии иматинибом, наблюдавшихся в 68 клиниках из 53 городов России в период с января 2006 по февраль 2013.

**Материалы и методы.** В данное исследование включено 846 больных ХМЛ с признаками резистентности к терапии иматинибом. Больные ХМЛ находились в различных фазах заболевания, эффективность терапии иматинибом контролировалась в лаборатории ООО «ГеноТехнология» (Москва) при помощи количественной оценки экспрессии гена *BCR-ABL* методом ПЦР в реальном времени с применением Международной шкалы IS (International Scale). Мутационный анализ участка мРНК *BCR-ABL* между экзонами a3 и a11 проводился в ООО «ГеноТехнология» методом прямого секвенирования у больных ХМЛ.

**Результаты.** Мутации гена *BCR/ABL* были выявлены у 31% (n=262) больных ХМЛ, резистентных к терапии иматинибом. У 5,7% больных (n=16) были выявлены двойные мутации. Общее количество обнаруженных у 262 больных ХМЛ мутаций составило 278, среди которых было обнаружено 40 различных вариантов: T315I (35/262 — 12%), G250E (35/262 — 12%), T317L (33/262 — 7,9%), M244V (21/262 — 7,5%), F359V (18/262 — 6,4%), H396R (18/262 — 6,4%), Y253H (18/262 — 5,6%), E255K (16/262 — 5,7%), E255V (11/262 — 3,9%), L248V (11/262 — 3,9%), M315T (11/262 — 3,9%), E355G (8/262 — 2,8%), F359C (7/262 — 2,5%), del ex7 (5/262 — 2,3%), Q252H (5/262 — 2,3%), L387F (5/262 — 1,8%), S348L (4/262 — 1,4%), Ins98–72bp (3/262 — 1,1%), F317I (3/262 — 1,1%), E255D (3/262 — 1,1%), E275K (2/262 — 0,7%), E279A (2/262 — 0,7%), K247R (2/262 — 0,7%), L387M (2/262 — 0,7%), V299A (2/262 — 0,7%), E292V (1/262 — 0,3%), E334G (1/262 — 0,3%), E450K (1/262 — 0,3%), E459A (1/262 — 0,3%), E459K (1/262 — 0,3%), F359I (1/262 — 0,3%), F486S (1/262 — 0,3%), L383F (1/262 — 0,3%), P441L (1/262 — 0,3%), Q252M (1/262 — 0,3%), Q491L (1/262 — 0,3%), T305I (1/262 — 0,3%), T345I (1/262 — 0,3%), Y312C (1/262 — 0,3%), T520S (1/262 — 0,3%), G425Stop (1/262 — 0,3%). Среди двойных мутаций преобладали мутации, затрагивающие особо значимый для возникновения резистентности к иматинибу домен Р-петли. Помимо точечных мутаций, приводящих к единичным аминокислотным заменам, в нашем исследовании были обнаружены мутации, приводящие к более существенным изменениям структуры белка

*BCR-ABL*: инсерция Ins 98–72 bp (встраивание фрагмента длиной 72 п.н. между 8 и 9 экзонами), del ex7 (делеция 7 экзона из состава мРНК *BCR-ABL*), а также мутация G425Stop, приводящая к появлению стоп-кодона в средней части гена *BCR/ABL*. Эти мутации приводят к появлению укороченных молекул белка *BCR-ABL*, устойчивых к действию препаратов ИТК. Медиана срока возникновения мутаций составила 27 мес. (от 3 до 83 мес.). Распределение мутаций по стадиям: ХФ — 49,3% (n=129/262), ФА — 29,8% (n=78/262), БК — 20,9% (n=55/262). Среди них распределение мутации, резистентных к нилотинибу и дазатинибу (ИТК 2 линии), было следующим: T315I (устойчива и к нилотинибу, и к дазатинибу) — ХФ — 5,6%, ФА — 16%, БК — 27%; устойчивые к нилотинибу E255V/K/D — ХФ — 6,2%, ФА — 12,8%, БК — 16,4%, F359V/C/I-ХФ- 9,3%, ФА — 7,7%, БК — 2,7%, Y253H-ХФ — 5,4%, ФА — 8,9%, БК — 7,3%; устойчивые к дазатинибу F317L/I-ХФ — 4,6%, ФА — 12,8%, БК — 16,4%. Доля всех мутаций, устойчивых к ИТК 2 линии (с учетом T315I), составила для нилотиниба 40,3%, для дазатиниба — 21%. У 69% (n=584) больных ХМЛ, резистентных к терапии иматинибом, мутации *BCR/ABL* обнаружены не были.

**Выводы:** Данное исследование подтвердило существенное значение возникновения мутаций в гене *BCR-ABL* для развития резистентности к иматинибу, доля таких больных ХМЛ составила 31%. Однако у 2/3 больных ХМЛ, резистентных к этому препарату, такие мутации выявлены не были, следовательно, вклад *BCR-ABL*-независимых генетических событий в развитие устойчивости к ИТК-1, является не менее значительным. Результаты данной работы показали, что помимо точечных мутаций причиной резистентности к препаратам ИТК могут быть другие мутации, которые приводят к более масштабным изменениям структуры белка *BCR-ABL*. Значительная доля мутаций, приводящих к резистентности к ИТК-2 у больных ХМЛ, получавших терапию ИТК-1, подчеркивает важность проведения мутационного анализа при смене терапии с ИТК-1 на ИТК-2. Некоторое преобладание мутаций, резистентных к нилотинибу, над мутациями, устойчивыми к дазатинибу, можно объяснить структурным сходством молекул иматиниба и нилотиниба, которые в связи с этим имеют пересекающиеся спектры резистентных мутаций. Следует ожидать, что при переходе нилотиниба и дазатиниба в первую линию терапии ХМЛ данная ситуация может измениться.

Назарова Е. Л., Демьянова В. Т., Шардаков В. И., Зотина Е. Н., Загоскина Т. П.

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

### ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА *IL17A* У БОЛЬНЫХ В-КЛЕТОЧНЫМИ ОПУХОЛЯМИ ЛИМФАТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ

Интерлейкин-17А (*IL17A*) — один из цитокинов, продуцируемых в основном Т-хелперами 17 типа. Он регулирует деятельность NF-κB и митоген-активированной протеинкиназы, стимулирует экспрессию *IL6* и циклооксигеназы-2, а также увеличивает синтез окиси азота и высвобождение провоспалительных и нейтрофил-мобилизующих цитокинов. Полиморфизм гена *IL17A* может приводить к изменению активности его продукта или интенсивности синтеза соответствующего интерлейкина, что является причиной индивидуального течения патологического процесса, опосредованного влиянием *IL17A*. В доступной литературе не представлено результатов исследований по оценке информативности генетических вариантов полиморфного маркера *-197G>A IL17A* как предиктора развития, в частности, гемобластозов и В-клеточных опухолей лимфатической системы (В-ОЛС).

**Цель исследования.** Определение частоты различных полиморфных вариантов гена *IL17A* у больных В-ОЛС и поиск связи выявленных генотипов с риском развития данного вида гемобластозов.

**Материал и методы.** Обследовано 34 пациента с В-ОЛС, идентифицирующих себя как русские, в возрасте от 22 до 77 лет. Средний возраст больных составил —  $58 \pm 2$  года. Проводили геномное тестирование полиморфного участка — *197G>A* гена *IL17A* методом полимеразной цепной реакции с аллель-специфичными праймерами и электрофоретической детекцией продуктов реакции в агарозном геле. Оценку отклонения наблюдаемых распределений генотипов от ожидаемых при равновесии Харди-Вайнберга проводили с расчетом  $\chi^2$  с поправкой Йейтса на

непрерывность, а также вычисляли отношение шансов риска возникновения заболевания (OR) с использованием пакета программ MS Office Excel 2003 и STATISTICA V.6.0.

**Результаты.** В группе больных В-ОЛС преобладающим являлся генотип *GG* гена *IL17A* — 70,6% в отличие от средней частоты данного генотипа у здоровых индивидов в русской популяции (34,8%) ( $\chi^2=8,50$ ,  $p=0,0036$ ; OR=2,00,  $p<0,05$ ). Обратное соотношение отмечено при гетерозиготном носительстве *GA* — 26,5% и 47,1%, соответственно, хотя без достоверного отличия частоты генотипа в двух представленных когортах ( $\chi^2=3,10$ ,  $p=0,0783$ ; OR=0,17,  $p<0,05$ ). Наименьшей распространенностью характеризовалось сочетание *AA*: 2,9% у больных В-ОЛС и 17,6% у доноров ( $\chi^2=3,98$ ,  $p=0,0460$ ; OR=0,17;  $p<0,05$ ).

**Выводы.** В ходе исследования получены статистически значимые отличия в частоте отдельных генотипов однонуклеотидного полиморфизма *-197G>A* гена *IL17A* у больных В-ОЛС. Выявленные закономерности позволяют сделать предварительное заключение о том, что гомозиготное носительство по аллелю *-197G* ассоциировано с повышенным риском развития В-ОЛС, а гетерозиготное носительство (*GA*) и генотип *AA* обладают протективными свойствами в отношении возникновения этого вида гемобластозов.

Таким образом, полученные данные о частоте встречаемости генотипов гена *IL17A*, продукт которого обеспечивает полноценный иммунный ответ, могут быть использованы при популяционно-генетических исследованиях, направленных на определение роли генетической компоненты в развитии В-ОЛС у населения различной этнической принадлежности.

Никитин Е. Н., Петрашова Н. А., Костылева М. Б.

Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Ижевская государственная медицинская академия Росздрава», г. Ижевск.  
Бюджетное учреждение здравоохранения Удмуртской Республики «1 Республиканская клиническая больница Минздрава Удмуртской Республики», г. Ижевск.

## ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ЛЕЧЕНИЯ БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ МИЕЛОЛЕЙКОЗОМ ПРЕПАРАТОМ ГЛИВЕК

**Актуальность.** Появление качественно новой группы препаратов — ингибиторов тирозинкиназы открыло новый этап в лечении хронического миелолейкоза (ХМЛ). Внедрение в клиническую практику иматиниба мезилата (гливек), существенно подавляющего патологический Ph-позитивный клон клеток, коренным образом изменило прогноз у больных ХМЛ, позволило добиться выраженного контроля над заболеванием, значительно снижая переход ХМЛ в терминальную фазу.

**Цель работы.** Оценка эффективности терапии препаратом гливек хронического миелолейкоза.

**Материалы и методы.** В исследование включено 62 больных ХМЛ, состоящих на учете у гематолога в поликлинике 1 РКБ г. Ижевска, получающих гливек по федеральной программе и включенных в Российский регистр больных хроническим миелолейкозом. Период наблюдения составил с декабря 1995 года по декабрь 2010 года. Прием гливека больными как препарата 1-й линии терапии ХМЛ начат с июня 2004 года. Возраст больных колебался от 20 до 80 (в среднем  $52,88 \pm 1,63$ ) лет. На момент постановки диагноза ХМЛ возраст пациентов составлял 14–77 ( $49,87 \pm 1,7$ ) лет. Из них женщин было 32 (51,61%), а мужчин — 30 (48,39%) человек. В оценку включены 48 больных (77,4%) в хронической фазе ХМЛ, 13 больных (21%) в фазе акселерации и 1 больной в фазе бластного криза (1,6%). Для уточнения диагноза и мониторинга лечения ХМЛ применялись генетические методы исследования: стандартная цитогенетика для оценки кариотипа опухолевых клеток и молекулярно-генетический анализ химерного гена BCR/ABL методом полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Длительность заболевания на момент исследования составила от 4 до 190 месяцев; медиана 32 (14;70,5) месяца. Предлеченными были 46 человек (74,19%), которые ранее получали миелосан, гидреа, интерферон- $\alpha$ . Длительность приема гливека от 2 до 78 месяцев; медиана

22 (9;46,5) месяцев. 49 человек (79%) получали по 400 мг гливека в сутки, 300 мг — 1 человек (9,68%), 400–600 мг — 6 человек (9,68%), 600 мг — 4 человека (6,45%), 600–800 мг — 2 человека (3,24%). Эффективность терапии гливеком оценивалась согласно европейским рекомендациям (ELN).

**Результаты.** Через 3 месяца терапии гливеком 62,9% больных достигли полной клинико-гематологической ремиссии, через 6 мес. — 70,9%, через 9 мес. — 72,5%, через 12 мес. — 76%.

Полный цитогенетический ответ (ПЦО) выявлен к 6 месяцам лечения — у 11,11% пациентов, к 9 месяцам — у 26,66%, к 12 мес. — у 31,11%, к 18 месяцам — у 42,22%, к 24 месяцам — у 44,44%, к 36 месяцам — у 48,88%, к 48 месяцам — у 55,55%.

Полный молекулярный ответ получен у 21 (58,34%) пациента, у большинства из них (38,9%) — к 1,5 годам лечения.

Оптимальный ответ на лечение достигнут у 38,7%, субоптимальный — у 32,3%, нет ответа — у 29% пациентов.

9-летняя общая выживаемость наблюдалась у 69% больных, а аналогичная безрецидивная выживаемость — у 40%. Медиана общей выживаемости не достигнута. Медиана безрецидивной выживаемости составила 111 месяцев.

Таким образом, применение гливека в качестве первой линии терапии ХМЛ является высокоэффективным методом лечения, что способствует увеличению показателя общей и безрецидивной выживаемости больных ХМЛ. В диагностике и мониторинге эффективности современного лечения ХМЛ надежную и неоценимую помощь оказывают генетические методы исследования, такие как стандартная цитогенетика для обнаружения филадельфийской (Ph+) хромосомы и других нарушений кариотипа и метод полимеразной цепной реакции для детекции маркерного транскрипта опухолевых клеток гена BCR/ABL.

Обухова Т. Н.<sup>1</sup>, Барях Е. А.<sup>1</sup>, Алимова Г. А.<sup>1</sup>, Клеина И. В.<sup>1</sup>, Гребенюк Л. А.<sup>1</sup>, Ковригина А. М.<sup>1</sup>, Капланская И. Б.<sup>1</sup>,  
Луговская С. А.<sup>2</sup>, Тупицын Н. Н.<sup>3</sup>, Воробьев И. А.<sup>1</sup>, Лорие Ю. Ю.<sup>1</sup>, Звонков Е. Е.<sup>1</sup>, Магомедова А. У.<sup>1</sup>,  
Черныш С. А.<sup>4</sup>, Колошейнова Т. И.<sup>1</sup>, Морозова А. К.<sup>1</sup>, Петрова Г. Д.<sup>4</sup>, Нестерова Е. С.<sup>1</sup>,  
Римашевская Е. В.<sup>5</sup>, Гаврилина О. А.<sup>1</sup>, Семенова А. А.<sup>3</sup>, Кравченко С. К.<sup>1</sup>, Домрачева Е. В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБУ Гематологический научный центр МЗ РФ, Москва.

<sup>2</sup> Кафедра клинической лабораторной диагностики РМАПО МЗ РФ, Москва.

<sup>3</sup> ФГБУ Российский онкологический научный центр им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва.

<sup>4</sup> ГКБ им. С. П. Боткина Департамента здравоохранения г. Москвы.

<sup>5</sup> ЦКБ № 2 им Н. А. Семашко ОАО «РЖД», Москва.

## ДИАГНОСТИКА «DOUBLE-HIT» ЛИМФОМ

Транслокации локуса гена С-МҮС/8q24 являются цитогенетическими маркерами лимфомы Беркитта (ЛБ), но могут выявляться в редких случаях других лимфатических опухолей в качестве вторичного хромосомного нарушения. «Double-hit» лимфомы характеризуются наличием транслокаций С-МҮС в сочетании с другими транслокациями в повторяющихся точках разрывов, таких как BCL2/18q21, BCL6/3q27 и CCND1/11q13.

За 12-летний период в лаборатории кариологии ГНЦ «Double-hits» выявлены у 15 пациентов В-клеточными лимфомами; 9 женщин и 6 мужчин; средний возраст 56 лет (30–79). 10-ти больным выполнено стандартное цитогенетическое исследование и FISH, у 4-х больных только парафиновые блоки, у 1-го — отпечатки опухоли были доступны для FISH исследования. Для FISH использовали ДНК-пробы: LSI С-МҮС/IGH, сер 8 DF TP; LSI С-МҮС BAP; LSI BCL-2/IGH DF TP; LSI BCL-2 BAP; LSI BCL-6 BAP; LSI CCND1/IGH DF TP и LSI CCND1 BAP (Abbott); XL IGL BAP Probe и XL IGK BAP (MetaSystems).

Из 10-ти первичных больных у 7-ти диагностирована диффузная В-крупноклеточная лимфома (ДВККЛ) (по классификации ВОЗ 2008 г.: В-клеточная лимфома, неклассифицируемая, занимающая промежуточное положение между ДВККЛ и ЛБ), у 1-го — фолликулярная лимфома (ФЛ), у 1-й — В-острый лимфобластный лейкоз (В-ОЛЛ), у 1-го — В-лимфобластная лимфома, «зрелый иммуноподвариант». У 2-х пациентов С-МҮС-транслокации выявлены в рецидиве заболевания (1 — ФЛ, 1 — лимфома из клеток мантийной зоны (ЛКМЗ), бластоидный вариант), через 9 лет и 8 месяцев соответственно от момента ремиссии. У одного больного с моноклональной гаммапатией неясной этиологии (MGUS) и одного множественной миеломой (ММ) через 2 и 5 лет соответственно заболевание прогрессировало в С-МҮС+ плазмобластный лейкоз и экстрамедуллярную плазмочитому. У 2-х больных ДВККЛ транслокации С-МҮС при FISH не выявлялись в дебюте, но обнаружены через 5 и 8 месяцев в про-

грессии заболевания. В 9-ти случаях транслокации С-МҮС выявлялись в сочетании с перестройками BCL2 (ДВККЛ — 6, ОЛЛ — 2, ФЛ — 1); в 3-х случаях ДВККЛ с BCL6; в 3-х случаях (ЛКМЗ — 1, ММ — 2) с CCND1. Характерные для ЛБ транслокации С-МҮС с Ig хромосомными партнерами выявлены в 7 случаях: IgH/14q32 — 3, включая сложную транслокацию t(8;11;14)(q24;q13;q32) у больного с экстрамедуллярной плазмочитомой; Igl/22q11 — 3, Igk/2p12 — 1. В 8-ми случаях были выявлены не встречающиеся при ЛБ транслокации С-МҮС с не-Ig хромосомными партнерами. У 1-й пациентки ДВККЛ в составе тетраплоидного клона обнаружены транслокации IgH/14q32 в обоих аллелях — t(8;14)(q24;q32) + t(14;18)(q32;q21). Ki-67~100% наблюдалась во всех случаях, за исключением пациентов ЛКМЗ (42%) и В-ОЛЛ (59%). Во всех случаях ДВККЛ, в случаях В-лимфобластной лимфомы и экстрамедуллярной плазмочитомы морфологическая картина соответствовала Беркиттоподобной лимфоме. У 2-х пациентов с цитогенетическим маркером зрелоклеточной лимфатической опухоли — ФЛ (транслокации с вовлечением локуса гена Bcl2/18q21) выявлен «незрелый» иммунофенотип, соответствующий пре-В-ОЛЛ и В-лимфобластной лимфоме (TDT+). Во всех случаях клиническое течение характеризовалось быстрой прогрессией, продвинутыми стадиями заболевания, высоким уровнем ЛДГ, экстранодальными очагами поражения и низкой выживаемостью больных. Медиана выживаемости составила 6 месяцев.

**Заключение.** «Double-hit» лимфомы являются преимущественно экстранодальными агрессивными опухолями с определенными клиническими и морфологическими чертами ЛБ; преобладают женщины; средний возраст 56 лет; характеризуются химиорезистентностью и низкой выживаемостью больных.

Диагностика «Double-hit» лимфом возможна только на основании цитогенетического исследования. Цитогенетически характеризуются наличием первичного хромосомного нару-

шения (транслокации с вовлечением локусов BCL2/18q21, BCL6/3q27 или CCND1/11q13) и перестройками C-MYC, чаще с не-Ig хромосомными партнерами. Вторичные транслокации C-MYC могут выявляться как в момент установления диагноза, так и возникать в ходе болезни

(прогрессии/рецидиве) при отсутствии в дебюте у больных диффузной В-крупноклеточной лимфомой, фолликулярной лимфомой, В-острым лимфобластным лейкозом, В-лимфобластной лимфомой, лимфомой из клеток мантийной зоны и плазмоклеточными опухолями.

Овсепян В. А., Росин В. А., Баранчикова С. В.

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

### ВОЗМОЖНАЯ АССОЦИАЦИЯ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ ФЕРМЕНТОВ БИОТРАНСФОРМАЦИИ КСЕНОБИОТИКОВ С ХРОСОСОМНЫМИ НАРУШЕНИЯМИ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ЛИМФОЛЕЙКОЗЕ

Хронический лимфолейкоз (ХЛЛ) — опухольное заболевание системы крови с выраженной клинико-эпидемиологической гетерогенностью и вариабельностью ответа на терапию. Одними из важнейших факторов прогноза клинического течения ХЛЛ являются хромосомные нарушения лейкозных клеток. К настоящему времени выявлены наиболее часто встречающиеся при данном заболевании хромосомные aberrации: делеции длинных плеч 13 и 11 хромосом (del(13q14) и del(11q22), соответственно), делеция короткого плеча 17 хромосомы (del(17)(p13)) и трисомия 12 хромосомы. При этом установлено неблагоприятное прогностическое значение del(17)(p13), del(11)(q22) и комплексных хромосомных аномалий, в то время как отсутствие хромосомных нарушений и наличие del(13q14) в качестве единственной цитогенетической аномалии принято считать благоприятным прогностическим фактором при ХЛЛ.

В последние годы накапливается все больше данных, свидетельствующих о том, что определенный вклад в патогенез злокачественных новообразований, включая ХЛЛ, могут вносить также конституциональные особенности генома, в частности, полиморфизм ферментов генов биотрансформации генов ксенобиотиков (ФБК), участвующих в дезактивации (детоксикации) экзогенных и эндогенных генотоксикантов. Среди таких генов следует выделить, прежде всего, ген внепеченочного индуцибельного цитохрома P450 1A1 (CYP1A1) — фермента 1 фазы ФБК, активирующего полициклические ароматические углеводороды и ароматические амины, — и гены глутатион-S-трансфераз  $\mu$ 1 (GSTM1),  $\theta$ 1 (GSTT1) и  $\pi$ 1 (GSTP1) — ферментов 2 фазы ФБК, катализирующих конъюгацию

глутатиона с электрофильными группами широкого спектра ксенобиотиков и обеспечивающих благодаря этому нейтрализацию их действия, способного повредить геном. Неполноценные формы отмеченных ферментов, обусловленные полиморфизмом, являются возможным фактором, способным повысить внутриклеточный генотоксический фон и соответственно модулировать стабильность генома как на генном, так и на хромосомном уровнях.

В свете сказанного *целью настоящей работы* явилось исследование возможной ассоциации полиморфизма вышеуказанных генов ФБК с наиболее часто встречающимися типами хромосомных нарушений лейкозных клеток при ХЛЛ на момент постановки его диагноза.

В анализ были включены результаты исследований полиморфизма вышеуказанных генов и FISH-анализа 69 больных ХЛЛ (средний возраст 61,2 года). Материалом для исследования полиморфизма послужила ДНК, выделенная из гранулоцитов венозной крови больных стандартным методом фенольно-хлороформной экстракции. Детекцию делеционного полиморфизма генов *GSTM1* и *GSTT1* проводили методом мультиплексной ПЦР. Генотипирование же полиморфизмов *A2455G (Ile462Val)* и *A1578G (Ile105Val)* соответственно в генах *CYP1A1* и *GSTP1* выполняли методом ПЦР с последующим анализом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов.

Анализ наиболее часто встречающихся хромосомных нарушений у больных ХЛЛ проводился FISH-методом с помощью панели ДНК-проб (зондов), состоящей из 2 коктейлей: LSI p53/LSI ATM (SpectrumOrange/SpectrumGreen) и LSI D13S319/LSI 13q34/CEP 12 (SpectrumOrange/SpectrumAqua/SpectrumGreen).

Для FISH-анализа использовали препараты с множественными миниатюризованными зонами гибридизации, приготовленными согласно разработанному нами способу (Способ приготовления препаратов клеток для флуоресцентной *in situ* гибридизации: пат. RU 2 390 776 C1: МПК G01N 33/48, G01N 1/28 / Овсепян В.А., заявитель и патентообладатель ФГУ «КНИИГиПК ФМБА России». — №2410663; заявл. 14.09.2009; опубл. 27.01.2011, Бюл. №3. — 7 с.: ил.), значительно увеличивающим эффективность проведения множественных пространственно разобщенных гибридизаций.

В результате проведенного исследования впервые показана возможная ассоциация гомо-

зиготного носительства мажорного (полноценного) аллеля *GSTP1\*105Ile* с прогностически благоприятной моноаллельной интерстициальной делецией 13q14.3 при ХЛЛ, являющейся на момент диагностики единственным хромосомным нарушением в лейкозных клетках, встречающимся с частотой не превышающей 70% от общего количества проанализированных клеток. Среди больных с подобной делецией гомозиготы по мажорному аллелю *GSTP1\*105Ile* были обнаружены чаще, чем носители хотя бы 1 минорного (неполноценного) аллеля *GSTP1\*105Val* (35,7% против 64,3% у гомозигот по *GSTP1\*105Ile*  $\chi^2=4,09$ ,  $p<0,05$ ; OR = 3,40, 95% CI = 1,00-11,60).

*Овсепян В. А., Росин В. А., Лучинин А. С., Загоскина Т. П.*

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

### **ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ *CYP1A1*, *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1* И РАЗВИТИЕ ПЕРВИЧНОГО МИЕЛОФИБРОЗА**

Первичный миелофиброз (ПМФ) является клональным миелопролиферативным заболеванием (МПЗ), в основе развития которого лежит трансформация стволовых кроветворных клеток. Ежегодная заболеваемость ПМФ в разных странах составляет 0,5–1,5 случая на 100 000 населения. Генетических аномалий, характерных для ПМФ, не идентифицировано. У 45–70% больных ПМФ обнаруживается мутация *JAK2\* V617F*, выявляемая также при истинной полицитемии и эссенциальной тромбоцитемии. В то же время в последние годы появляется все больше данных, указывающих на то, что определенный вклад в патогенез злокачественных новообразований, включая МПЗ, могут вносить также конституциональные особенности генома, в частности, полиморфизм ферментов генов биотрансформации ксенобиотиков (ФБК), участвующих в дезактивации (детоксикации) широкого круга эндогенных и экзогенных веществ, способных повредить клеточный геном. К числу таких генов следует отнести, прежде всего, ген внепеченочного индуцибельного цитохрома P450 1A1 (*CYP1A1*) — фермента 1 фазы ФБК, активирующего полициклические ароматические углеводороды и ароматические амины, — и гены глутатион-S-трансфераз  $\mu 1$  (*GSTM1*),  $\theta 1$  (*GSTT1*) и  $\pi 1$  (*GSTP1*) — ферментов 2 фазы ФБК, катализирующих конъюгацию глутатиона с электрофильными группами широ-

кого спектра ксенобиотиков и обеспечивающих благодаря этому нейтрализацию их действия, способного повредить геном. Неполноценные формы отмеченных ферментов, обусловленные полиморфизмом, способны повысить внутриклеточный генотоксический фон и соответственно повысить генетическую нестабильность клетки.

**Целью настоящей работы** явилось изучение возможной ассоциации полиморфных вариантов вышеуказанных генов с развитием МПФ.

Материалом для исследования полиморфизма послужила ДНК, выделенная из мононуклеаров венозной крови 70 больных МПФ и 235 практически здоровых лиц (контрольная группа) стандартным методом фенольно-хлороформной экстракции. Детекцию делеционного полиморфизма генов *GSTM1* и *GSTT1* проводили методом мультиплексной ПЦР. Генотипирование же полиморфизмов *A2455G (Ile462Val)* и *A1578G (Ile105Val)* соответственно в генах *CYP1A1* и *GSTP1* выполняли методом ПЦР с последующим анализом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов.

Проведенное исследование не выявило статистически значимых различий в распределении частот полиморфных вариантов изучаемых генов ФБК среди больных ПМФ и здоровых лиц. Из данного факта следует, что полиморфизмы генов *CYP1A1*, *GSTM1*, *GSTT1* и *GSTP1*, скорее всего, не являются факторами риска развития ПМФ.

Петрова Е. В., Мартынкевич И. С., Козловская М. А., Мартыненко Л. С., Иванова М. П., Цыбакова Н. Ю.,  
Зюзгин И. С., Карягина Е. В., Грицаев С. В., Шабанова Е. С.,  
Абдулкадыров К. М.

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

## ОСОБЕННОСТИ И ПРОГНОСТИЧЕСКАЯ ЦЕННОСТЬ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ ПОВРЕЖДЕНИЙ У БОЛЬНЫХ ОМЛ И МДС

Острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) и миелодиспластический синдром (МДС) — гетерогенные заболевания, возникающие в результате злокачественной трансформации и нарушения дифференцировки гемопоэтических клеток на уровне миелоидных клеток-предшественниц. Наиболее частыми цитогенетическими нарушениями при ОМЛ и МДС являются цитогенетические aberrации, которые обнаруживаются до 80% случаев. Вместе с этим биологические свойства клеток патологического клона, эпигенетические изменения и повреждения генов у больных ОМЛ и МДС занимают важное место в определении прогностических особенностей заболевания.

**Целью нашего исследования** было изучение частоты, характера и прогностического значения молекулярно-генетических повреждений у больных ОМЛ и МДС.

**Результаты и обсуждение.** В исследование были включены 280 пациентов с de novo ОМЛ в возрасте от 11 до 86 лет (медиана 55 лет). Среди них было 146 (52,1%) женщин и 134 (47,9%) мужчины. По морфологическим вариантам ОМЛ больные распределялись следующим образом: с M0 вариантом — 10 (3,6%) пациентов, с M1 вариантом — 56 (20,0%) пациентов, с M2 вариантом — 82 (29,3%), с M3 вариантом — 29 (10,4%), с M4 вариантом — 58 (20,7%), с M5 вариантом — 19 (6,8%), с M6 вариантом — 12 (4,3%), с M7 вариантом — 1 (0,3%), недифференцированные — 13 (4,6%) больных. У всех пациентов было выполнено цитогенетическое исследование клеток костного мозга (анализ не менее 20 метафаз) и был установлен кариотип. Для определения мутаций в генах FLT3, KIT, NPM1 и NRAS использовали метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) с дальнейшей рестрикцией или прямым секвенированием. Для FLT3 рецептора исследовались 2 основных типа мутаций — внутренняя тандемная дупликация (FLT3-ITD) и точечная мутация в «А-петле» (FLT3-TKD); для KIT — инсерции 8 экзона, ITD 11 экзона, мутация D816V; инсерции в гене NPM1; мутации 12,13,61 кодонов NRAS. Мутации в генах FLT3 и

NPM1 были обнаружены у 90 из 280 обследованных пациентов (32,1%). Всего было выявлено 107 мутаций генов FLT3 и NPM1: 54 — FLT3-ITD, 21 — FLT3-TKD и 32 — в гене NPM1. У 73 (26,1%) пациентов были обнаружены одиночные мутации: у 41 (14,6%) пациента — FLT3-ITD, у 15 (5,6%) больного — FLT3-TKD и у 17 (6,1%) больных — в гене NPM1. У 17 больных мутации носили сочетанный характер: у 11 (3,9%) пациентов FLT3-ITD и в гене NPM1, у 4 (1,4%) больных FLT3-ITD и FLT3-TKD и у 2 (0,7%) больных FLT3-TKD и в гене NPM1. По результатам цитогенетического исследования пациенты были распределены на следующие группы: с нормальным кариотипом (благоприятный прогноз) — 151 пациент (53,9%), с комплексным кариотипом (3 и более хромосомные aberrации — неблагоприятный прогноз) — 39 больных (13,9%), с другими хромосомными aberrациями (группа с промежуточным прогнозом) — 90 пациентов (32,2%). Достоверно чаще ( $p=0,02$ ) мутации определялись у больных с нормальным кариотипом — у 57 (35,8%) из 151 изученных пациентов (у 44 пациента обнаружена одиночная мутация (24 — FLT3-ITD, 6 — FLT3-TKD и 14 — в гене NPM1) и у 13 — сочетанные мутации (8 — FLT3-ITD и в гене NPM1, 4 — FLT3-ITD и FLT3-TKD, 2 — FLT3-TKD и в гене NPM1)) и в группе промежуточного прогноза — у 28 (31,1%) из 90 больных. Тогда как в группе больных с комплексным кариотипом мутации были выявлены у 5 (12,8%) из 39 больных. В результате анализа общей выживаемости больных ОМЛ с нормальным кариотипом и FLT3-ITD было достоверно ( $p=0,012$ ) обнаружено неблагоприятное влияние данной мутации на прогноз течения заболевания.

Исследование наличия мутаций в гене KIT проводили у 128 пациентов с ОМЛ. Из них у 9 пациентов был поставлен диагноз СВФ-ОМЛ: 5 пациентов с t(8;21) и 4 пациента с inv16. Нами не были обнаружены мутации в 8 и 11 экзонах гена KIT в данной группе, точечная мутация D816V была найдена у 2 пациентов (что составило 1,6% от общего числа обследованных больных и 11,1% от числа больных с СВФ-ОМЛ).



У одного из пациентов с мутацией D816V при цитогенетическом исследовании была обнаружена t(8;21), что позволило отнести его к группе CBF-ОМЛ и рассматривать как вариант благоприятного прогноза. Несмотря на это у пациента было констатировано развитие раннего рецидива, что может служить основанием рассматривать мутации в гене KIT в качестве маркера неблагоприятного прогноза.

Исследование мутаций в гене NRAS проводили у 72 пациентов с ОМЛ. Мутации были обнаружены у 9 пациентов (12,5%): 4 (44,4%) мутации в 12 кодоне (у 1 пациента — G12A и у 3 больных — G12D) и 5 (45,6%) мутаций в 13 кодоне (G13D — у 2 больных, G13C — у 1 и G13V — у 2 пациентов). При анализе общей и безрецидивной выживаемости больных с и без мутаций в гене NRAS не было выявлено достоверно значимых отличий ( $p=0,075$  и  $p=0,105$ , соответственно).

Также были обследованы 97 пациентов с диагнозом de novo МДС, 51 женщина и 46 мужчин в возрасте от 20 до 85 лет (медиана 63 года). При изучении мутационного статуса у 15 (16,5%) из 97 обследованных пациентов были обнаружены

16 мутаций: 6 FLT3-ITD (6,2%), 1 FLT3-TKD (1,0%) и 9 NPM1 (9,3%). У одного больного (1,0%) были выявлены две мутации одновременно (сочетанные мутации) — в генах FLT3 (TKD) и NPM1. Достоверно чаще ( $p=0,041$ ) мутации определялись в группе больных с нормальным кариотипом и хромосомными aberrациями промежуточного риска (у 11 (16,4%) из 67 пациентов и у 3 (25,0%) из 12 больных, соответственно) по сравнению с пациентами с комплексным кариотипом (у 1 (5,6%) пациента из 18).

**Выводы.** Таким образом, мутации в генах FLT3 и NPM1 чаще определялись у больных ОМЛ и МДС в группе с нормальным кариотипом и промежуточным прогнозом по сравнению с группой пациентов с комплексным кариотипом. Мутации гена KIT чаще встречались у пациентов с благоприятным кариотипом, а обнаружение мутации D816V было связано с неблагоприятным исходом заболевания, риском прогрессии и резистентностью к проводимой терапии. Обнаружение мутаций в гене NRAS достоверно не являлось прогностическим маркером у больных ОМЛ.

*Пименова М. А., Паровичникова Е. Н., Кохно А. В., Домрачева Е. В., Манакова Т. Е., Сарибекян Р. А., Гальцева И. В., Савченко В. Г.*

*Федеральное государственное бюджетное учреждение «Гематологический научный центр»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва.*

### **ГЕМОПОЭТИЧЕСКИЕ И СТРОМАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ-ПРЕДШЕСТВЕННИЦЫ ПРИ МИЕЛОДИСПЛАСТИЧЕСКОМ СИНДРОМЕ (МДС): ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА**

**Введение.** Изучение цитогенетических аномалий клеток костного мозга представляет особую важность в понимании природы МДС, определении прогноза и, следовательно, выбора терапевтической тактики. Развитие МДС обусловлено клональным повреждением стволовой кроветворной клетки. С другой стороны, нарушение функции стромального микроокружения также может быть значимым в развитии заболевания.

**Цель.** Сравнить цитогенетические изменения в CD34+ гемопоэтических клетках предшественниках, полученных из костного мозга и периферической крови, и мезенхимальных стромальных клетках (МСК) у больных МДС.

**Пациенты и методы.** В работе представлены результаты обследования 42 пациентов в период с июля 2011 г. по декабрь 2012 г.: 35 пациентов с МДС (РА — 4, РСМД — 15,

РАКС — 2, РАИБ — 11, 5q-синдром — 3), 7 пациентов с трансформацией в ОМЛ; и 7 здоровых доноров костного мозга. Соотношение М/Ж составило 19/23. Медиана возраста — 60 лет (19–77). Цитогенетическое исследование выполнено методами G-дифференциального окрашивания хромосом (G-band) и флюоресцентной in-situ гибридизации (FISH).

**Результаты.** При стандартном цитогенетическом исследовании и методом FISH аномалии кариотипа клеток костного мозга выявлены у 21 (50%) из 42 пациентов. Наличие этих аномалий в CD34+ клетках, полученных путем магнитной сепарации из костного мозга и периферической крови, было подтверждено с помощью FISH анализа с использованием ДНК-зондов: LSI (5q33-q34), LSI (7q31)/CEP 7, CEP 8, LSI AML1/ETO, CEP X/CEP, Y, LSI (20q12) (Vysis Abbott, USA),

EVI t(3;3),inv(3)(3q26) Break Probe (Kreatech Diagnostics, Netherlands). Средние значения процента клеток, содержащих аномалии, статистически не различались и составили 62.7%, 69.2%, 70.5%, соответственно. Однако, у 3 пациентов были обнаружены значимые различия размеров патологического клона в общей популяции клеток костного мозга и CD34+ клетках: у 2 пациентов с изолированными del(5q) и моносомией 21 размеры клонов в клетках костного мозга были существенно меньше — 27% и 25%, чем в гемопоэтических предшественниках, в которых они составили 75% и 85%, соответственно; и у 1 пациента с моносомией 7 — наоборот, процент аномальных ядер в клетках костного мозга составил 60%, тогда как в CD34+ клетках клон определен в всего 26% ядер. Анализ кариотипа МСК проведен у 26 из 42 пациентов (МДС — 22, ОМЛ — 4). У 16 (38%) из 42 пациентов не удалось получить рост МСК в культуре вследствие ограниченной способности к пролиферации этих клеток у больных МДС. Выявлены структурные аномалии у 2 (9%) из 22 пациентов с МДС: у 1 пациента с конституциональной inv(9)(p13q21)

выявлена неклональная транслокация — 46XY,t(2;22)(p10;q11),inv(9)(p13q21)[1]/46XY,inv(9)(p13q21)[19] и у 1 пациента — клональная аномалия, 46XY,add(2q)[7]/46XY[13]. В клетках костного мозга у первого пациента определена только inv(3), у второго — комплексный кариотип. Было выполнено FISH исследование МСК у 12 пациентов с аномалиями кариотипа клеток костного мозга с использованием соответствующих ДНК-зондов, которое не выявило эти аномалии в МСК. У больных ОМЛ получен нормальный кариотип МСК. Кариотип МСК у всех здоровых доноров костного мозга был нормальный.

**Выводы.** В гемопоэтических и мезенхимальных клетках-предшественниках у пациентов с МДС определяются разные цитогенетические аномалии. Различия хромосомных аномалий, определяемых в этих клеточных популяциях, подтверждают, что клетки стромального микроокружения, в отличие от гемопоэтических предшественников, не являются частью патологического клона при МДС, однако демонстрируют генетическую нестабильность и могут играть важную роль в патогенезе развития заболевания.

Ромашевская И. П.<sup>1,2</sup>, Савва Н. Н.<sup>2</sup>, Литвинко Н. П.<sup>2</sup>, Алейникова О. В.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека, г. Гомель.

<sup>2</sup> Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии, г. Минск.

## МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ВТОРИЧНОГО ОСТРОГО МИЕЛОИДНОГО ЛЕЙКОЗА У ДЕТЕЙ

**Введение.** С середины 70-х годов прошлого столетия, когда впервые были описаны цитогенетические изменения при вторичном остром миелоидном лейкозе (ОМЛ), исследованиям в этом направлении уделяют большое внимание. По данным литературы, для общей группы вторичного ОМЛ наиболее характерны комплексные нарушения кариотипа и гипоплоидия, а также достоверно чаще встречаются такие цитогенетические поломки как моносомия 5 и 7, делеция 7q, абберации, вовлекающие 17p, моносомия 18 [5, 25]. В качестве поломок, характерных для вторичного ОМЛ описаны t(1;3), t(9;11), t(11;19), а также транслокации, вовлекающие 11q23. При этом нарушения кариотипа наиболее часто развиваются после использования химиотерапии (алкилирующих агентов или их комбинации с ингибиторами топоизомеразы II), чем после лучевой терапии (86% и 39% соответственно). При вторичном ОМЛ, развившемся после лечения при-

обретенной апластической анемии (ПАА) с использованием иммуносупрессивной терапии, в большинстве случаев наблюдается моносомия 7. По данным литературы, конверсия от нормального кариотипа к клональному у половины больных ПАА происходит в течение 2,5 лет, транзиторные поломки встречаются нечасто. При этом моносомия 7 и/или комплексные цитогенетические абберации предопределяют большинство смертей, связанных с вторичным ОМЛ. В отличие от *de novo* МДС, вовлечение хромосомы 5 и 20 при вторичном ОМЛ после ПАА встречается редко.

**Цель.** Изучить молекулярно-генетические особенности вторичного ОМЛ у детей в ракурсе сравнения с *de novo* ОМЛ.

**Материал и методы.** В исследование были включены 7 пациентов со вторичным ОМЛ, развившемся после терапии злокачественного новообразования или ПАА в детском возрасте, и 128

пациентов с *de novo* ОМЛ в возрасте до 18 лет включительно. Хромосомный анализ лейкоэмических клеток проводили на метафазных пластинках. Молекулярно-генетическое исследование для выявления химерных онкогенов (*SIL/TAL*, *PBX/E2A*, *MLL/AF4*, *AML1/ETO*, *BCR/ABL p210*, *p190*, *MLL1/ENL*) проводили методом мультиплексной полимеразной цепной реакции на биочипах. Статистический анализ выполнен при помощи программного обеспечения Statistica 6.0 с использованием методов непараметрической статистики.

**Результаты и обсуждение.** При сравнении результатов молекулярно-генетического исследования обнаружено статистически значимое ( $p=0,002$ ) превышение выявления моносомии 7 при вторичном ОМЛ (42,9%) в сравнении с *de novo* ОМЛ (4,7%), тогда как достоверность превышения общей патологии хромосомы 7 составила  $<0,0001$ . При вторичном ОМЛ встретился один случай редкой хромосомной аберрации —  $del(7q)(q22q34)$ .

Считается, что вторичный ОМЛ можно разделить на 2 основные группы. Первая — это М1-М2 лейкозы по морфологии, в большинстве случаев характеризующиеся повреждением хромосом 5 и/или 7 и развивающиеся в течение 3–7 лет после воздействия алкилирующих агентов или лучевой терапии, часто после предшествующей фазы миелодиспластического синдрома. Вторая группа — М4-М5 лейкозы, возникающие через

2–3 года после воздействия и ассоциирующиеся во многих случаях с транслокацией длинного плеча хромосомы 11 (11q23), приводящей к реаранжировке *MLL* гена, и использованием ингибиторов ДНК топоизомеразы II. В нашем исследовании только один пациент получал предшествующую противоопухолевую терапию с изолированным использованием ингибиторов топоизомеразы II, все остальные — в комбинации с алкилирующими агентами и/или ЛТ, при этом вышеуказанная закономерность четко не прослеживалась. Среди пациентов, у которых вторичный ОМЛ развился после терапии с использованием алкилирующих препаратов в сочетании с ингибиторами топоизомеразы II ( $n=2$ ) у 1 пациента была выявлена транслокация  $t(9;11)$  с аномалией региона 11q23 и у 1 — моносомия 7. После иммуносупрессивной терапии по поводу ПАА у всех 3 больных были зарегистрированы аномалии с вовлечением хромосомы 7 (моносомия 7 — у 2 пациентов, делеция 7q — у 1).

#### Заключение

При анализе распределения хромосомных аберраций обнаружено статистически значимое преобладание патологии хромосомы 7 в случае вторичного ОМЛ при сравнении с *de novo* ОМЛ ( $p<0,0001$ ). Полученные нами результаты подчеркивают важность изучения цитогенетических характеристик вторичного ОМЛ, поскольку именно они признаны решающими прогностическими факторами.

**Свешникова Ю. В., Парылова Е. А., Константинова Т. С., Мазеин Д. А., Стригалева М. В.**

Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Свердловской области «Областная клиническая больница № 1», областной гематологический центр, г. Екатеринбург.

### **ОПЫТ ДИАГНОСТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ ПАЦИЕНТА С ЛИМФОМОЙ БЕРКИТТА. СОВМЕСТНАЯ РАБОТА КЛИНИЦИСТОВ И ВРАЧЕЙ ЛАБОРАТОРИИ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИХ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ**

Лимфома Беркитта (ЛБ) — одна из наиболее агрессивных неходжкинских лимфом, развивающаяся из В-лимфоцитов и имеющая специфическую морфологическую, иммуногистохимическую, цитогенетическую картину. Лечение данного вида лимфомы проводят с помощью коротких блоков интенсивной высокодозной полихимиотерапии, +/- ритуксимаб. При локализованном варианте лимфомы, когда опухоль не распространяется за пределы лимфатической системы, результаты лечения успешны. Диагностирование у пациента поражения кост-

ного мозга (в 20–35% случаев), ЦНС (в 20–25% случаев) при ЛБ являются неблагоприятными прогностическими факторами: при быстром достижении клинко-гематологической ремиссии (чаще после первого блока ПХТ) высока вероятность рецидивов. В связи с этим продолжаются дебаты по тактике ведения пациентов с ЛБ IV стадии.

Представляем вашему вниманию пример успешного лечения пациента с диагностированной ЛБ IV В стадии в условиях нашего центра. Пациент Р. Г., 38 лет. С июля 2008 г. отмеча-

ет появление слабости, одышки, сердцебиение при минимальной физической нагрузке, поху-  
дание, боль в ребрах, костях диффузного харак-  
тера, тошноту, рвоту без связи с приемом пищи.  
Объективно: периферические л/у не увеличены,  
печень +2 см, селезенка +2 см в положении лежа  
на спине. По лабораторным и инструменталь-  
ным обследованиям выявлено следующее: ОАК:  
Нв-136 г/л, L-10,3\*10<sup>9</sup>/л, бл. 25%, миелоц. 2%,  
ю. 1%, п/я. 8%, с/я. 26%, эозин. 3%, лимф. 32%,  
мон. 3%, Tr-51\*10<sup>9</sup>/л, СОЭ-5 мм/час. Б/химия:  
о. белок 66,9 г/л, альбумин 45,7 г/л, АЛТ 35 Е/л,  
АСТ 69 Е/л, ЛДГ 3211 Е/л, ЩФ 113 Е/л, мочеви-  
на 11 ммоль/л, креатинин 207 мкмоль/л, глюкоза  
3,5 ммоль/л. Миелограмма — МиелоКЦ-180000/  
мкл, бл. — 93,2%, гранулоц — 2,0%, эритроц. —  
3,0%, лимф. — 1,0%, ИСН 4,0. Цитохимия —  
липиды не обнаружены в бластных клетках, гли-  
коген- не обнаружены в бластных клетках. При  
иммунофенотипировании выявлен следующий  
фенотип опухолевых клеток: CD19, CD22, CD20,  
CD10, CD79a, IgM s/cyt, Каппа s/cyt, CD38,  
Ki-67 в 87,1%. Цитогенетика: 47,XY,t(8;14)  
(q24;q32),dup(1)(q21q31),+1 [3]/46,XY,t(8;14)  
(q24;q32)[5]. УЗИ брюшной полости — S селезен-  
ки-70 см<sup>2</sup>, в остальном без патологии, R-графия  
легких, ребер — без патологии. ФГДС —  
поверхностный гастрит, бульбит. МРТ головного  
мозга — очаговой патологии не выявлено.

Пациенту установлен диагноз: Острый лимфо-  
бластный лейкоз BIV/ лимфома Беркитта, 47,ху,t  
(8;14)(q24;q32),dup(1)(q21;q31),+1/ 46,ху,t(8;14)  
(q24;q32).

**Лечение.** Программа ЛБ-М-04/ГНЦРАМН (че-  
редование блоков А и С) с предфазой циклофос-  
фаном и дексаметазоном, с профилактикой ней-  
ролейкимии (№ 5). Клинико-гематологическая  
ремиссия достигнута после 1 блока ПХТ (в к/м  
МЛКЦ-168000/мкл, бл. — 1,6%, ЛДГ — 235  
Е/л). После 4 блоков ПХТ в к/м МЛКЦ-10000/  
мкл, бл. — 7,0%, гранулоц. — 33,4%, эритроц. —  
36,8%, лимф. — 15,8%, ИСН 4,0, сохраняется  
транслокация (8;14).

**Проведено.** 5 блок ПХТ (блок А) с ритукси-  
мабом и HLA-типирование 4 братьев и сестры-  
выявлен возможный донор — брат, полностью  
идентичный по локусам HLA-A, B, DR, DQ.

После 5 блоков ПХТ и 1 введения ритукси-  
маба цитогенетика 46, XY [20]. Через 3 недели  
после окончания ПХТ клинически и лабора-  
торно диагностирован нейролейкоз: в ликворе  
220 кл/мкл (6-крупные неясные, 174-лимфо-  
идные, 8-моноциты, 2-лимфоциты, 30-нейтро-  
филы), белок 3,3 г/л. Проведено 5 люмбальных  
пункций с введением цитостатиков, ликвор са-  
нирован после 2-ой пункции.

В качестве дальнейшего консолидирующего  
лечения выбрано проведение аллогенной транс-  
плантации костного мозга от HLA-совместимого  
родственного донора — брата.

Кондиционирование в миелоаблативном режи-  
ме(милеран+циклофосфан).ПрофилактикаРТПХ:  
циклоспорин, метотрексат. Осложнения раннего  
восстановительного периода: энтеропатия I ст.

Оценка химеризма по антигенам эритроци-  
тов: +32 сутки — +46 сутки — эритроцитарная  
химера 25%, +54 сутки — эритроцитарная хи-  
мера 50%, +75 сутки — эритроцитарная химера  
75%, +117 сутки — эритроцитарная химера  
100% и далее 100% во всех исследованиях.

Определение химеризма по STR локусам ме-  
тодом фрагментного анализа: с +30 суток и далее  
определялся 100% донорский химеризм. Оценка  
проводилась по 16 STR локусам.

Оценка МОБ проводилась следующими мето-  
дами: морфология костного мозга, ИФТ, цитоген-  
етика, оценка ликвора.

В настоящее время на +1477 сутки у пациента  
сохраняется 100% донорский химеризм, марке-  
ров МОБ нет.

Успех лечения данного варианта высокоагрес-  
сивной, быстро растущей опухоли возможен  
только при совместной своевременной работе с  
клинико-диагностической лабораторией, в част-  
ности с лабораторией цитогенетических и моле-  
кулярно-генетических исследований.

Северина Н. А., Никитин Е. А., Обухова Т. Н., Бидерман Б. В., Кисилевичина Д. Г.,  
Наумова Е. В., Луговская С. А., Варламова Е. Ю., Капланская И. Б., Сидорова Ю. В., Почтарь М. Е.,  
Домрачева Е. В., Иванова В. Л., Ковалева Л. Г., Птушкин В. В., Судариков А. Б.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Гематологический научный центр»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва.

### ЗНАЧЕНИЕ ПОВРЕЖДЕНИЙ ГЕНА *TP53* У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ЛИМФОЛЕЙКОЗОМ

**Введение.** Режим терапии соматически сохраненных больных хроническим лимфолейкозом — FCR (флударабин, циклофосфан, ритуксимаб) позволил значительно увеличить продолжительность и качество жизни пациентов. Однако существует группа пациентов, около 10%, для которых режим FCR не эффективен и прогноз крайне неблагоприятен. Им необходимы альтернативные варианты терапии, назначаемые в первой линии. Настоящее исследование посвящено изучению молекулярных маркеров рефрактерности и сравнению клинико-лабораторных показателей, прогноза течения заболевания у больных с повреждением гена *TP53* (мутация *TP53* и/или делеция 17p) и без повреждения.

**Материалы и методы.** В исследование включено 79 первичных пациентов, получавших лечение в рамках протокола MLSG08. Медиана возраста больных составила 63 года (33–84 лет); 55% мужчин и 45% женщин. Проводилась оценка следующих прогностических маркеров: цитогенетических аберрацией методом FISH, мутационного статуса генов варибельного региона иммуноглобулинов, уровня  $\beta_2$ -микроглобулина, секреции свободных легких цепей, оценка минимальной остаточной болезни, анализ функциональной активности гена *TP53* методом FASAY (функциональный анализ разделенных аллелей в дрожжах). Принцип метода заключается в экспрессии мРНК опухолевого *TP53* в специальном штамме *S. cerevisiae*, имеющем ген биосинтеза аденина под контролем *TP53*-зависимого промотора. Если в результате синтезируется функционально-активный белок p53, то соответствующие дрожжевые колонии бесцветны. Экспрессия мутантного p53 приводит к окрашиванию колоний в красный цвет за счет накопления в них промежуточного продукта синтеза аденина. Соотношение бесцветных и красных колоний позволяет оценить долю мутантных мРНК гена *TP53* в образце опухолевых клеток. За границу, дискриминирующую случаи В-ХЛЛ с мутациями от таковых без мутаций было принято 23% красных колоний. Для подтверждения наличия мутации *TP53* проведено секвенирова-

ние кДНК больных, имеющих более 23% красных колоний.

**Результаты.** Распределение основных прогностических параметров соответствует выборке первичных больных, имеющих показания к началу терапии. Нарушения *TP53* были идентифицированы у 19 больных из 79: у 9 пациентов была выявлена делеция 17p и мутация *TP53*, у 10 пациентов только мутации *TP53*, 1 делеция 17p без мутации *TP53*. Сравнение клинико-лабораторных показателей пациентов с повреждением и без повреждения гена *TP53*: 95% больных имели высокий уровень бета-2-микроглобулина (более 4 мг/л), в группе без повреждения *TP53* — 60%. Доля больных, у которых гены иммуноглобулинов не содержали мутаций была одинакова в группах с повреждением *TP53* и без повреждения. Распределение хромосомных аберраций у пациентов без повреждения *TP53* не имело особенностей по сравнению с ХЛЛ, в целом. У пациентов с повреждением *TP53* вдвое реже выявлялась делеция 11q, втрое реже трисомия 12 хромосомы. Различий по полу и возрасту между группами не было. При медиане срока наблюдения за больными 24 месяца в группе больных с повреждением *TP53* умерло 7 пациентов из 19 (37%), а в группе без повреждения *TP53* — 5 из 60 (8%). Все смерти в группе больных с повреждением *TP53* были связаны с прогрессией. Медиана выживаемости в группе с повреждением *TP53* составила 27 месяцев. Медиана общей выживаемости в группе без повреждения *TP53* не достигнута ( $p < 0,0001$ ). У пациентов только с мутациями *TP53* без делеции 17p прогноз благоприятнее: в группе больных с только с мутациями *TP53* смертей не было, в то время как у больных с делециями медиана выживаемости составила 19,7 месяца ( $p = 0,0049$ ).

**Выводы.** Пациенты с повреждением гена *TP53* представляют собой биологически обособленную группу больных, для которой характерна рефрактерность к стандартной терапии и неблагоприятный прогноз. 10 пациентов, у которых были выявлены только мутации *TP53* соответствуют категории ХЛЛ наивысшего

риска: ответ на лечение неполный, а рецидив развивается рано. Исследование мутации *TP53* позволит выявить 40–60% пациентов с рефрактерностью к режиму FCR до начала терапии.

Пациенты с рефрактерностью без повреждения гена *TP53* могут иметь мутации в генах *NOTCH1*, *SF3B1*, *BIRC3*, что требует дальнейшего исследования.

Смирнихина С. А.<sup>1</sup>, Цаур Г. А.<sup>2</sup>, Лавров А. В.<sup>1</sup>, Яковлева Ю. А.<sup>2</sup>, Чельшева Е. Ю.<sup>3</sup>, Шухов О. А.<sup>3</sup>,  
Абдуллаев А. О.<sup>3</sup>, Судариков А. Б.<sup>3</sup>, Туркина А. Г.<sup>3</sup>, Куцев С. И.<sup>1,4\*</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение «Медико-генетический научный центр» Российской академии медицинских наук, Москва.

<sup>2</sup> Областная детская клиническая больница №1, Институт медицинских клеточных технологий, г. Екатеринбург.

<sup>3</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение «Гематологический научный центр» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва.

<sup>4</sup> Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва.

\* e-mail: kutsev@mail.ru

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АВТОМАТИЗИРОВАННОГО МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ *BCR-ABL* В МОНИТОРИНГЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ТЕРАПИИ ИНГИБИТОРАМИ ТИРОЗИНКИНАЗ У ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКИМ МИЕЛОИДНЫМ ЛЕЙКОЗОМ

**Введение.** Согласно рекомендациям European LeukemiaNet (ELN) пациентам с хроническим миелоидным лейкозом (ХМЛ), получающим терапию ингибиторами тирозинкиназ (ИТК) рекомендовано регулярное проведение молекулярного мониторинга методом количественной ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ). Недавно был предложен новый способ определения транскриптов *BCR-ABL* — автоматическая детекция на платформе GeneXpert Dx System. Автоматизация процессов выделения РНК, обратной транскрипции и постановки ПЦР-РВ позволяют стандартизовать преаналитический и аналитический этапы количественной детекции *BCR-ABL*. Использование тест-систем «Xpert *BCR-ABL* Monitor» позволяет привести полученные результаты в соответствие с международной шкалой (IS). Однако, на сегодняшний день проведено недостаточное количество сравнительных исследований по выявлению сходимости результатов, полученных автоматизированным и традиционными методами количественной ПЦР-РВ.

**Цель.** сравнение уровней экспрессии *BCR-ABL/ABL*, полученных автоматизированным и стандартными методами ПЦР-РВ.

**Материалы и методы.** В исследовании принимали участие 50 пациентов с ХМЛ, получающих терапию ИТК, с большим (БМО, n=10) и полным (ПМО, n=40) молекулярными ответами. Уровень экспрессии *BCR-ABL* оценивали с помощью GeneXpert Dx System (Cepheid, США) и стандартной количественной ПЦР-РВ с набором «АмплиСенс® Лейкоз Квант М-bcr-FRT» (ИнтерЛабСервис, РФ) с пересчетом результатов в % по международной шкале (%IS).

**Результаты.** Величина экспрессии *BCR-ABL/ABL* > 0,1%IS была выявлена у 2 из 50 пациентов обоими методами и не превышала 0,2%IS. БМО (0,01–0,1%IS) определен у 8 пациентов, ПМО<sup>4.0–6.0</sup> (0,0001–0,01%IS) определен также у 8 пациентов, отрицательные результаты получены у 14 пациентов обоими методами. Сходимость результатов составила 64% (32 из 50, корреляция Пирсона r=0,7927, p<0,00001). В 12 случаях GeneXpert показал большую чувствительность, по сравнению со стандартной методикой ПЦР-РВ. Применение GeneXpert позволило выявить 8 случаев ПМО<sup>4.0–6.0</sup> при отрицательном результате неавтоматизированного подхода. Медиана *BCR-ABL/ABL* в этой группе составила 0,004%IS (диапазон 0,00088–0,0074%IS). Кроме того, с помощью GeneXpert удалось выявить 4 случая БМО, в то время как стандартной методикой выявлялся ПМО. Однако полученные обоими методами результаты были близки по значению (0,005–0,009%IS для стандартной методики и 0,014–0,017%IS для GeneXpert). В 6 случаях результат GeneXpert оказался ниже, по сравнению с результатом неавтоматизированной методики: 4 отрицательных результата (в т. ч. 3 ПМО<sup>4.0–4.5</sup> и 1 БМО стандартной методикой, медиана 0,0031%IS) и 2 случая БМО, расцененные как ПМО<sup>4.0</sup> (медиана 0,026%IS). Возможно, такие результаты связаны с качеством образцов крови в связи с нарушениями температурного режима при транспортировке образцов.

**Заключение.** Полученные данные показывают достаточную сходимость результатов, полученных GeneXpert Dx System и количественной

ПЦР-РВ, для определения относительной экспрессии химерных транскриптов *BCR-ABL*. В 24% случаев GeneXpert оказался чувствитель-

нее стандартного метода, что позволяет использовать его для определения минимальных количеств *BCR-ABL* транскриптов.

*Содиқова Ш. Э.<sup>1</sup>, Муминов Ш. М.<sup>2</sup>, Абдуллаев Ш. М.<sup>2</sup>, Шамсутдинова Д. Б.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> Научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови, Министерство Здравоохранения Республики Узбекистан, г. Ташкент.

<sup>2</sup> Республиканский научный центр экстренной медицинской помощи Министерства здравоохранения Республики Узбекистан, г. Ташкент.

### **МОЛЕКУЛЯРНЫЙ АНАЛИЗ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ *MTGFР*, *FV* И *FII* У БОЛЬНЫХ С ТРОМБОЗОМ ГЛУБОКИХ ВЕН НИЖНЕЙ КОНЕЧНОСТИ**

В последние годы важное место в патогенезе тромбоза глубоких вен нижней конечности (ТГВНК) отводится наследственной тромбофилии, возникающей вследствие молекулярных дефектов в генах системы ингибирования свертывания крови.

**Целью данной работы** была оценка роли полиморфных маркеров генов *MTGFР* (С677Т), *FV* (G1691А) и *FII* (G20210А) в детерминации риска развития ТГВНК в узбекской популяции.

**Материалы и методы исследования.** Материалами для исследования явились образцы ДНК 79 больных с ТГВНК, наблюдавшихся в отделении сосудистой хирургии Республиканского научного центра экстренной медицинской помощи. Для контрольной группы приглашены 70 добровольцев (условно здоровые доноры) без каких-либо признаков тромбоза.

Образцы геномной ДНК выделяли из лейкоцитарной фракции в соответствии со стандартной методикой. Полиморфизм вышеуказанных генов тестировали методом ПЦР при помощи программируемого термоциклера фирмы Applied Biosystems-2720 (США). Визуализацию фрагментов ДНК проводили в проходящем ультрафиолетовом свете после окрашивания геля бромистым этидием.

Статистический анализ результатов проведен с использованием пакета статистических программ «OpenEpi 2009, Version 2.3».

**Результаты.** Оценка распределения аллелей и генотипов полиморфизма С677Т гена *MTGFР* среди больных и здоровых лиц не позволила выявить статистически значимые различия. Среди

больных с венозными тромбозами статистически незначимым оказалось преобладание носителей мутантного генотипа 677Т гена *MTGFР*. Согласно коэффициенту соотношения шансов риск развития тромбоэмболических осложнений у лиц при наличии данного аллеля более чем в 1.7 раза недостоверно выше ( $X^2=3.2$ ;  $P=0.07$ ;  $OR=1.7$ ; 95%CI 0.95–3.04), чем у лиц без него.

В результате исследования полиморфизма G1691А гена *FV* общая частота гетеро- или гомозиготного варианта мутантных генотипов (А/Г+А/А) у больных с ТГВНК составила 16.4%, а в группе условно здоровых — 2.8%, что соответствовало 6.7-кратному достоверному увеличению риска развития заболевания у его носителей ( $X^2=7.5$ ;  $P=0.006$ ;  $OR=6.7$ ; 95% CI 1.45–30.82).

Что касается гена фактора протромбина II, статистическая мощность исследованной выборки, оказалась недостаточной для установления значимой взаимосвязи между этим маркером и ТГВНК.

#### **Выводы.**

1. Наличие в генотипе G1691А гена *FV* у пациентов ассоциировано с 6.7-кратным увеличением риска развития венозного тромбоза ( $OR=6.7$ ), что доказывает высокую значимость данного полиморфизма, как молекулярного маркера, в формировании предрасположенности к венозному тромбозу и его осложнениям.
2. Выявлена не очень высокая самостоятельная роль полиморфизма С677Т гена *MTGFР* в развитии венозных тромбозов в узбекской выборке.

Стельмашенко Л. В., Мартынкевич И. С., Мартыненко Л. С., Бессмельцев С. С., Абдулкадыров К. М.

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

## ЧАСТОТА ВСТРЕЧАЕМОСТИ И ПРОГНОСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИХ АНОМАЛИЙ ПРИ МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМЕ (РЕЗУЛЬТАТЫ ПРОСПЕКТИВНОГО ИССЛЕДОВАНИЯ)

В настоящее время известно, что генетические аномалии лежат в основе развития и прогрессирования множественной миеломы (ММ). Для изучения генома опухолевой клетки применяется традиционный цитогенетический (ЦГ) анализ и флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH). Использование современных протоколов лечения больных множественной миеломой, а именно, применение ингибиторов протеасом, иммуномодуляторов, высокодозной химиотерапии с последующей трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток, диктует необходимость поиска прогностически значимых хромосомных aberrаций.

**Целью исследования** явилось изучение кариотипа и хромосомных аномалий при множественной миеломе, частоты встречаемости и влияние данных изменений на общую выживаемость больных.

**Материалы и методы.** В исследование включены 69 больных множественной миеломой, наблюдавшиеся в гематологической клинике «Российского НИИ гематологии и трансфузиологии» и получавшие различные режимы химиотерапии, с длительностью заболевания от 10 до 145 месяцев. Мужчин в исследуемой группе было 33, женщин — 36. Медиана возраста пациентов составила 58 лет (26–79 лет). С III стадией множественной миеломы было 35 больных, со II стадией — 34 пациента (Durie and Salmon). Распределение больных по различным иммунохимическим вариантам было следующим: MM IgG-36; MM IgA-17; MM B<sub>J</sub>-12; MM IgD-1 и с несекретирующим вариантом ММ-3 пациентов. Больные получали различные режимы химиотерапии, включающие комбинацию с ингибиторами протеасом, иммуномодуляторами, высокие дозы циклофосфана, алкерана и трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток.

Цитогенетическое исследование клеток костного мозга у больных было выполнено по стандартной методике. При исследовании методом флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH) использовали ДНК-зонды: LSI 13(RB1)13q14, IGH/CCND1, IGH/FGFR3, LSI Trp53(17p13.1) (Abbott).

**Результаты.** Кариологическое исследование выполнено у 61 больного. Из них нормальный кариотип определен у 56 исследуемых пациентов, что составило 91,8%, аномальный кариотип выявлялся у 5(8,2%) больных. При этом структурные перестройки кариотипа обнаружены у 3 из 5 исследуемых больных с кариотипами: 46,XY,del(8)(q24)[8]/46,XY[12]; 46,XX,del(8)(q24)[10], 46,XX,i(17)(q10)[2]/46,XX[18]. Высокоспецифичные для ММ хромосомные перестройки не определялись. У 2 из 5 пациентов при кариотипировании выявлена гипердиплоидия.

FISH исследование выполнено 51 больному, с помощью которого выявлялись t(11;14), del(13)(q14), (t(4;14)), del(17)(p13.1). Транслокация (t(4;14)) отмечена у 3-х пациентов из 43, что составило 7% случаев; t(11;14) у 8(17,8%) из 45 больных; del(13)(q14) — 11(21,6%) из 51 больных; причем, у 3-х пациентов обнаружены сочетанные варианты: t(11;14), del(13)(q14) и у 1 — t(4;14), t(11;14), соответственно. Делеция del(17)(p13.1) у 9 обследованных пациентов не выявлено. У 29(57%) пациентов методом FISH хромосомных аномалий не обнаружено. Таким образом, у 18(43%) больных выявлены генетические аномалии.

Достоверных различий между группами больных с различными генетическими aberrациями по общей выживаемости не получено. Однако медиана общей выживаемости в группе больных с del(13)(q14) составила 48 месяцев, тогда как, у пациентов с t(4;14), t(11;14) и нормальным кариотипом она не достигнута.

**Таким образом,** при использовании стандартного метода цитогенетического анализа аномальный кариотип выявляется только у 10% пациентов, тогда как методом FISH — у 43% больных множественной миеломой. Выявляемая (del(13)(q14)) при помощи FISH, является индикатором неблагоприятного прогноза. Эти данные согласуются с результатами многоцентровых рандомизированных исследований.



*Тарновский Р. В., Ковынев И. Б., Поспелова Т. И., Тамкович Н. В., Мишенин А. В.*

*Государственное бюджетное учреждение высшего профессионального образования «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск.*

## **БИОЧИПОВЫЕ (microarray) ТЕХНОЛОГИИ РАСПОЗНАВАНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ АНОМАЛИЙ У БОЛЬНЫХ ГЕМОБЛАСТОЗАМИ**

**Актуальность.** В основе развития гемобластозов (ГБ) лежат генетические изменения в клетке — предшественнице гемопоэза, что, в свою очередь, приводит к торможению процессов дифференцировки, нарушению механизмов регуляции клеточного цикла, блоку апоптоза и неконтролируемой пролиферации клеток. Эти изменения чаще всего связаны с различными хромосомными повреждениями. Наиболее перспективными методами молекулярно-генетической диагностики сегодня являются биочиповые (microarray)-технологии. В онкогематологии их использование позволяет одновременно выявлять широкий спектр клинически значимых генетических аномалий для определения прогноза и тактики лечения пациентов с гемобластозами (ГБ).

**Цель исследования.** С помощью молекулярно-генетического метода геночипирования определить наиболее характерные профили экспрессии химерных генов у больных бластными формами гемобластозов.

**Материал и методы.** На базе Городского гематологического центра г. Новосибирска обследовано 47 пациентов с бластными формами (ГБ): 38 больных с острым миелобластным лейкозом (ОМЛ), 9 пациентов с острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ). Средний возраст больных составил  $48 \pm 26,3$  лет. Все пациенты с впервые выявленным заболеванием были разделены на две прогностические группы. Критериями включения в группу неблагоприятного прогноза были: возраст (для ОМЛ старше 60, для ОЛЛ старше 15 лет), наличие множественных хромосомных aberrаций (в том числе Ph-позитивный ОЛЛ), наличие нейрорлейкемии (для ОЛЛ), гиперлейкоцитоз (более  $30 \cdot 10^9/\text{л}$ ). Таким образом, в группу с благоприятным прогнозом вошли 18 человек (38,3%), с неблагоприятным прогнозом — 29 человек (61,7%). В обеих группах с помощью метода геночипирования проведен анализ 96 образцов РНК костного мозга и периферической крови. Использовались тест-системы (матричные молекулярные биочипы) «ЛК-БИОЧИП» разработанные в институте молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта Российской Академии

Наук (Москва). На поверхности биочипов были иммобилизованы олигонуклеотиды, комплементарные участкам последовательностей матричной РНК, экспрессирующих химерные гены AML/ETO, E2A/PBX, BCR/ABL, PML/RARA, CBFB/MYH11, TEL/AML, MLL (общий), появляющиеся как результат хромосомных aberrаций t(8;21), t(1;19), t(9;22), t(15;17), inv16, t(12;21). Полученные данные об экспрессии указанных генов сопоставляли с эффективностью программной полихимиотерапии и прогнозом заболевания.

**Результаты исследования.** Генетические мутации в клетках костного мозга и периферической крови были выявлены в обеих группах больных. В группе с благоприятным прогнозом мутации выявлены у 9 пациентов (19,1%), в группе неблагоприятного прогноза у 20 больных, что составило 42,5%. В группе благоприятного прогноза наиболее часто встречались одиночные хромосомные aberrации, приводящие к повышенной экспрессии химерных генов — AML/ETO (у 8 пациентов с ОМЛ) и MLL (у 1 пациента с ОЛЛ). В группе пациентов с неблагоприятным прогнозом заболевания, в отличие от предыдущей группы, с частотой 22,5% отмечено наличие множественных генетических aberrаций с наиболее характерным профилем аномальных генов: MLL, AML/ETO, BCR/ABL и MLL, AML/ETO и TEL/AML (в 2 случаях наблюдалась одновременная экспрессия MLL, TEL/AML, в 3-х случаях — CBFB/MYH11, AML/ETO, у 2 пациентов наблюдалась одновременная экспрессия 3-х химерных генов MLL, AML/ETO и BCR/ABL; MLL, AML/ETO и TEL/AML, соответственно). Одиночные хромосомные aberrации (наиболее часто ген AML/ETO) отмечены у 10 больных (34%) с ОМЛ.

**Выводы.** У больных бластными формами ГБ с неблагоприятным течением заболевания и рефрактерностью к проводимой терапии достоверно чаще встречаются множественные генетические aberrации с наиболее частым профилем аномальных генов: MLL, AML/ETO, BCR/ABL и MLL, AML/ETO и TEL/AML, в отличие

от пациентов группы с благоприятным прогнозом заболевания, у которых преимущественно отмечаются одиночные генетические aberrации. Изучение генетического профиля опухоли ме-

тодом геночипирования позволяет более точно прогнозировать течение бластных форм гемобластозов и индивидуализировать тактику лечения пациентов.

*Ходулева С. А.<sup>1</sup>, Ромашевская И. П.<sup>2</sup>, Хартон Т. В.<sup>1</sup>, Демиденко А. Н.<sup>2</sup>*

<sup>1</sup> Учреждение образования «Гомельский государственный медицинский университет», г. Гомель, Республика Беларусь.

<sup>2</sup> Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека», г. Гомель, Беларусь.

## ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ И МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ОСТРОГО ЛИМФОБЛАСТНОГО ЛЕЙКОЗА У ДЕТЕЙ ГОМЕЛЬСКОЙ ОБЛАСТИ

С целью определения группы риска при первичной диагностике острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ) у детей в возрасте от 1 месяца до 18 лет было выполнено цитогенетическое (n=62) и молекулярно-биологическое исследование. С помощью С-дифференциальной окраски хромосом были выявлены числовые и структурные изменения хромосом у 27 пациентов, что составило 43,5%. Из них 22% детей на момент постановки диагноза находились в возрасте до одного года и старше 10 лет. Следует отметить, что в 11% случаев с цитогенетическими аномалиями диагностирован Т-клеточный вариант острого лимфобластного лейкоза, в то время как в группе пациентов без цитогенетических аномалий только в 3% случаев. Медиана инициального лейкоцитоза у пациентов с хромосомными аномалиями составила  $13,1(5,60^{25\%} — 20,57^{75\%}) \times 10^9/\text{л}$ , без хромосомных аномалий —  $8,4(3,83^{25\%} — 13,80^{75\%}) \times 10^9/\text{л}$ , достоверной значимости различий не выявлено (U=182,50; p=0,17). Цитогенетические аномалии хромосом у большинства детей с ОЛЛ носили числовой характер — 85%. Среди числовых изменений превалировала гипердиплоидия — в 78% случаев. Гипердиплоидия или ДНК-индекс > 1,16 по литературным данным отмечается у 20% детей старше года и независимо от инициального лейкоцитоза и возраста ассоциируется с хорошим прогнозом. ОЛЛ с гипоплоидией характеризуются common-иммунофенотипом бластных клеток и неблагоприятным прогнозом. В нашем исследовании гипердиплоидия в 27% случаев (n=5) проявлялась трисомией 21 пары хромосом, в 5,5% случаев — тетрасомией (+21). У 22% детей была выявлена трисомия (+14). Среди остальных числовых изменений встречались трисомии по различным парам хромосом (20, 12, 5, 22, 17 и др.). При гиподиплоидном на-

боре хромосом в 40% случаев встречалось полное отсутствие 18 хромосомы, что относится к неблагоприятным прогностическим признакам. В остальных случаях наблюдалось отсутствие хромосом группы С, Е и моносомия (-21). Среди структурных изменений хромосом (n=5) выявлены: в одном случае — транслокация **t(9;22)**, у четырех пациентов — различные делеции: del(5)(p12), в del(7)(p12) del(9)(p12) (p12) del(12)(p11). Во всех случаях структурные изменения ассоциировались с пре-В-клеточным вариантом.

Показатель выхода в ремиссию у детей, страдающих ОЛЛ с выявленными цитогенетическими аномалиями составил 92%, в то время как у пациентов без патологии со стороны хромосом — 97%, при этом летальность составила — 8% и 3% соответственно. Наиболее неблагоприятными в прогностическом плане среди цитогенетических аномалий явились: отсутствие 18 пары хромосом, ассоциированное с Т-линейным иммунофенотипом бластных клеток, возрастом старше 10 лет; del(12)(p11), ассоциированная с пре-В-клеточным вариантом и инициальным гиперлейкоцитозом.

Методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией молекулярно-генетические аномалии выявлены у 29% пациентов. В 60% случаев обнаружена **t(12;21)TEL/AML**, при этом преимущественно (83%) у детей в возрастной группе от 1 до 10 лет, и только в 17% случаев в возрасте старше 10 лет. Все дети с данной транслокацией имели В-клеточную иммунологию бластных клеток, причем пре-пре-В вариант, который относится к факторам с благоприятным прогнозом, встречался в 67%. Инициальный уровень лейкоцитов у всех пациентов был менее  $10 \times 10^9/\text{л}$ . Во всех случаях ОЛЛ с **t(12;21)TEL/AML** достигнута полная ремиссия, однако в 17% случаев диагностиро-

ван ранний костномозговой рецидив. Период наблюдения составил 10 лет. Транслокация t(9;22) BCR/ABL выявлена у 1 ребенка мужского пола, в возрасте 6 лет, бластные клетки имели В-клеточную природу (пре-В вариант). Анализ уровня инициального лейкоцитоза показал, что количество лейкоцитов было в пределах до  $30 \times 10^9/\text{л}$ . Достигнута полная ремиссия, период наблюдения составил 8 лет. Транслокация t(1;19) E2A/PBX1 диагностирована у двух детей. Все дети на момент постановки диагноза были старше 10 лет, иммунофенотип бластов в половине случаев соответствовал пре-пре-В

варианту, в половине — Т-клеточному варианту. Инициальный лейкоцитоз в 100% был в пределах  $10\text{--}30 \times 10^9/\text{л}$ . Несмотря на все неблагоприятные факторы, все дети достигли полной ремиссии. Период наблюдения от 2-х до 6 лет. Транслокация t(11;19)MLL/ENL выявлена в 10% случаев. Наличие t(11;19)MLL/ENL, ассоциированной с инициальным лейкоцитозом, Т-клеточным вариантом, мужским полом, возрастом до 2 лет может быть рассмотрена как неблагоприятный прогностический фактор, так как в данном случае наблюдалась резистентность к проводимой полихимиотерапии.

**Цаур Г. А.<sup>1,2</sup>, Попов А. М.<sup>1,2</sup>, Плеханова О. М.<sup>1</sup>, Кустанович А. М.<sup>3</sup>, Алейникова О. В.<sup>3</sup>, Гиндина Т. Л.<sup>4</sup>, Демина А. С.<sup>1,2</sup>, Друй А. Е.<sup>1,2,5</sup>, Ковалев С. Ю.<sup>6</sup>, Кондратчик К. Ю.<sup>7</sup>, Мисюрин А. В.<sup>8</sup>, Мякова Н. В.<sup>8</sup>, Ригер Т. О.<sup>1,2</sup>, Савельев Л. И.<sup>1,2,5</sup>, Сокова О. И.<sup>9</sup>, Стренева О. В.<sup>1,2</sup>, Сучкова М. В.<sup>10</sup>, Финашуткина Ю. П.<sup>8</sup>, Флейшман Е. В.<sup>9</sup>, Шориков Е. В.<sup>1,2</sup>, Юцкевич Р. И.<sup>3</sup>, Meyer С.<sup>11</sup>, Marschalek R.<sup>11</sup>, Фечина Л. Г.<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup> Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Свердловской области «Областная детская клиническая больница № 1», Екатеринбург, Россия.

<sup>2</sup> Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Свердловской области «Институт медицинских клеточных технологий», Екатеринбург, Россия.

<sup>3</sup> Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии», Минск, Беларусь.

<sup>4</sup> «Институт детской гематологии и трансплантологии имени Р. М. Горбачевой» Государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова», Санкт-Петербург, Россия.

<sup>5</sup> Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Уральская государственная медицинская академия», Екатеринбург, Россия.

<sup>6</sup> Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Уральский Федеральный университет имени первого Президента России Б. Н. Ельцина», Екатеринбург, Россия.

<sup>7</sup> Морозовская детская городская клиническая больница Департамента здравоохранения г. Москвы, Москва, Россия.

<sup>8</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии Министерства здравоохранения России имени Д. Рогачева», Москва, Россия.

<sup>9</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский онкологический научный центр им. Н. Н. Блохина РАМН», Москва, Россия.

<sup>10</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение «Гематологический научный центр Министерства здравоохранения России», Москва, Россия.

<sup>11</sup> Diagnostic Center of Acute Leukemia, Institute of Pharmaceutical Biology / ZAFES, Goethe-University of Frankfurt, Франкфурт-на-Майне, Германия.

## **ТРАНСЛОКАЦИЯ t(1;11)(p32;q23) С ОБРАЗОВАНИЕМ ХИМЕРНОГО ГЕНА MLL-EPS15 ПРИ ОСТРЫХ ЛЕЙКОЗАХ У ДЕТЕЙ И ВЗРОСЛЫХ**

Транслокация t(1;11)(p32;q23) с образованием химерного гена *MLL-EPS15* выявляется примерно в 3% случаев от общего числа перестроек гена *MLL*. На основании собственных исследований (6 пациентов) и данных литературы (27 случаев) нами проведена клиничко-лабораторная характеристика острых лейкозов с транслокацией t(1;11)(p32;q23)/*MLL-EPS15*. Установлено, что наиболее часто транслокация t(1;11)(p32;q23) обнаруживается у детей первого года жизни (медиана возраста — 9 мес). При остром лимфобластном лейкозе лица мужского пола болеют реже (соотношение 1:3), при остром миелоидном лейкозе соотношение полов 1:1. Транслокация t(1;11)(p32;q23) как единственная аномалия кариотипа лейкозных клеток выявлена в 20 из 32 случаев с инфор-

мативным цитогенетическим исследованием (59%). Дополнительные хромосомные аномалии (ДХА) в опухолевых клетках пациентов с наличием t(1;11)(p32;q23) и информативным цитогенетическим исследованием выявлены у 12 из 32 пациентов (38%). В трех случаях обнаружены только количественные ДХА, в шести — только структурные; в трех случаях — сочетание количественных и структурных. Наиболее частой количественной ДХА являлась трисомия 8 (3 случая). Комплексный кариотип обнаружен у 4 из 11 пациентов (36%) с ОМЛ и транслокацией t(1;11)(p32;q23). Наиболее часто зоной разрывов в ДНК гена *EPS15* является интрон 1. Описано 4 типа химерных транскриптов *MLL-EPS15*. Создана и успешно применена комбинация праймеров, флуоресцентных зондов и плазмиды для

мониторирования химерного транскрипта *MLL-EP315* методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. Подобраны условия и проведен мониторинг минимальной остаточной болезни по индивидуальным точкам разрыва в геномной ДНК у пациентов с наличием химерного гена *MLL-EP315*. Сравнение данных определения минимальной остаточной болезни в геномной ДНК и кДНК показало высокую качественную сопоставимость результатов (92%). Прогностическое значение  $t(1;11)(p32;q23)$  / *MLL-EP315* проанализировано у 18 пациентов

с известными исходами заболевания (12 с ОЛЛ, 6 с ОМЛ). Общая выживаемость (ОВ) составила  $0,37 \pm 0,12$  с медианой наблюдения 38 мес. (диапазон 5–140 мес.), а бессобытийная выживаемость (БСВ) —  $0,33 \pm 0,11$ . ОВ и БСВ в исследуемой группе не зависели от типа ОЛ и возраста пациентов. Однако при более детальном разделении на группы было показано, что ОВ и БСВ в группе мальчиков с ОЛЛ младше 1 года были достоверно ниже, чем у девочек с ОЛЛ этой же возрастной группы ( $0$  и  $0,64 \pm 0,21$   $p=0,033$ ;  $0$  и  $0,46 \pm 0,18$   $p=0,049$ , соответственно).

Черных Ю. Б.<sup>1</sup>, Шушанов С. С.<sup>2</sup>, Рыбалкина Е. Ю.<sup>2</sup>, Трифонова Е. В.<sup>1</sup>, Высоцкая Л. Л.<sup>1</sup>, Седов К. В.<sup>1</sup>, Белоусов К. А.<sup>1</sup>, Клинушкина Е. Ф.<sup>1</sup>, Катаева Е. В.<sup>1</sup>, Дудина Г. А.<sup>1</sup>, Луцкая Т. Д.<sup>1</sup>, Митина Т. А.<sup>1</sup>, Голенков А. К.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Московской области

«Московский областной научно-исследовательский клинический институт имени М. Ф. Владимирского», Москва.

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский онкологический научный центр имени Н. Н. Блохина» Российской академии медицинских наук, Москва.

### ИССЛЕДОВАНИЕ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ МНОЖЕСТВЕННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ У РЕЗИСТЕНТНЫХ ПАЦИЕНТОВ С МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМОЙ

Множественная лекарственная устойчивость является закономерным событием в развитии солидных и гематологических опухолей существенно влияющим на непосредственные и отдаленные результаты лечения. В связи с этим возникает интерес к исследованию этой проблемы при множественной миеломе (ММ), которая характеризуется выраженными клиническими признаками опухолевой прогрессии, главным из которых является отсутствие или потеря ответа на проводимое противоопухолевое лечение. Целью нашей работы было определение экспрессии мРНК генов, ответственных за развитие множественной лекарственной устойчивости (МЛУ), таких как *MDR1*, *MRP1*, *LRP*, *BCRP* при множественной миеломе (ММ) у резистентных пациентов до начала терапии бортезомиб-содержащими программами.

Исследовалась группа из 16 больных (9 мужчин и 7 женщин) с множественной миеломой III стадии. Возраст пациентов составлял от 52 до 78 лет. Изучение экспрессии генов проводили в клетках мононуклеарной фракции костного мозга, содержащей плазматиты, выделенной из аспирата костного мозга. С этой целью клетки костного мозга наслаивали на 3 мл Ficoll и центрифугировали при 1500 об/мин 30 мин., после чего на границе раздела фаз отбирали мононуклеары. Далее отобранные клетки переносили в

пробирку с 8 мл раствора Эрла и пересаждали центрифугированием при 1500 об/мин 10 мин. и отмывали в 2–3 мл раствора Эрла. К осадку клеток добавляли 1 мл тризола (Trizol, “Sigma”, США). Процедуру выделения РНК проводили согласно стандартному протоколу. Экспрессию мРНК исследуемых генов определяли полуколичественным методом ОТ-ПЦР (полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией). Синтез кДНК с матрицы РНК и реакцию амплификации проводили на амплификаторе «Терцик» («ДНК-технология», Россия). Продукты реакции ОТ-ПЦР анализировали с помощью электрофореза в 2% агарозном геле с добавлением 0,5 мкг/мл бромистого этидия. Размеры фрагментов оценивали в соответствии с расположением полос маркерной ДНК, а их интенсивность оценивали денситометрированием с использованием компьютерной программы Scion Image. Для удобства и наглядности уровень экспрессии мРНК исследуемых генов представлены в виде знаков «+» и «-». При этом, «-» означает, что экспрессия гена отсутствует; «+» — слабая экспрессия гена (отчётливо видимая полоска в агарозном геле); «++», «+++», «++++» — экспрессия гена повышена (++ — в 2 раза, +++ — в 3 раза и более раз).

Экспрессия мРНК генов *MDR1*, *MRP1*, *BCRP* была выявлена у 16/16 (100%) больных ММ. мРНК гена *LRP* была выявлена у 13/16 (81%) боль-

ных. Несмотря на то, что все пациенты на момент исследования были клинически резистентными к стандартной (не содержащей бортезомиб) химиотерапии, уровень экспрессии генов МЛУ у них заметно различался: от минимального уровня экспрессии по четырем вышеуказанным генам 3+ до максимально выявленного уровня экспрессии по четырем генам 14+. Среднее значение уровня экспрессии по четырем генам МЛУ составило 6,375+. Исходя из этого, нами было выделено 2 группы пациентов: с уровнем экспрессии выше среднего (5 наблюдений) и уровнем экспрессии генов МЛУ ниже среднего (11 наблюдений). Анализ выживаемости в этих группах пациентов показал, что в группе с уровнем экспрессии выше среднего

медиана выживаемости составила 34 месяца, а в группе пациентов с уровнем экспрессии генов МЛУ ниже среднего — 63 месяца.

*Таким образом*, в ходе нашего исследования было установлено, что у пациентов резистентных к стандартной полихимиотерапии мРНК генов МЛУ *MDR1*, *MRP1*, *BCRP* экспрессировались в 100% случаев, а мРНК гена *LRP* в 81% наблюдений (у 13 из 16 исследуемых пациентов). Медиана выживаемости в группах пациентов с уровнем экспрессии мРНК генов МЛУ выше и ниже среднего существенно различается и составляет 34 месяца в группе с уровнем экспрессии выше среднего и 63 месяца в группе пациентов с уровнем экспрессии генов МЛУ ниже среднего.

*Якутик И. А., Аль-Ради Л. С., Бидерман Б. В., Никитин Е. А., Судариков А. Б.*

*Федеральное государственное бюджетное учреждение «Гематологический научный центр Министерства здравоохранения Российской Федерации», Москва.*

### **МУТАЦИЯ *B-RAFV600E* У БОЛЬНЫХ ЛИМФОПРОЛИФЕРАТИВНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ**

**Введение.** Волосатоклеточный лейкоз (ВКЛ) — хроническое В-лимфопролиферативное заболевание, составляющее около 2% от общего числа лейкозов. Несмотря на то, что в большинстве случаев существующие методики диагностики и лечения данного заболевания показывают высокую эффективность, некоторые пациенты с ВКЛ оказываются резистентными к такому лечению. Вариантная форма ВКЛ (в-ВКЛ) — В-клеточная неоплазия, составляющая около 10–20% случаев ВКЛ. В-ВКЛ характеризуется значительно более слабым ответом на стандартные методы терапии по сравнению с классической формой ВКЛ (к-ВКЛ). Таким образом, поиск новых терапевтических мишеней и диагностических маркеров ВКЛ остается актуальной. В июне 2011 было опубликовано первое сообщение о 100% встречаемости мутации гена *B-RAF*, приводящей к аминокислотной замене *V600E* у больных к-ВКЛ.

**Материалы и методы.** В данном исследовании использовалась геномная ДНК, выделенная из образцов периферической крови и аспиратов костного мозга пациентов с ВКЛ и другими лимфопролиферативными заболеваниями. Исследование включало 28 случаев к-ВКЛ, 12 случаев в-ВКЛ, 8 случаев лимфомы маргинальной зоны селезенки (ЛМЗС) и 9 случаев хронического лимфоцитарного лейкоза (ХЛЛ). Постановка диагноза основывалась на общепри-

нятых стандартных критериях, включающих исследование иммунофенотипа. Выявление мутации *B-RAF<sup>V600E</sup>* осуществлялось с помощью двух методик: прямое секвенирование 15 экзона гена *B-RAF* и аллель специфичная ПЦР-РВ с LNA-модифицированными праймерами и пробами.

**Результаты и обсуждение.** По результатам прямого секвенирования 15 экзона гена *B-RAF* мутация *V600E* была выявлена у всех пациентов с к-ВКЛ с достаточным количеством лейкозных клеток в образце (11/11 — 100%), а также у 5 (83%) пациентов с в-ВКЛ. Ни в одном случае ХЛЛ или ЛМЗС мутация обнаружена не была. Принимая во внимание тот факт, что прямое секвенирование является надежным, но не достаточно чувствительным методом, позволяющим обнаруживать гетерозиготные мутации в образцах содержащих не менее 20% клеток несущих мутацию. А также учитывая, что образцы, получаемые от пациентов с к-ВКЛ, часто содержат малые количества лейкозных клеток вследствие лейкопении или фиброза костного мозга, мы решили использовать аллель специфичную ПЦР-РВ с LNA-модифицированными праймерами и пробами. По результатам ПЦР мутация *B-RAF<sup>V600E</sup>* была выявлена у всех исследованных пациентов с к-ВКЛ (28/28-100%), а также у 10 (83%) пациентов с в-ВКЛ (см. Таблицу). Примечательно, что независимо от

диагностического критерия для в-ВКЛ, будь то лейкопения либо отсутствие экспрессии CD25, значительная часть пациентов оказывалась мутированной.

Таблица.

	Прямое секвенирование		Аллель специфичная ПЦР-РВ	
	В-RAF(+)	В-RAF(-)	В-RAF(+)	В-RAF(-)
к-ВКЛ	11 (100%)	0 (0%)	28 (100%)	0 (0%)
в-ВКЛ (лейкопения)	5 (83%)	1 (17%)	10 (83%)	2 (17%)
в-ВКЛ (CD25-)	6 (100%)	0 (0%)	7(100%)	0 (0%)
ЛМЗС	0 (0%)	8 (100%)	0 (0%)	8 (100%)
ХЛЛ	0 (0%)	9 (100%)	0 (0%)	9 (100%)

**Выводы.** Был разработан простой, быстрый и чувствительный метод для детекции мутации В-RAF<sup>V600E</sup>. Была подтверждена ее 100% встречаемость у больных к-ВКЛ. Данная активирующая мутация играет, несомненно, важную роль в патогенезе ВКЛ и может использоваться в качестве критерия при дифференциальной диагностике в сочетании с гистологическими, морфологическими и иммунофенотипическими характеристиками. Наличие мутации в значительной

доле случаев в-ВКЛ противоречит ранее опубликованным данным и может служить доказательством несовершенства существующей системы критериев для диагностики в-ВКЛ. Отсутствие мутации В-RAF<sup>V600E</sup> в 100% случаев лимфомы маргинальной зоны селезенки и ХЛЛ доказывает целесообразность применения данного маркера при дифференциальной диагностике между к-ВКЛ и другими В-клеточными лимфомами и лейкозами.

## ИММУНОГЕНЕТИКА В ГЕМАТОЛОГИИ

Бидерман Б. В., Хамаганова Е. Г., Якутик И. А., Сударииков А. Б.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Гематологический научный центр Министерства здравоохранения России», Москва.

### ТИПИРОВАНИЕ ГЕНОВ *HLA-A\*/B\*/C\*/DRB1\*/DQB1\** МЕТОДОМ *PCR-SBT* У ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ С ПОКАЗАНИЯМИ К АЛЛОГЕННОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТЕВЛОВЫХ КЛЕТОК

PCR-SBT (sequence based typing) — метод секвенирования ДНК, позволяющий напрямую определить первичную последовательность типизируемого гена того или иного локуса HLA (от англ. Human Leukocyte Antigens). Количество вновь открываемых HLA-аллелей постоянно увеличивается, для выявления вновь открываемых HLA-аллелей должна постоянно расти панель олигонуклеотидных проб при типировании методом PCR-SSOP (sequence specific oligonucleotide probes) или панель праймеров при типировании методом PCR-SSP (sequence specific primers). Только секвенирование дает возможность выявить новый аллель, к которому еще нет олигонуклеотидных зондов или праймеров, и избежать ошибки, неизбежной в данном случае при использовании методов PCR-SSOP или PCR-SSP. PCR-SBT особенно важен при подборе пар донор-реципиент при неродственной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК), поскольку от HLA-идентичности больного и донора во многом зависит исход трансплантации. Секвенирование генов HLA, в отличие от других методов HLA-генотипирования, позволяет проводить определение аллельных вариантов генов главного комплекса гистосовместимости (у человека — HLA) путем прямого сравнения первичных последовательностей нуклеотидов в цепочке ДНК анализируемого образца с консенсусной последовательностью нуклеотидов в соответствующем гене HLA в базе данных. Основной проблемой при PCR-SBT является правильное разрешение так называемых неоднозначностей, возникающих вследствие гетерозиготности генов HLA, когда не ясно к какому именно из двух HLA гаплотипов относится данный нуклеотид. Этой проблемы можно избежать, используя вариант аллельспецифичного секвенирования.

В ФГБУ ГНЦ Минздрава России проведено типирование методом аллельспецифичного PCR-SBT на наборах «Protrans» (Germany): Protrans S4 (локусы *HLA-A\*/B\*/C\*/DRB1\**) и Protrans S3 (*HLA-DQB1\**) 20 больных с показаниями к аллогенной ТГСК, у которых связи с отсутствием

HLA-идентичного сибса, планировалось проведение неродственной ТГСК. Также типирование методом PCR-SBT было проведено у одной HLA-идентичной пары больной-брат для подтверждения HLA-геноидентичности; и у одной пары больной-брат, где было неизвестно, являются ли больной и донор HLA-геноидентичными. В одном случае секвенирование использовалось для подтверждения носительства аллеля *B\*15:10*, установленного ранее при типировании методом PCR-SSP с праймерами «Invitrogen» (USA). При типировании локусов HLA класса 1 проводилось секвенирование экзонов 2 и 3, при типировании локусов HLA класса 2 — экзона 2.

Во всех случаях типирования методом PCR-SBT Protrans S4 (S3 для *DQB1*) получены результаты на уровне «высокого разрешения», т. е. с четырьмя цифрами и выше. Секвенирование 2 и 3 генов класса 1 и экзона 2 генов класса 2 в большинстве случаев дало возможность провести типирование на уровне стрингов аллелей, имеющих одинаковые нуклеотидные последовательности экзонов, кодирующих пептидсвязывающие домены молекул HLA, т. е. с маркировкой *G*, например, *A\*03:01:01G*, *B\*15:01:01G* и т.д.

Секвенирование локуса *B* методом PCR-SBT Protrans S4 у пациентки с *B\*15:10* (*B71*) подтвердило носительство этого редкого для нашей популяции аллеля, более характерного для популяций субсахарского региона Африки (результат секвенирования *B\*15:10:01G*). Таким образом, секвенирование методом PCR-SBT на наборах «Protrans» (Germany): Protrans S4 (локусы *HLA-A\*/B\*/C\*/DRB1\**) и Protrans S3 (*HLA-DQB1\**) дало возможность провести HLA-типирование больных, нуждающихся в аллогенной ТГСК от неродственного донора, на соответствующем уровне, отвечающем современным требованиям для HLA-типирования при неродственной ТГСК. К недостаткам метода можно отнести его относительную трудоемкость и дороговизну по сравнению с другими распространенными методами ДНК-типирования (PCR-SSOP и PCR-SSP).

Бутина Е. В.<sup>1</sup>, Зайцева Г. А.<sup>1</sup>, Ёлов А. А.<sup>2</sup>, Матрохина О. И.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров.

<sup>2</sup> Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации», Москва.

### ТИПИРОВАНИЕ ГЕНОВ НРА У ДОНОРОВ ТРОМБОЦИТНЫХ КОНЦЕНТРАТОВ

Хорошо известно значение антигенов системы НРА (Human Platelet Antigens) в трансфузиологии (при развитии рефрактерности к трансфузиям тромбоцитов), акушерстве (при иммунной тромбоцитопении плода и новорожденного) и трансплантологии (в качестве «метки» при проведении алломиелотрансплантации). Оказание адекватной трансфузиологической помощи больным, нуждающимся в переливаниях НРА-совместимых тромбоцитных концентратов, невозможно без НРА-генотипирования доноров компонентов крови.

С целью расширения регистра доноров, типированных по основным антигенным системам клеток крови, было проведено исследование НРА-генотипа у 181 активного донора компонентов крови СПК института. Анализ осуществлялся с использованием отечественной тест-системы для ПЦР в реальном времени с флуоресцентными зондами, ориентированными на нуклеотидные замены, определяющие а- и b-формы тромбоцитарных антигенов (ТромбоГенТест, РУ № ФСР 2011/12472). Частота встречаемости генов системы НРА представлена в таблице.

Таблица.

Аллельные сочетания	Локусы системы НРА					
	НРА-1	НРА-2	НРА-3	НРА-4	НРА-5	НРА-15
aa	70,0	79,4	30,7	100,0	84,4	24,9
ab	25,6	20,0	50,0	0	15,0	49,2
bb	4,4	0,6	19,2	0	0,6	26,0

Наиболее распространенными в популяции явились генотипы:

- НРА-1aa, -2aa, -3ab, -4aa, -5aa, -15ab (12,6%),
- НРА-1aa, -2aa, -3aa, -4aa, -5aa, -15ab (7,9%),
- НРА-1aa, -2ab, -3ab, -4aa, -5aa, -15ab (7,9%),
- НРА-1aa, -2aa, -3ab, -4aa, -5aa, -15bb (7,3%),
- НРА-1aa, -2aa, -3ab, -4aa, -5aa, -15aa (6,0%).

У лиц, имеющих в генотипе аллельное сочетание НРА-15bb, относительно чаще выявлялось гомозиготное носительство гена НРА-1b (НРА-1bb) — в 8,5% случаев, по сравнению с донорами, содержащими в генотипе сочетание генов НРА-15aa или НРА-15ab, у ко-

торых встречаемость НРА-1bb составила 3,0% (p=0,24).

Параллельно с проведением НРА-типирования у всех доноров компонентов крови были исследованы антигены HLA I класса и антигены эритроцитов систем АВ0, Резус, Келл, MNSs. В банк криоконсервированных компонентов крови института направлено на длительное хранение 705 единиц тромбоцитных концентратов, заготовленных от 46 доноров, типированных по системе НРА. В том числе 67 единиц концентратов тромбоцитов, полученных от доноров, гомозиготных по антигену НРА-1b.



Ключников Д. Ю.<sup>1</sup>, Трусова Л. М.<sup>2</sup>, Тюмина О. В.<sup>2</sup>, Волчков С. Е.<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Некоммерческое партнерство «Регистр доноров кроветворных клеток и пуповинной крови».

<sup>2</sup> Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Самарской области «Клинический центр клеточных технологий», г. Самара.

## СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ ПОДБОРА ГИСТОСОВМЕСТИМЫХ ПАР ДОНОР-РЕЦИПИЕНТ В РЕГИСТРЕ ДОНОРОВ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТОК

Аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток для лечения гематологических и иммунных заболеваний применяется в мировой практике уже давно, но основной проблемой по-прежнему, остается поиск совместимого донора. Однако, не более 30% пациентов, нуждающихся в трансплантации гемопоэтических стволовых клеток, имеют совместимого потенциального родственного донора. Остальным больным показана неродственная трансплантация для которой требуется донор, гистосовместимый (тканесовместимый) с пациентом по HLA-системе. Но ввиду ее полиморфности, подходящего донора найти чрезвычайно сложно. На сегодняшний день по HLA-A насчитывается 1,571 антигенов, по HLA-B — 2,156, по HLA-C — 1,252, по HLA-DRB1 — 1,030, и по HLA-DQB1 — 137. Такое большое количество антигенов создает невероятно большое количество HLA-типов. В нашей стране проживает около 180 национальностей, подобное разнообразие генотипов весьма затрудняет подбор донора. Проблему поиска подходящего донора призвано решить создание в России Регистра доноров костного мозга.

Эффективность поиска донора в первую очередь обусловлена стратегией поиска, выбранной регистром. Согласно мировой практике, в первую очередь проводится поиск донора среди ближайших родственников, затем, в случае отрицательного результата, в национальном регистре, после чего в международной базе. В настоящее время в России нет единого национального Регистра неродственных доноров. Существует порядка 10 разрозненных донорских регистров, 3 из которых представлены в Международной Поисковой Системе Доноров костного мозга (Bone Marrow Donors Worldwide) и 2 из которых

являются членами Международной Ассоциации Доноров костного мозга (World Marrow Donor Association). С 2010 года на базе ГБУЗСО «Клинический центр клеточных технологий» в Самаре создан Регистр неродственных доноров. В составе регистра более 2000 потенциальных доноров и около 5500 единиц пуповинной крови (ЕПК), типированных молекулярно-генетическим методом по локусам A, B, DRB1. За время работы Регистра проведено более 500 подборов пар донор-реципиент по запросам трансплантационных центров. Регистр входит в Международную Поисковую Систему Доноров костного мозга (BMDW) и имеет наибольшее количество A-B-DRB1-типированных доноров среди представленных Российских регистров. Средний возраст доноров — 32,8 лет. По национальному составу преобладают русские (83%), татары (5,6%), чуваша (1,9%), а также среди потенциальных доноров встречаются редкие национальности: даргинцы, ингуши, лезгины, мари, уйгуры. Многонациональный состав регистра многократно увеличивает эффективность поиска для пациентов минорных национальностей, проживающих в Российской Федерации. За время работы регистра для проведения трансплантаций было передано 42 единицы пуповинной крови, 11 из которых были переданы в международные трансплантационные центры (Англия, Израиль, Норвегия, Беларусь, Голландия, Польша) для лечения пациентов.

Вопрос о развитии донорских регистров в Российской Федерации стоит особенно остро в первую очередь по причине уникальности нашей популяции, которая обуславливает сложность поиска подходящего донора для российских пациентов в зарубежных регистрах и недоступности подходящих доноров для большинства россиян по финансовым причинам.

Логонова М. А.<sup>1,2</sup>, Парамонов И. В.<sup>1</sup><sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский медицинский научно-производственный центр «Росплазма»» Федерального медико-биологического агентства.<sup>2</sup> Вятский государственный университет, г. Киров.

## НОВЫЙ АЛЛЕЛЬ В ЛОКУСЕ *HLA-DRB1*, ВЫЯВЛЕННЫЙ В ПОПУЛЯЦИИ КИРОВСКОЙ ОБЛАСТИ

При проведении HLA-типирования по локусам HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1 потенциальных доноров гемопоэтических стволовых клеток с использованием наборов реагентов AlleleSEQR (Celera, США), был выявлен образец №18517, генотип которого по локусам HLA-A, HLA-B, HLA-C был определен однозначно — A\*02:TKHW, 24:TKKZ; B\*35:03; C\*04:NPNR, 12:NNHV. В то время как при общем достаточно высоком качестве сиквенса (BCS=84) по локусу HLA-DRB1 в библиотеке HLA-аллелей (IMGT/DRB1 3.9.0.4 2012-07-12) не было найдено полного соответствия. Однако исследуемая последовательность имеет только одно несовпадение с аллельным вариантом DRB1\*04:08:01, 07:01:01:01 в основании 199 (экзон 2, позиция 286) или с аллельным вариантом DRB1\*04:38, 07:01:01:01 в основании 212 (экзон 2, позиция 299). Для аллелей DRB1\*04:08:01, 07:01:01:01 в позиции 286 должно стоять Y (смесь A (аденин) и C (цитозин)), в то время как в полученной консенсусной последовательности образец имеет только A (сигнал очень четкий в обоих сиквенсах — как в прямом, так и в обратном направлении), а для аллелей DRB1\*04:38, 07:01:01:01, для которых в позиции 299 должно стоять R (смесь A (аденин) и G (гуанин)), в консенсусной последовательности сиквенс в прямом и обратном направлении дает четкий сигнал G (гуанин).

В связи с тем, что при использовании наборов реагентов AlleleSEQR создается консенсусная последовательность, а не секвенируется каждый аллель в отдельности, при определении нового аллеля в гетерозиготе с уже известным не всегда получается выявить, какой из аллелей новый, а какой уже известный.

В данном случае мы сравнили последовательности 2-го экзона аллелей DRB1\*04:08:01, 04:38 и 07:01:01:01 в программном обеспечении IMGT/HLA Sequence Alignments (Release 3.11.0 — 2013-01-18), доступном в on-line режиме в глобальной сети Интернет. Анализ результатов сравнения показал, что аллели DRB1\*04:08:01, 04:38 во 2-м экзоне имеют 27 отличающихся позиций от аллеля DRB1\*07:01:01:01. Что особенно интересно, 26 отличающихся позиций являются общи-

ми для обоих аллелей — и для DRB1\*04:08:01 и для DRB1\*04:38, а 27-ая отличающаяся позиция различна — для пары аллелей DRB1\*04:08:01, 07:01:01:01 — это позиция 286, для пары аллелей DRB1\*04:38, 07:01:01:01 — это позиция 299.

Наибольший интерес в нашем случае представляет основание в позиции 124, так как в указанной позиции последовательности аллелей DRB1\*04:08:01/04:38 и 07:01:01:01 различаются, и для выявления этого различия существует праймер для разрешения гетерозиготных неоднозначностей (HARP — Heterozygous ambiguity resolution primer) — R2F124C. То есть при постановке секвенирующей ПЦР аллели DRB1\*04:08:01 и 04:38, имеющие в позиции 124 — C (цитозин) будут амплифицироваться с праймером R2F124C, а соответственно аллель DRB1\*07:01:01:01, имеющий в позиции 124 — T (тимин) — не будет.

Рестроспективный анализ сиквенсов, полученных при использовании наборов реагентов в базовом разрешении с праймером R2F124C в программном обеспечении Assign SBT v.3.6 показал, что в позиции 286 стоит A (аденин), а в позиции 299 стоит G (гуанин), что свидетельствует о том, что образец имеет аллель DRB1\*07:01:01:01 и новый аллельный вариант DRB1\*04. При этом вышесказанное показывает, что это может быть новый аллельный вариант DRB1\*04, отличающийся от аллеля DRB1\*04:08:01 в позиции 286 — где вместо C (цитозин) стоит A (аденин), так и новый аллельный вариант DRB1\*04, отличающийся от аллеля DRB1\*04:38 в позиции 299 — где вместо A (аденин) стоит G (гуанин).

При первом варианте развития событий, 71 кодон будет выглядеть как AAG (=лизин), вместо AGG (=аргинин). Обе аминокислоты являются полярными с заряженными положительно боковыми цепями, поэтому возможно, что эта замена не вызовет глобальных структурных изменений молекулы белка. При втором варианте — 67 кодон будет выглядеть как CTC (=лейцин), вместо ATC (=изолейцин), в данном случае обе аминокислоты неполярные, что также позволяет предположить отсутствие глобальных структурных изменений молекулы белка.

*Маринич Д. В.<sup>1</sup>, Бурьянов Я. И.<sup>2</sup>, Шевчук Т. В.<sup>2</sup>, Дьяченко О. В.<sup>2</sup>*

<sup>1</sup> ГУ «Республиканский научно-практический центр Трансфузиологии и медицинских биотехнологий», г. Минск, Беларусь.

<sup>2</sup> Филиал института биоорганической химии им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова, г. Пуцзино, Российская Федерация.

### **МЕТИЛИРОВАНИЕ CPG-САЙТОВ 5'-ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ MDR1 ГЕНА И ЕГО СВЯЗЬ С ТРАНСКРИПЦИОННОЙ АКТИВНОСТЬЮ Υ-БОКС СВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА В ФОРМИРОВАНИИ МНОЖЕСТВЕННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ**

Лечение и профилактика онкологических заболеваний во многом зависят от понимания молекулярных механизмов канцерогенеза. Экспрессия гена множественной лекарственной устойчивости (multidrug resistant gene — MDR) MDR1 и экспрессией P-gp-протеина тесно коррелирует с клиническим прогнозом у пациентов с онкогематологическими заболеваниями. Υ-бокс связывающий белок (ΥВ-1), связываясь с ДНК, участвует в регуляции экспрессии ряда генов, включая ген множественной лекарственной устойчивости.

Была исследована коррелятивная связь между метилированием 5'-области MDR1 гена и транскрипционной активностью ΥВ-1. Исследования выполнялись на культурах клеток лимфоцитов здоровых доноров и с использованием образцов периферической крови и костного мозга при различных видах онкогематологических заболеваний, таких, как острый миелобластный лейкоз (ОМЛ), острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ), хронический миелолейкоз (ХМЛ), хронический лимфолейкоз (ХЛЛ) и множественная миелома (по последним двум нозологиям эксперименты только начаты, поэтому данные в текущий отчет не включены). Всего было исследовано 33 образца. В ряде случаев исследована динамика изменений

характера метилирования регуляторно-промоторной области MDR1 в сопоставлении с клинико-лабораторной картиной заболевания, иммунофенотипической экспрессией белка Pgp-170 и транскрипционной активностью ΥВ-1.

В качестве материала для выделения ДНК использовались как цельные, так и фракционированные (с использованием фикол-вероградиентного градиента с плотностью 1.077) препараты крови и костного мозга. Полученные образцы использовали в метилчувствительной полимеразных цепей реакции (МЧ-ПЦР) и Real-Time ПЦР.

Показана устойчивая положительная корреляционная связь между стадией заболевания, метилированием регуляторно-промоторной области MDR1 и активностью транскрипции ΥВ-1. Экспрессия ΥВ-1 была минимальной у здоровых доноров и пациентов с устойчивой клинико-гематологической ремиссией и максимальна при прогрессии болезни и при резистентных формах лейкозов. Дальнейшие исследования должны выявить динамические особенности данного тандема маркеров.

Работа выполнена при поддержке Белорусского Фонда фундаментальных исследований (проект Б11-127).

*Павлова А. А., Соколова Ю. В., Павлова И. Е., Бубнова Л. Н., Бессмельцев С. С.*

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

### **ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ ЦИТОКИНОВ У ЖИТЕЛЕЙ СЕВЕРО-ЗАПАДНОГО РЕГИОНА РОССИИ**

Цитокины — большая группа гормоноподобных белков, пептидов или гликопротеинов, которые продуцируются клетками иммунной системы и являются сигнальными молекулами. Они опосредуют и регулируют иммунный ответ, процессы воспаления и кроветворения. Цитокины могут действовать на клетки аутокринно, паракринно или эндокринно. Гены цитокинов

и их рецепторов полиморфны, одиночные нуклеотидные полиморфные варианты (SNP-single nucleotide polymorphism) в промоторной области гена могут влиять на скорость секреции цитокина, а также на его биологическую активность. Базовый уровень продукции цитокина во многом зависит от аллельного варианта регуляторных участков промоторных зон, является кон-

ституционно присущим и относительно стабильным у каждого человека на протяжении жизни. Известно, что уровень цитокинов и их рецепторов непосредственно связан с развитием различных злокачественных новообразований у человека. Например, цитокины играют важную роль в патогенезе такой злокачественной неоплазии, как множественная миелома (ММ). Присутствие IL-6 и его рецепторов в плазме крови связывают с прогрессированием и более агрессивным течением ММ, т. к. он является ростовым и антиапоптотическим фактором для миеломных клеток и их предшественников, влияя на дифференцировку и пролиферацию. Этот цитокин вместе с IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  и IL-11 — стимулируют остеокласты, вызывая резорбцию костной ткани. IL-10 — один из важнейших цитокинов, участвующих в терминальной дифференцировке В-клеток в плазматические клетки, также является фактором роста злокачественных клеток и стимулирует их пролиферацию (примерно у половины больных ММ). При этом практически отсутствуют данные в отечественной литературе, отражающие взаимосвязь между аллельными вариантами генов цитокинов и развитием, течением, а также ответом на проводимую терапию при ММ. Для изучения такой взаимосвязи на первом этапе необходимо изучить распределение аллельных вариантов генов цитокинов в популяции здоровых лиц того региона, где предполагается дальнейшее изучение упомянутой зависимости.

Нами были обследованы 40 доноров крови (16 мужчин и 24 женщины), проживающих в г. Санкт-Петербурге, считающих себя и своих родителей русскими и не связанных кровным родством. Исследовался однонуклеотидный полиморфизм промоторного региона генов цитокинов и их рецепторов: IL-1 $\alpha$ -889T/C; IL-1 $\beta$ -511T/C; IL-1 $\beta$  +3962T/C; IL-1R pst 1970 C/T; IL-1RA mspa1 11100T/C; IL-4R $\alpha$  +1902G/A; IL-12 -1188C/A; IFN $\gamma$  utr 5644A/T; TGF- $\beta$ 1 codon 10C/T; TGF- $\beta$ 1 codon 25G/C; TNF- $\alpha$  -308G/A; TNF- $\alpha$  -238G/A; IL-2 -330T/G; IL-2 +166G/T;

IL-4 -1098T/G; IL-4 -590T/C; IL-4 -33T/C; IL-6 -174G/C; IL-6 nt565G/A; IL-10 -1082G/A; IL-10 -819C/T; IL-10 -592C/A. Геномную ДНК выделяли из ядродержащих клеток периферической крови с помощью коммерческого набора BOX 500 (PRONRANS); генотипирование проводили посредством PCR-SSP с использованием коммерческого набора Cytokine genotyping Kit (Invitrogen), визуализация продуктов амплификации осуществлялась посредством электрофореза в горизонтальном агарозном геле. В общей группе обследованных здоровых лиц установлены следующие частоты SNP: IL-1 $\alpha$  -889 (50,0% TC; 47,5% CC; 2,5% TT); IL-1 $\beta$  -511 (52,5% TC; 37,5% CC; 10,0% TT); IL-1 $\beta$  +3962 (30,5% TC; 56,5% CC; 13,0% TT); IL-1R pst 1970 (32,5% TC; 35,0% CC; 32,5% TT); IL-1RA mspa1 11100 (50,0% TC; 22,5% CC; 27,5% TT); IL-4R $\alpha$  +1902 (32,5% GA; 67,5% AA); IL-12 -1188 (29,5% AC; 5,0% CC; 65,5% AA); IFN $\gamma$  utr 5644 (62,5% TA; 17,5% AA; 20,0% TT); TGF- $\beta$ 1 codon 10 (62,5% TC; 12,5% CC; 25,0% TT); TGF- $\beta$ 1 codon 25 (7,5% GC; 82,5% GG; 10,0% CG); TNF- $\alpha$  -308 (15,0% GA; 85,0% GG); TNF- $\alpha$  -238 (7,5% GA; 92,5% GG); IL-2 -330 (35,5% TG; 52,5% TT; 15,0% GG); IL-2 +166 (42,5% TG; 12,5% TT; 45,0% GG); IL-4 -1098 (20,0% TG; 80,0% TT); IL-4 -590 (52,5% TC; 5,0% TT; 42,5% CC); IL-4 -33 (37,5% TC; 10,0% TT; 52,5% CC); IL-6 -174 (70,0% GC; 12,5% GG; 17,5% CC); IL-6 nt565 (80,0% GA; 12,5% GG; 7,5% AA); IL-10 -1082 (52,5% GA; 17,5% GG; 30,0% AA); IL-10 -819 (47,5% TC; 40,0% CC; 12,5% TT); IL-10 -592 (46,5% AC; 41,0% CC; 12,5% AA). Нами не было выявлено различий между мужчинами и женщинами в частоте встречаемости изученных SNP цитокинов и их рецепторов. Полученные данные могут служить как для дальнейших иммуногенетических популяционных исследований, так и в качестве группы сравнения для определения роли генов цитокинов в развитии и течении множественной миеломы.

Попов А. М.<sup>1,2</sup>, Цаур Г. А.<sup>1,2</sup>, Шориков Е. В.<sup>1,2</sup>, Цвиренко С. В.<sup>1,3</sup>, Савельев Л. И.<sup>1,2,3</sup>, Фечина Л. Г.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> ГБУЗ СО «Областная детская клиническая больница № 1», г. Екатеринбург, Российская Федерация.

<sup>2</sup> ГБУЗ СО Центр организации специализированных видов медицинской помощи

«Институт медицинских клеточных технологий», г. Екатеринбург, Российская Федерация.

<sup>3</sup> ГБОУ ВПО «Уральская государственная медицинская академия», г. Екатеринбург, Российская Федерация.

### ОПРЕДЕЛЕНИЕ МИНИМАЛЬНОЙ ОСТАТОЧНОЙ БОЛЕЗНИ ПРИ ОЛЛ У ДЕТЕЙ ВЫЯВЛЕНИЕМ ХИМЕРНОГО ТРАНСКРИПТА В ХОДЕ ПЦР И МЕТОДОМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ

Цель исследования — оценить сопоставимость результатов определения минимальной остаточной болезни (МОБ) при остром лимфобластном лейкозе (ОЛЛ) у детей методами проточной цитометрии и ПЦР с выявлением химерных транскриптов (ХТр). В исследуемую группу вошли 77 пациентов, в том числе 3 с Т-ОЛЛ и 74 с ОЛЛ из В-линейных предшественников. У 22 пациентов обнаружен ХТр *MLL-AF4*, у 4 — *MLL-MLLT1*, у 3 — *MLL-EPS15*, у 6 — *MLL-MLLT3*, у 34 — *ETV6-RUNX1*, у 4 — *TCF3-PBX*, у 1 — *BCR-ABL* и у 3 — *SCL-TAL1*. Был исследован 331 образец костного мозга, взятый на разных стадиях терапии. МОБ определяли одновременно проточной цитометрией, ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) и ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ). Качественная сходимость результатов проточной цитометрии и ПЦР составила 86,7%. Детальный анализ результатов показал, что сходимость результатов определения МОБ не зависела от типа определяемой молекулярной перестройки ( $p=0,879$ ),

наличия в образце нормальных В-линейных предшественников ( $p=0,123$ ) и иммунофенотипа опухолевых клеток ( $p=0,300$ ), но существенно различалась между образцами, взятыми во время индукционной терапии и во время консолидации/интенсификации (78,3% и 91,2% соответственно,  $p=0,002$ ). Несмотря на то, что прямое количественное сопоставление результатов определения МОБ различными методами невозможно, кинетика величины МОБ во время терапии сходна для проточной цитометрии и ПЦР-РВ. У больных с наличием ХТр, с нашей точки зрения, во время индукционной терапии и в начале консолидации/интенсификации, когда необходимо количественное определение МОБ, предпочтительнее использовать данные проточной цитометрии. В то же время, в последующих ТН, когда достаточно только качественного определения МОБ, предпочтительнее использовать результаты определения ХТр в ходе ПЦР вследствие более высокой чувствительности данного метода.

Рубан Г. И.<sup>1</sup>, Маринич Д. В.<sup>2</sup>, Гончарова Н. В.<sup>2</sup>, Лойко В. А.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Государственное учреждение «Институт физики им. Б. И. Степанова Национальной академии наук Беларуси», Минск, Беларусь.

<sup>2</sup> Государственное учреждение «Республиканский Научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий» Министерства здравоохранения Беларуси, Минск, Беларусь.

### ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЙ ДИАГНОСТИЧЕСКИЙ КРИТЕРИЙ ОСТРЫХ ЛЕЙКОЗОВ И МИЕЛОДИСПЛАСТИЧЕСКОГО СИНДРОМА

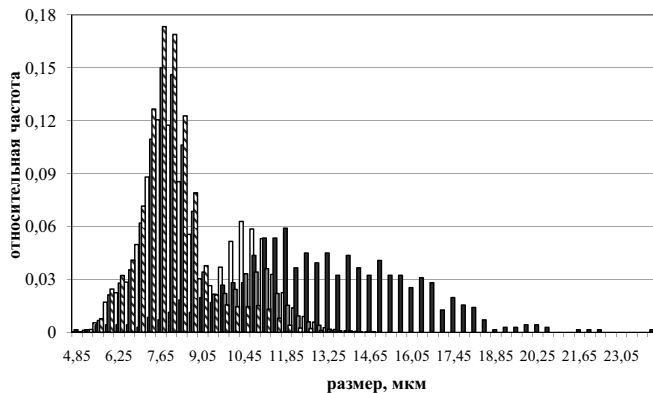
В диагностике новообразований кроветворной системы, в частности, острых лейкозий, используют разные методы. Среди них, молекулярное зондирование, иммунофенотипирование, морфологические методы исследования клеток крови. Разные методы используются совместно.

Анализ методов молекулярного зондирования и иммунофенотипирования показывает, что они, будучи ценнейшими средствами современной диагностики острых лейкозий и миелодиспластического синдрома (МДС), имеют, тем не менее, особенности

практического, методического и научного характера, осложняющие их применение. Так, молекулярное зондирование дорогостояще, не является рутинным даже в некоторых специализированных клиниках, результаты зондирования иногда (примерно 4%) не позволяют отличить миелоидную лейкомию от Т- или В-лимфоидной. Интерпретация данных иммунофенотипирования осложняется рядом обстоятельств, среди которых отметим возможность т.н. иммунофенотипического сдвига, клональной эволюции клеток крови, наличие недифферен-

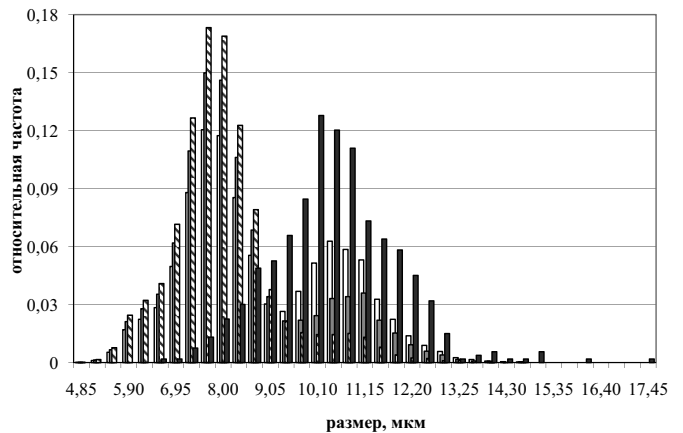
цируемых лейкозов. Приведенные данные означают, что в некоторых случаях диагностика и мониторинг острых лейкозов и МДС нуждаются в дополнительных критериях информации.

В качестве такого критерия, как показывают наши данные, можно использовать распределения размеров моноклеаров (РРМ), измеренные для жизнеспособных клеток крови методом микроскопии



**Рис. 1.** Гистограммы максимальных линейных размеров для моноклеаров пациента с острым миелоидным лейкозом (черный цвет) и клеток здоровых индивидуумов (белый, серый и штрихованный)

дифференциального интерференционного контраста. Распределения, в соответствии с нашими результатами, отличаются в норме и патологии — при острой лейкемии и МДС (рис. 1 и 2, соответственно). РРМ, доступные также измерению простыми анализаторами крови, предлагаются в качестве простого и наглядного критерия выявления острых лейкозов и МДС.



**Рис. 2.** Гистограммы максимальных линейных размеров для моноклеаров пациента с миелодиспластическим синдромом (черный цвет) и клеток здоровых индивидуумов (белый, серый и штрихованный)

Сатторова Д. А.<sup>1</sup>, Третьякова А. Ю.<sup>2</sup>, Баховадинов Б. Б.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Республиканский научный центр трансплантологии, г. Душанбе, Таджикистан.

<sup>2</sup> «Научно-исследовательский институт детской онкологии, гематологии и трансплантологии имени Р. М. Горбачевой» ГБОУ Санкт-Петербургского медицинского университета имени академика И. П. Павлова, Санкт-Петербург.

## РЕЗУЛЬТАТЫ HLA-ТИПИРОВАНИЯ ДОНОРОВ И РЕЦИПИЕНТОВ ПРИ АЛЛОТРАНСПЛАНТАЦИИ ПОЧЕК

**Актуальность.** Антигены тканевой совместимости участвуют в распознавании чужеродной ткани и формировании иммунного ответа. HLA — фенотип обязательно учитывается при подборе донора для трансплантации органа. Благоприятный прогноз пересадки органа выше при наибольшем сходстве донора и реципиента по антигенам тканевой совместимости.

**Цель исследования.** Изучение распространенности антигенов системы HLA среди доноров крови Республиканского научного Центра крови, доноров и реципиентов Республиканского научного Центра трансплантологии Минздрава Республики Таджикистан для обеспечения подбора совместимого донора

при трансплантации почек, создания регистра типированных доноров органов и тканей. Задачи исследования. Определение структуры антигенов I класса (A и B), II класса (DR) системы HLA у доноров органов и тканей, реципиентов донорской почки.

**Материалы и методы исследования.** Исследование фенотипа по системе HLA I класса (A и B) проводили с помощью комплемент-зависимого лимфоцитотоксического теста в микропланшетах «Терасаки» ЗАО «Гисанс» (Санкт-Петербург). В качестве исследуемого материала использовали лимфоцитарную взвесь. Исследование фенотипа антигенов II класса (DR) проводили методом полимераз-

ной цепной реакции (ПЦР) с использованием наборов PROTRANS (Германия). В качестве исследуемого материала использовали образцы цельной крови. Также проводили определение уровня антител к тканевым антигенам (индекс сенсibilизации), перекрестную пробу между донором и реципиентом по тканевым антигенам.

**Результаты исследования и обсуждение.**

Полученные результаты показали, что в локусе А доминируют гены А2, А11, А1, А3. Другие гены (А19, А23, А24, А26, А32, А33, А36) выявлены в 5,75 -2,85% случаев. В локусе В выявлены преимущественно гены В35, В13, В51 и В49. Остальные гены выявлялись редко. У большинства Европейских народов доминируют гены А1, А2, А3 и В7, В8, В35. Сравнительный анализ показывает значительную разницу по сравнению с европеоидами, особенно по локусу В. В локусе DRB1\*преобладают гены DRB1\*13, DRB1\*03, DRB1\*15, DRB1\*04. Остальные ге-

ны (DRB1\*05, DRB1\*11, DRB1\*09) выявлены в единичных случаях. В отличие от наших жителей у Европейских народностей преимущественно встречаются гены DRB1\*04, DRB1\*07, DRB1\*08, DRB1\*10, DRB1\*11, DRB1\*12, DRB1\*14, DRB1\*16, DRB1\*18.

**Выводы.** Таким образом, по результатам проведенных исследований выявлен ряд особенностей в распределении HLA генов у населения Республики Таджикистан по сравнению с показателями Российской Федерации и населения Европы. Полученные показатели ближе к показателям населения Ирана и Азии. Эти особенности имеют значения при подборе HLA-совместимого донора при трансплантации органов и тканей, стволовых гемопоэтических клеток реципиентам, относящимся к другим популяционным группам населения, в том числе при выполнении операции трансплантации жителям Таджикистана в зарубежных странах.

*Соколова Ю. В., Бубнова Л. Н., Павлова И. Е., Бессмельцев С. С.*

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

**ЧАСТОТА ВСТРЕЧАЕМОСТИ KIR-ГЕНОТИПОВ, ОКАЗЫВАЮЩИХ НАИБОЛЕЕ БЛАГОПРИЯТНЫЙ КЛИНИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ ПРИ ТРАНСПЛАНТАЦИИ, У ДОНОРОВ РЕСПУБЛИКАНСКОГО РЕГИСТРА**

Killer cell immunoglobulin-like receptors (KIR) — недавно открытая иммуногенетическая система, которая обладает высоким уровнем полиморфизма и играет ключевую роль в регуляции цитолитической активности естественных киллеров, взаимодействуя с антигенами главного комплекса гистосовместимости I класса. Исследования последних лет свидетельствуют о выраженном влиянии KIR-генотипа донора на клинический исход трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) и эффективность терапии. Было показано, что наличие В-гаплотипа у донора (Вх-генотип), независимо от KIR-генотипа реципиента, улучшает клинический исход трансплантации при остром миелоидном лейкозе и множественной миеломе. Дальнейшими исследованиями установлена ведущая роль в развитии реакции «трансплантат против лейкоза» центромерных KIR-генов, ассоциированных с гаплотипом В. Присутствие в генотипе донора теломерных и, особенно, центромерных В-фрагментов («В-motifs») позволяет снизить риск развития рецидива и повысить без-

рецидивную выживаемость после аллогенной трансплантации при остром миелоидном лейкозе, но не при остром лимфоидном лейкозе.

*Целью данного исследования* было изучение распределения KIR-генов и KIR-генотипов у потенциальных доноров Республиканского Регистра и определение частоты встречаемости предпочтительных для трансплантации KIR-генотипов.

KIR-генотипирование 100 потенциальных доноров ГСК Республиканского регистра было выполнено с использованием коммерческих наборов KIR Genotyping SSP Kit (Invitrogen, WI, USA). Для проведения сравнительного анализа частот KIR-генов и KIR-генотипов у потенциальных доноров ГСК нашего регистра и в других популяциях были использованы данные Allele Frequencies KIR Database (декабрь 2012). Распределение потенциальных доноров на группы в соответствии с их KIR В статусом («best», «better», «neutral») проводили при помощи Donor KIR В-content group calculator калькулятора, разработанного на сайте Европейского института биоинформатики

(European Bioinformatics Institute), который позволяет выбрать предпочтительного донора на основе анализа центромерных и теломерных участков KIR-локуса.

В обследованной группе доноров ГСК обнаружена значительно более высокая по сравнению с другими популяциями частота KIR-генотипов, оказывающих наиболее благоприятный клинический эффект при трансплантации при остром миелоидном лейкозе. Частота встречаемости KIR-генотипов, входящих в группу «best», у доноров нашего регистра составила 15%, по сравнению с 10,9% во

французской, 10,2% в английской и 6% в итальянской популяциях. Наиболее выраженные различия были обнаружены при сравнении с азиатскими популяциями: японской (0%), южнокорейской (0,6%) и китайской (1%).

**Результаты данного исследования** могут быть использованы для выбора наиболее предпочтительных доноров ГСК с целью улучшения терапевтического эффекта трансплантации ГСК, а также для оптимизации банка Республиканского регистра доноров ГСК по количественному и популяционному составу.

Хамаганова Е. Г., Чугреева Т. П., Юшкова А. А.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Гематологический научный центр Министерства здравоохранения России», Москва.

### ПЯТИЛОКУСНЫЕ HLA-ГАПЛОТИПЫ У ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ С ПОКАЗАНИЯМИ К АЛЛОГЕННОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

HLA-идентичные сибсы (от англ. sibs — sisters-brothers) — наиболее предпочтительные доноры при аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК). Они наследуют не только идентичные гены HLA, но и одинаковые варианты всех других генов внутри HLA-гаплотипов. При неродственной (нр) ТГСК совпадение донора и больного по генам HLA не означает, что у них также совпадают другие гены, находящиеся внутри HLA-комплекса. Успех и продолжительность поиска нр донора во многом зависят от присутствия у больного распространенных HLA-гаплотипов. Для больных даже с одним HLA-гаплотипом из 10 «общих» у европеоидов имеются более высокие шансы найти совместимого донора в течение непродолжительного времени. Для таких больных существует возможность выбора донора среди множества HLA-совместимых с учетом не только HLA-критериев. Десятью «общими» HLA-гаплотипами у европеоидов принято считать 10 наиболее высокочастотных HLA-гаплотипов, установленных по данным наибольшего регистра доноров костного мозга — NMDP (National Marrow Donor Program, USA) для доноров европейского происхождения.

Задачи настоящего исследования — изучить распределение HLA-A\*-B\*-C\*-DRB1\*-DQB1\*гаплотипов у гематологических больных, нуждающихся в проведения аллогенной

ТГСК, установить наиболее часто встречающиеся HLA-гаплотипы, определить процент больных, обладающих хотя бы одним из 10 «общих» HLA-гаплотипов.

В исследование включено 203 больных (европеоидов) различными гематологическими заболеваниями с показаниями к проведению аллогенной ТГСК, у которых были установлены HLA-гаплотипы. HLA-гаплотипы устанавливались их сегрегацией при типировании больного и его ближайших кровных родственников. Типирование HLA-A\*-B\*-C\*-DRB1\*-DQB1\* выполнялось методом PCR-SSP с праймерами «Invitrogen» (USA). Частота гаплотипов вычислялась как отношение общего числа копий гаплотипов к числу больных в исследовании

У 203 больных (2n=406) выявлено 265 различных HLA-A\*-B\*-C\*-DRB1\*-DQB1\*-гаплотипов. Из них 198 HLA-гаплотипов определены один раз, 46 — два раза. 21 HLA-гаплотип был установлен не менее трех раз и составил группу высокочастотных HLA-гаплотипов у больных с показаниями к аллогенной ТГСК. HLA-A\*03-B\*07-C\*07-DRB1\*15-DQB1\*06 оказался наиболее часто встречающимся HLA-гаплотипом (8,4%). Наиболее высокочастотный для большинства европейских популяций гаплотип HLA-A\*01-B\*08-C\*07-DRB1\*03-DQB1\*02 являлся вторым (6,9%), HLA-A\*02-B\*13-C\*06-DRB1\*07-DQB1\*02 - третьим (4,9%).



HLA-A\*02-B\*07-C\*07-DRB1\*15-DQB1\*06 и HLA A\*25-B\*18-C\*12-DRB1\*15-DQB1\*06 выявлялись с равной частотой (3,5%) и делили 4–5 места. HLA-A\*01-B\*57-C\*06-DRB1\*07-DQB1\*03 был по частоте шестым (3%). Семь из 10 «общих» европеоидных HLA-гаплотипов установлены у больных с показаниями к аллогенной ТГСК более трех раз, пять — не менее 5 раз, два «общих» HLA-гаплотипа — более 10 раз. Три из 10 «общих» HLA-гаплотипов выявлены менее трех раз.

Только 60 больных с показаниями к аллогенной ТГСК (29,5%) обладали хотя бы одним из 10 «общих» для европеоидов HLA-гаплотипов. Лишь четверо больных (2%) обладали двумя такими HLA-гаплотипами т.е., высокий шанс

найти совместимого нр донора в течение непродолжительного времени имелся менее чем у трети больных, нуждающихся в проведении аллогенной ТГСК.

Итак, больные с показаниями к аллогенной ТГСК имеют особенности в распределении HLA-гаплотипов, которые могут быть обусловлены, как ассоциацией определенных HLA-гаплотипов с заболеваниями, так и с особенностями распределения HLA-гаплотипов в нашей популяции. Расширение пула HLA-типированных доноров в разных регионах страны, могло бы положительно повлиять на результаты поиска нр донора ГСК для больных, которым необходимо проведение аллогенной ТГСК, но отсутствует HLA-идентичный сибс.

## АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ

Абдулкадыров К. М.	7, 16, 27, 33, 42, 50	Загоскина Т. П.	15, 37, 41
Абдулкадырова А. С.	7, 16	Зайцева Г. А.	58
Абдуллаев А. О.	48	Заклякова Л. В.	35
Абдуллаев Ш. М.	49	Зарицкий А. Ю.	7, 16
Адильгереева Э. П.	30	Звонков Е. Е.	39
Алейникова О. В.	19, 44, 53	Зотина Е. Н.	15, 37
Алимова Г. А.	39	Зотова Е. В.	11, 18, 31
Алланазарова Б. Р.	8, 20, 22	Зотова И. И.	7, 16
Аль-Ради Л. С.	55	Зюзгин И. С.	42
Анчукова Л. В.	35	Ибрагимов З. З.	20
Аршанская Е. Г.	35	Иванов А. М.	28
Ассесорова Ю. Ю.	8, 22	Иванова В. Л.	35, 47
Афанасьев Б. В.	13	Иванова М. О.	7, 16
Байдун Л. В.	19	Иванова М. П.	16, 27, 33, 42
Баранчикова С. В.	15, 40	Ильина Н. А.	16
Бархатов И. М.	14	Ильина Н. В.	7
Барях Е. А.	39	Исакова Т. В.	28
Баховадинов Б. Б.	64	Казакбаева Х. М.	23
Белоусов К. А.	54	Касакова А. Н.	19
Березина О. В.	9	Кайсина К. С.	34
Бессмельцев С. С.	50, 61, 65	Калинова Н. А.	35
Бидерман Б. В.	47, 55, 57	Капланов К. Д.	35
Блажиевич И. А.	35	Капланская И. Б.	39
Бобоев К. Т.	10, 20–24	Капланская И. Б.	47
Бондаренко С. Н.	13	Капорская Т. С.	35
Бондарчук С. В.	28	Карачунский А. И.	19
Борковска К.	11	Каримов Х. Я.	20–24
Бубнова Л. Н.	61, 65	Кароль Ю. С.	18, 31
Бурьянов Я. И.	61	Карягина Е. В.	7, 42
Бутина Е. В.	58	Катаева Е. В.	54
Быданов О. И.	19	Кесаева Л. А.	34, 35
Вайнер А. С.	9	Кириллова Е. Г.	35
Вальчук М. А.	11, 18, 31	Киселева Т. А.	35
Варламова Е. Ю.	47	Кисиличина Д. Г.	47
Ващенко Т. Н.	70	Клеина И. В.	39
Ващенко В. И.	70	Клинушкина Е. Ф.	54
Вильянинов В. Н.	70	Клиточенко Т. Ю.	35
Власова М. Е.	13	Ключников Д. Ю.	59
Воевода М. И.	12	Князева А. С.	25
Волкова М. А.	35	Князева А. С.	26
Волкова С. А.	35	Ковалева Л. Г.	47
Володичева Е. М.	35	Ковалев С. Ю.	53
Волошин С. В.	33	Ковригина А. М.	39
Волчков С. Е.	59	Ковынев И. Б.	51
Вопилина Н. А.	35	Козловская М. А.	16, 27, 42
Воробьев И. А.	39	Колошейнова Т. И.	35, 39
Воропаева Е. Н.	9, 12	Колюбаева С. Н.	28
Высоцкая Л. Л.	35, 54	Кондратчик К. Ю.	53
Гавриленко А. Н.	35	Константинова Т. С.	35, 45
Гаврилина О. А.	39	Корольчук О. С.	11, 31
Гаврилова Л. В.	35	Косинова М. В.	35
Гайсарова Г. А.	35	Костылева М. Б.	38
Гальцева И. В.	43	Котлярчук К. Б.	31
Гиндина Т. Л.	13, 53	Кохно А. В.	43
Голенков А. К.	54	Кравченко С. К.	39
Головченко Р. А.	7, 16	Криницына Е. Е.	15
Голубенко Р. А.	35	Крутов А. А.	34, 35
Гончарова Н. В.	63	Кузник Б. И.	29
Горбунова А. В.	14	Кустанович А. М.	53
Горячева С. Р.	35	Куцев С. И.	30, 48
Гребенюк Л. А.	39	Кучма Г. Б.	35
Грицаев С. В.	42	Лавров А. В.	30, 48
Гусев С. В.	70	Лагойко С. Н.	19
Гушанская И. И.	35	Лазарев И. Г.	35
Давыдкин И. Л.	35	Лазорко Н. С.	7, 16
Демиденко А. Н.	52	Лапин В. А.	35
Демина А. С.	53	Лепик К. В.	14
Демьянова В. Т.	37	Лесничий В. В.	70
Дмитриева О. В.	28	Линькова Н. С.	29
Домникова Н. П.	35	Литвинко Н. П.	44
Домрачева Е. В.	39, 43, 47	Логинова М. А.	60
Дохина Н. Н.	16	Логинский В. Е.	11, 18, 31
Друй А. Е.	53	Лойко В. А.	63
Дудина Г. А.	54	Ломаиа Е. Г.	7, 16
Дунаев Ю. А.	35	Лорие Ю. Ю.	39
Дьяченко О. В.	61	Луговская С. А.	39, 47
Есефьева Н. Б.	35	Лукавецкий Л. М.	31
Елов А. А.	58	Лукьянова А. С.	11, 18, 31

Луцкая Т. Д.	54	Седов К. В.	54
Лучинин А. С.	41	Семенова А. А.	39
Лямкина А. С.	32, 35	Сидорова Ю. В.	47
Магомедова А. У.	39	Скатова В. С.	35
Мазеин Д. А.	45	Смирнихина С. А.	30, 48
Мамаев Н. Н.	14	Содикова Ш. Э.	10, 20, 49
Манакова Т. Е.	43	Сокова О. И.	53
Маринич Д. В.	61, 63	Соколова Ю. В.	61, 65
Мартыненко Л. С.	16, 27, 33, 42, 50	Сокурова Е. В.	35
Мартынкевич И. С.	7, 16, 27, 33, 42, 50	Солдаткина О. И.	35
Масляк З. В.	31	Солдатова И. Н.	34, 35
Матвеева Е. А.	19	Сороколетова Е. Ф.	70
Матрохина О. И.	58	Станчева Н. В.	13
Мачюлайтене Е. Р.	7, 16	Стельмашенко Л. В.	50
Мисюрин А. В.	34, 35, 53	Страмбовская Н. Н.	25, 26
Мисюрина Е. Н.	34, 35	Стренева О. В.	53
Митина Т. А.	54	Стригалева М. В.	45
Митрофанова Г. А.	35	Судариков А. Б.	47, 48, 55, 57
Мишарина Ж. А.	18	Сухина И. А.	28
Мишенин А. В.	51	Сучкова М. В.	53
Молостова В. З.	35	Тамкович Н. В.	51
Морозова А. К.	39	Тарновская С. И.	29
Морозова Е. В.	13	Тарновский Р. В.	51
Мулина И. И.	35	Тикунова Т. С.	35
Муминов Ш. М.	49	Тимофеева Н. М.	19
Мякова Н. В.	53	Титулова Т. Б.	70
Назарова Е. Л.	37	Тихонова В. В.	35
Наседкина Т. В.	19	Толстокорая Т. М.	35
Наумова Е. В.	47	Третьякова А. Ю.	64
Нестерова Е. С.	39	Трифорова Е. В.	54
Никитин В. Ю.	28	Трусова Л. М.	59
Никитин Е. А.	47, 55, 38	Тумаков В. А.	35
Николаева Е. С.	13	Тупицын Н. Н.	39
Никулина Т. С.	7, 16	Туркина А. Г.	30, 35, 48
Новицкая Н. В.	35	Тюмина О. В.	59
Обухова Т. Н.	39, 47	Удальева В. Ю.	7, 16
Овселян В. А.	15, 40, 41	Усачева Е. И.	7, 16
Ольшанская Ю. В.	19	Фалькович О. М.	35
Павлова А. А.	61	Фечина Л. Г.	53, 63
Павлова Е. А.	70	Филипенко М. Л.	9
Павлова И. Е.	61, 65	Финашутина Ю. П.	35, 53
Парамонов И. В.	60	Флейшман Е. В.	53
Паровичникова Е. Н.	43	Фоминых М. С.	7, 16
Партылова Е. А.	45	Хавинсон В. Х.	29
Пеньковска-Греля Б.	11, 31	Хамаганова Е. Г.	57, 66
Петрашова Н. А.	38	Хартон Т. В.	52
Петрова Г. Д.	39	Ходулева С. А.	52
Петрова Е. В.	16, 27, 42	Холопова И. В.	7, 16
Петрова И. А.	13	Хомчук О. М.	35
Пилюшина В. В.	35	Цаур Г. А.	19, 48, 53, 63
Пименова М. А.	43	Цвиренко С. В.	63
Плаксина Е. А.	20	Цыбакова Н. Ю.	16, 27, 33, 42
Плеханова О. М.	53	Чагорова Т. В.	35
Позняк Е. И.	7	Чекменева Ю. Ю.	19
Поляков А. С.	28	Челышева Е. Ю.	30, 35, 48
Попов А. М.	53, 63	Черных Ю. Б.	54
Попова Ж. В.	35	Черныш С. А.	39
Поспелова Т. И.	12, 32, 35	Чугреева Т. П.	66
Поспелова Т. И.	9, 51	Чукавина М. М.	35
Почтарь М. Е.	47	Шабанова Е. С.	27, 42
Приступа А. С.	35	Шамсутдинова Д. Б.	10, 20, 21, 49
Птушкин В. В.	47	Шардаков В. И.	37
Резванов А. С.	20	Шевчук Т. В.	61
Ригер И.	31	Шнейдер Т. А.	16
Ригер Т. О.	53	Шнейдер Т. В.	7
Римашевская Е. В.	39	Шориков Е. В.	53, 63
Романова Е. Г.	7, 16	Штыбель Р. Г.	35
Ромашевская И. П.	44, 52	Шуваев В. А.	7, 16, 27
Росин В. А.	40, 41	Шухов О. А.	30, 48
Рубан Г. И.	63	Шушанов С. С.	54
Румянцева Ю. В.	19	Юцкевич Р. И.	53
Рыбалкина Е. Ю.	54	Юшкова А. А.	66
Рымар М. М.	18	Яблокова В. В.	35
Савва Н. Н.	44	Яковлева Ю. А.	48
Савельев Л. И.	53, 63	Якутик И. А.	55, 57
Савченко В. Г.	43	Ялунина Л. М.	35
Самышина Е. А.	35	Gusev S. V.	70
Сарибекян Р. А.	43	Lesnichij V. V.	70
Сатторова Д. А.	64	Marschalek R.	53
Сбитякова Е. Г.	7, 16	Meyer C.	53
Свешникова Ю. В.	45	Titulova N. B.	70
Северина Н. А.	47	Vashchenko T. N.	70

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

*Ващенко В. И., Вильянинов В. Н., Павлова Е. А., Сороколетова Е. Ф.,  
Лесничий В. В., Ващенко Т. Н., Гусев С. В., Титулова Т. Б.*

*НИО крови и тканей НИЦ, ФГБВУ ВПО «Военно-медицинская академия имени С. М. Кирова», Санкт-Петербург.*

**ПОКАЗАТЕЛИ СИСТЕМЫ ГЕМОСТАЗА И МОРФОЛОГИЧЕСКОГО СОСТАВА КРОВИ У ДОНОРОВ КЛЕТОК КРОВИ ПРИ ИЗМЕНЕНИИ СОЛНЕЧНОЙ АКТИВНОСТИ В ТЕЧЕНИЕ ГОДА**

**Резюме.** Проведено сравнительное исследование морфологического состава (эритроцитов, тромбоцитов, лейкоцитов и их субпопуляций: базофилов, палочкоядерных и сегментоядерных нейтрофилов, эозинофилов, лимфоцитов, моноцитов) периферической крови и основных показателей системы гемостаза у 365 здоровых доноров клеток крови Санкт-Петербурга и Ленинградской области в зависимости от изменений солнечной активности в течение года, а также в дни повышенной геомагнитной активности после вспышек на Солнце. В результате этих исследований установлено, что зимой по сравнению с летом у доноров понижается количество тромбоцитов и лейкоцитов за счет перераспределения сегментоядерных нейтрофилов и моноцитов,

удлиняется время свертывания крови, изменяется фибринолитическая активность и усиливается активность фактора XIII. В дни повышенной геомагнитной активности происходит уменьшение количества лейкоцитов более чем в полтора раза за счет уменьшения числа нейтрофилов, которое затем через 2 дня резко повышается. Свертываемость крови в день повышенной геомагнитной активности ускоряется, активность антитромбина III увеличивается, а активность фактора XIII и фибринолитическая активность крови усиливаются. Во время солнечных возмущений, как и летом, увеличивается энтропия лейкоцитарной формулы крови.

**Ключевые слова:** солнечная активность, доноры клеток крови, морфологический состав крови, система гемостаза, АЧТВ.

*Vashchenko V. I., Vilyaninov V. N., Pavlova E. A., Sorokoletova T. F.,  
Lesnichij V. V., Vashchenko T. N., Gusev S. V., Titulova N. B.*

*Blood and Tissue Department, Military Medical Academy, St. Petersburg.*

**INDICES OF HEMOSTATIC SYSTEM AND DIFFERENTIAL BLOOD COUNTS IN BLOOD DONORS UPON CHANGES IN ANNUAL SOLAR ACTIVITY AND ITS RANDOM PERTURBANCES**

**Abstract.** A comparative study of peripheral blood cell counts (RBC, platelets, leukocytes and their subpopulations, including basophils, neutrophils, eosinophils, lymphocytes, monocytes) and basic parameters of haemostatic system was performed in several cohorts of healthy blood donors (a total of 365 subjects) from St.-Petersburg and Leningrad Region, depending on annual changes in solar activity, as well as during increased geomagnetic activity following solar flares. The results of this study have revealed that routine serial counts of platelets and leukocytes tend to decrease during winter time, as compared to summer season, due to redistribution of polymorphonuclear leukocytes and monocyte subpopulations. Winter season is also characterized by accelerated blood clotting

and plasma recalcification time, along with changes fibrinolytic activity, and higher factor XIII activity. On the days corresponding to high geomagnetic activity, we observed a more than 1.5-fold decrease in total leukocytes scores, due to decreased numbers of neutrophils, followed by a sharp increase within 2 days after this event. Blood coagulation time decreased on the days of elevated geomagnetic activity, whereas antitrombin III activity dropped, associated with increased activity of fibrinolysis and factor XIII. During solar flares, as well as the summer we observed an increased entropy of differential blood, against background values.

**Key words:** solar activity, donor blood cells, differential leukocyte counts, hemostatic system, APTT.

Установлено, что в период прохождения магнитных бурь повышается процент заболеваемости инфарктом миокарда и смертности от него, возрастает число автомобильных катастроф и техногенных аварий [1, 2]. Исследованиями ряда авторов показано различие показателей системы крови у здоровых людей в год максимальной солнечной активности по сравнению с годом спокойного Солнца [3, 4]. Не менее важно для практической медицины изучение влияния на организм не только усредненных за большой промежуток времени, но и индивидуальных флюктуаций солнечной активности, т.е. ее всплеск и спадов, наблюдаемых в отдельные дни. С солнечными вспышками тесно связано корпускулярное излучение Солнца, с которым коррелируют магнитные бури на Земле. Колебания геомагнитных полей, нарушая временную последовательность информационных сигналов, которые живой организм использует для согласования ритмики биологических процессов с ритмикой окружающей среды, могут быть фактором риска для здоровья человека [5, 6].

Данные литературы о влиянии магнитных бурь на систему крови доноров немногочисленны, посвящены изучению, главным образом, гематологического статуса и не отражают современные изменения в структуре донорского контингента [7, 8].

**Цель исследования.** Изучение отдельных показателей системы гемостаза и морфологического состава периферической крови у доноров клеток крови в зависимости от состояния солнечной активности в течение года.

**Материалы и методы исследования.** Исследования проводили на здоровых донорах в возрасте от 19 до 35 лет, проживающих в СПб и Ленинградской области. Условия быта, труда и питания обследованных существенно не различались. В качестве характеристики солнечной активности использовались стандартные показатели колебания геомагнитного поля в течение года [9]. Простейшим показателем возмущенности геомагнитного поля являются магнитные характеристические числа — ApMos, определяющиеся на каждой обсерватории по пятибалльной шкале (табл. 1).

Таблица 1.

**Характеристика геомагнитной активности Земли по ApMos**

Балл	0	1	2	3	4	5
ApMos	0–7	8–14	15–19	20–29	30–49	>=50
	Очень спокойное	Спокойное	Неустойчивое	Слабо возмущенное	Умеренно возмущенное	Сильно возмущенное

В основу исследования положено сравнение показателей системы крови у обследованных при сезонном изменении геомагнитной активности зимой и летом, а также в магнитно-активные дни (4–5 баллов).

В период спокойного Солнца обследовали 278 доноров, в дни солнечных возмущений — 87. Для оценки морфологического состава крови и системы гемостаза определяли время свертывания крови по Ли-Уайту, СОЭ, содержание эритроцитов, лейкоцитов, тромбоцитов, лейкоцитарную формулу крови подсчитывали на мазках, окрашенных по Май-Грюнвальду [10], протромбиновое время, тромбиновое время, активированное частичное тромбопластинное время (АЧТВ), содержание фибриногена на коагулометре STA Compact («Roche», Швейцария), фибринолитическую активность крови, активность факторов XIII и антитромбина III при использовании диагностических наборов фирмы «Технология-Стандарт», лейкоцитарную

формулу крови подсчитывали на мазках, окрашенных по Май-Грюнвальду [10], а также рассчитывали показатель энтропии лейкоцитарной формулы крови (ЭЛФК) [11].

В дни солнечных возмущений содержание эритроцитов, лейкоцитов, тромбоцитов определяли на гематологическом анализаторе «Advia 60», содержание общего гемоглобина определяли на аппарате НемоСие АВ (Швеция).

Для оценки достоверности полученных данных применяли критерий *t* Стьюдента. При обработке результатов на персональном компьютере использовали статистическую программу «Statistika 6».

**Результаты исследования и их обсуждение.** Исследования показали, что в период сезонных геомагнитных изменений (зима - лето) количество тромбоцитов и лейкоцитов уменьшается, главным образом, за счет перераспределения субпопуляций сегментоядерных лейкоцитов и моноцитов (табл. 2). Уменьшение количества

лейкоцитов в крови доноров в период сезонных геомагнитных изменений свидетельствует о снижении противоинфекционного иммунитета человека зимой и изменении барьерной (защитной) функции крови [12, 13].

Таблица 2.

**Результаты определения некоторых показателей крови и ЭЛФК у доноров клеток крови в зимние и летние месяцы ( $M \pm m$ ;  $n = 141$ )**

Показатели крови		Сезоны 2001 года	
		Зима	Лето
Гемоглобин (г/л)		146,1±1,8	140,0±1,8
Эритроциты ( x 1012/л)		4,68±0,06	4,42±0,09
Тромбоциты ( x 109/л)		264,2±3,2	238,0±3,7***
Лейкоциты ( x 109/л)		6,5±0,06	5,8±0,03*
Субпопуляции лейкоцитов	Базофилы (%)	0,3±0,3	0,5±0,3
	Эозинофилы (%)	3,1±0,3	2,5±0,3
	Палочкоядерные (%)	2,2±0,2	1,5±0,3
	Сегментоядерные (%)	46,4±1,3	56,3±1,3***
	Лимфоциты (%)	36,8±1,0	30,1±1,3
	Моноциты (%)	9,7±0,4	8,4±0,5*
ЭЛФК (%)		64,3±1,8	70,1±1,9*
СОЭ (мм/час)		6,5±0,1	7,0±0,2*

**Примечание:** \* —  $p < 0,05$ ; \*\*\* —  $p < 0,005$ ; по сравнению с данными, полученными зимой.

Анализ результатов исследования системы гемостаза доноров зимой и летом показывает различие между показателями. Так, время свертывания крови и АЧТВ зимой удлиняется, активность антитромбина III уменьшается, что

в свою очередь сопровождается увеличением показателя фибринолитической активности (табл. 3). Указанные изменения свидетельствуют о снижении фибринолитической активности, т. е. можно говорить о «сгущении» крови у доноров зимой.

Таблица 3.

**Результаты определения некоторых показателей гемостаза у доноров клеток крови в зимние и летние месяцы ( $M \pm m$ ;  $n = 137$ )**

Показатель системы гемостаза	Сезон года (2010-2011 гг.)	
	Зима	Лето
Время свертывания крови (мин)	5,1±0,1	4,7±0,1*
Протромбиновое время (с)	11±1,2	10±1,2
Тромбиновое время (с)	17±1,2	12±1,3**
АЧТВ (с)	37,1±1,6	31,2±1,7*
Фибриноген (г/л)	2,54±0,03	2,56±0,04
Антитромбин III (%)	94±0,6	109±0,6**
Фактор XIII (%)	108,0±1,4	100,0±2,0
Фибринолитическая активность (мин)	392±12	319±12***

**Примечание:** \* —  $p < 0,05$ ; \*\* —  $p < 0,01$ ; \*\*\* —  $p < 0,005$ ; по сравнению с данными, полученными зимой.

При анализе морфологических показателей крови выявлено снижение количества

лейкоцитов у здоровых доноров в периоды геомагнитных возмущений по сравнению с аналогичными показателями в магнитно-спокойные дни (за 15 дней до солнечной вспышки) (табл. 4). Количество гемоглобина

и величина СОЭ в сравниваемых группах существенно не различались. Уменьшение количества лейкоцитов в крови доноров в дни магнитных бурь свидетельствует об изменении барьерной (защитной) функции крови человека в этих условиях.

При оценке показателей гемостаза у доноров в день солнечной вспышки установлен факт изменения отдельных показателей

коагулограммы (время свертывания крови, активности фактора XIII, антитромбина III и фибринолитической активности крови). Так, свертываемость крови ускорилась, активность XIII фактора увеличивалась и существенно усиливалась фибринолитическая активность крови (по сравнению с данными, полученными за 15 дней до прогнозируемого наступления солнечной вспышки) (табл. 4).

Таблица 4.

**Динамика изменений (2011–2012 гг.) показателей системы гемостаза у доноров в дни повышенной активности Солнца ( $M \pm m$ )**

Показатель гемостаза	Группы обследованных		
	А (n=87)	Б (n=87)	В (n=61)
Гемоглобин (г/л)	144,2±1,6	142,4±1,8	143,6±1,7
Лейкоциты ( x 10 <sup>9</sup> /л )	6,82±0,31	4,23±0,41**	5,71±0,37
Тромбоциты ( x 10 <sup>9</sup> /л )	251±3,2	202±3,8***	293±3,6
Время свертывания крови (мин)	4,8±0,1	4,1±0,1**	3,7±0,1**
АЧТВ (с)	35,3±1,5	36,3±1,7	31,4±1,7*
Тромбиновое время (с)	10±1,2	17±1,3***	15±1,3**
Протромбиновое время (с)	15±1,1	10±1,2	12±1,3
Фибриноген (г/л)	2,42±0,03	2,56±0,03	2,50±0,04
Антитромбин III ( % )	97±0,6	112±0,7	106±0,6
Фактор XIII ( % )	81±1,4	105±2,0***	108±1,7***
Фибринолитическая активность (мин)	462	317***	335***
СОЭ (мм в час)	5,4±1,4	5,6±1,7	5,3±1,5

**Примечание:**

А — за 15 дней до прогнозируемой вспышки Солнца;

Б — в день солнечной вспышки;

В — через 2 дня после солнечной вспышки.

\* —  $p < 0,05$ ; \*\* —  $p < 0,01$ ; \*\*\* —  $p < 0,005$ ; по сравнению с данными, полученными за 15 дней до вспышки.

Через 2 дня после солнечной вспышки наблюдалось дальнейшее ускорение свертываемости крови. При этом повышение активности XIII фактора сопровождалось значительным усилением фибринолитической активности крови по сравнению с данными, полученными за 15 дней до вспышки Солнца.

**Таким образом,** полученные результаты свидетельствуют о влиянии солнечной активности на показатели системы гемостаза и состав периферической крови. При этом, активность фактора XIII в день геомагнитного возмущения после вспышки и в последующие 2 дня

повышается, в унисон этому явлению повышается и фибринолитическая активность крови.

В ряде работ показано, что состояние микроциркуляторного гемостаза и антиагрегационная активность сосудов у здоровых людей связаны с сезонным содержанием антиоксидантов в организме [14, 15]. Высказывается предположение, что осенью, когда имеются естественные условия для увеличения уровня антиоксидантов (режим питания связан с преобладанием в рационе овощей и фруктов), коагуляционная и агрегационная способность тромбоцитов ослаблена.

По-видимому, солнечные возмущения, как и другие факторы среды обитания человека, не являются исключением и здоровый организм реагирует на их воздействие адекватной приспособительной реакцией: ускорение процесса свертывания крови компенсируется активацией фибринолитической системы крови для сохранения баланса реологических свойств крови и энергетических процессов в клетках [5, 16].

**Заключение.** Полученные данные о работе персонала СПК. Не исключено, что при различиях в морфологическом составе крови и функциональной активности системы гемостаза у доноров клеток крови в разные сезоны года необходимо учитывать в практической работе персонала СПК. Не исключено, что при этом меняются и функциональные свойства тромбоцитов в тромбоцитном концентрате. Насколько справедливо такое предположение, покажут дальнейшие исследования.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Бреус Т. К., Рапопорт С. И. Магнитные бури: медико-биологические и геофизические аспекты / Т. К. Бреус, С. И. Рапопорт. — М.: Советский спорт, 2003. — 192 с.
2. Ананьин И. В. Влияние современных тектонических движений земной коры и связанных с ними геофизических полей на аварийность в авиации и при запуске ракет / И. В. Ананьин // Геофиз. процессы и биосфера, 2007. Т. 6. № 2. — С. 35–51.
3. Гурфинкель Ю. И. Ишемическая болезнь сердца и солнечная активность / Ю. И. Гурфинкель. — М.: ИИКЦ «Эльф-3», 2004. — 170 с.
4. Стерликова И. В. Исследование влияния корпускулярного агента солнечной активности на организм человека / И. В. Стерликова // Фундаментальные исследования, 2012. № 11. — С. 715–721.
5. Агаджанян Н. А., Батоцыренова Г. Е., Семенов Ю. Н. Эколого-функциональные и этнические особенности адаптации человека к различным условиям среды обитания / Н. А. Агаджанян, Г. Е. Батоцыренова, Ю. Н. Семенов. — Владимир: Изд-во ВГУ, 2009. — 168 с.
6. Кулешов В. Н. Биотропные эффекты геомагнитных бурь и их сезонные закономерности / В. Н. Кулешов [и др.] // Биофизика, 2001. № 5. — С. 930–934.
7. Ващенко В. И. О влиянии сезонных геомагнитных возмущений на гематологический статус доноров клеток крови / В. И. Ващенко [и др.] // Трансфузиология, 2012. Т. 13. № 3. — С. 36.
8. Митропольский А. Н. Влияние сезона года и магнитных бурь на периферическую кровь доноров / А. Н. Митропольский // Проблемы гематол. и переливания крови, 1973. Т. 18. № 8. — С. 25–28.
9. Базы данных о геомагнитном поле Земли / Центр прогнозов ИЗМИРАН (Москва). — <http://forecast.izmiran.rssi.ru>, NOAA Space Environment Center (США). — <http://www.energywave.com/solarflares.htm>, Geological Survey of Canada (Канада). — [http://geolab.nrcam.gc.ca/geomag/e\\_forgit.pull.html/](http://geolab.nrcam.gc.ca/geomag/e_forgit.pull.html/), Space Environment Center, National Oceanic and Atmospheric Administration. — <http://www.spaceweather.com/>.
10. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник / Под ред. проф. В. В. Меньшикова. — М: Медицина, 2001. — 368 с.
11. Тихончук В. С. Возможности использования интегральных показателей периферической крови человека / В. С. Тихончук [и др.] // Военно-медицинский журнал, 1992. № 3. — С. 27–31.
12. Аллергология и иммунология: национальное руководство / Под ред. Р. М. Хаитова, Н. И. Ильиной. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. — 656 с.
13. Агаджанян Н. А. Хронофизиология. Хронофармакология и хронотерапия / Н. А. Агаджанян [и др.]. — Волгоград: Изд-во ВолГМУ, 2005. — 336 с.
14. Мищенко В. П. Функциональные свойства тромбоцитов и антиагрегационная активность сосудистой стенки у здоровых людей в различные сезоны года / В. П. Мищенко [и др.] // Гематол. и трансфузиол., 1986. Т. 41. № 8. — С. 30–43.
15. Бреус Т. К. Сравнительный анализ чувствительности различных показателей сосудистого тонуса к метеорологическим и геомагнитным факторам / Т. К. Бреус [и др.] // Геофиз. процессы и биосфера, 2010. Т. 9. № 2. — С. 23–36.
16. Владимирский Б. М., Темурьянц Н. А. Влияние солнечной активности на биосферу-ноосферу / Владимирский Б. М., Темурьянц Н. А. — М: МНЭПУ, 2000. — 374 с.