

КЛИНИКО-ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

©Коллектив авторов

МОНИТОРИНГ ДОНОРСКОГО ХИМЕРИЗМА И МИНИМАЛЬНОЙ ОСТАТОЧНОЙ БОЛЕЗНИ У ОНКОГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ ПОСЛЕ АЛЛОГЕННОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

*К.В. Богданов**, *Д.В. Моторин*, *Т.С. Никулина*, *О.С. Писоцкая*, *Д.В. Бабенецкая*,
Ю.В. Миролюбова, *О.Я. Волкова*, *А.Ю. Зарицкий*

НИИ Гематологии, Федеральный Северо-Западный Медицинский Исследовательский Центр им. В.А. Алмазова, 197341, Санкт-Петербург, ул. Аккуратова, 2; эл. почта: kvbogdanov@yandex.ru

С целью улучшения диагностики у онкогематологических пациентов в посттрансплантационный период проводили комплексное исследование биомаркеров-мишеней донорского химеризма (ДХ) с использованием нескольких тестов. Выявление биомаркеров ДХ включало фенотипирование антигенов эритроцитов с идентификацией группы крови, а также определение полиморфизма InDel-, STR-, Y-локусов ДНК. Кроме того, дополнительно выполняли анализ биомаркеров минимальной остаточной болезни (МОБ), состоящий из обнаружения хромосомных aberrаций, экспрессии онкогенов и CD-маркеров. Показано, что наиболее чувствительным методом оценки ДХ является анализ полиморфизма InDel-локусов ДНК с использованием количественной ПЦР (AlleleSEQR-PCR). При этом точность тестирования может быть повышена после селектирования клеток-предшественниц CD34 из костного мозга с использованием проточной цитометрии. Тем не менее, обнаружение повышенных уровней ДХ ($\geq 95\%$) у некоторых больных лейкозом, в частности, при ОЛЛ (Ph+, bcr-abl/190+), в течение первых 6 месяцев после алло-ТГСК, не исключает развития рецидивов. Поэтому, выполнение комбинированного анализа биомаркеров-мишеней ДХ (InDel) и МОБ (онкогены, *WT1*, CD-маркеры) у больных онкогематологическими заболеваниями после алло-ТГСК является более целесообразным. Это позволяет эффективнее контролировать течение заболевания и прогнозировать развитие рецидивов в посттрансплантационный период.

Ключевые слова: лейкоз, трансплантация, мониторинг, донорский химеризм, МОБ

DOI: 10.18097/PBMC20176306570

ВВЕДЕНИЕ

Аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК) от родственного или неродственного донора широко применяется для лечения онкогематологических заболеваний, включая лейкозы. Несмотря на то, что показания к проведению ТГСК у больных гемобластомами продолжают обсуждаться, тем не менее, основные из них остаются неизменными. Прежде всего, к ним относятся следующие критерии: возраст больного, наличие у больного HLA-совместимого донора, принадлежность пациента к группе высокого риска, неблагоприятный прогноз заболевания и др. Согласно названным критериям, выполнение алло-ТГСК может быть показано, например, больным острым лейкозом, у которых в дебюте заболевания обнаруживается один из вариантов онкогенных мутаций: bcr-abl/p190, mll-af4, f1t3/itd/tkd. Проведение алло-ТГСК может быть также рекомендовано больным хроническим миелолейкозом (ХМЛ, Ph+), устойчивым к терапии тирозинкиназными ингибиторами, включая гливек, дазатиниб, нилотиниб и др. Известно, что одной из причин возникновения резистентности к названной терапии является обнаружение у больных ХМЛ мутаций в киназном домене гена *ABL* и/или коэкспрессии обоих вариантов онкогена bcr-abl: p210 и p190 [1, 2]. Несмотря на успехи в лечении больных гемобластомами, получающих алло-ТГСК, нередко у пациентов возникают рецидивы, сопровождающиеся отторжением

трансплантата и приводящие к летальным исходам. Поэтому, проведение мониторинга донорского химеризма (ДХ), позволяющее контролировать течение онкогематологического заболевания в посттрансплантационный период, является необходимым. Кроме того, оценка биомаркеров минимальной остаточной болезни (МОБ), включая онкогенные мутации, у больных онкогематологическими заболеваниями после алло-ТГСК также имеет клиническое значение. Однако, эти мишени не всегда могут быть выявлены в дебюте заболевания. В настоящее время для обнаружения биомаркеров ДХ применяют как традиционные, так и классические методы исследования. Среди традиционных методов анализа наиболее распространён скрининг антигенов эритроцитов систем АВО, Резус, Келл с идентификацией группы крови. Среди классических методов анализа широко применяется детектирование специфических локусов Y-хромосомы с использованием гибридизации *in situ* с флуоресцентной меткой (FISH). Это тестирование используется в тех случаях, когда донор отличается от реципиента по половому признаку [3]. В остальных случаях, когда донор и реципиент не являются разнополями, для оценки ДХ проводят тестирование одного из вариантов полиморфных последовательностей ДНК. В частности, анализируют полиморфизм длины рестрикционного фрагмента (RFLP, restriction fragment length polymorphism), минисателлитных последовательностей (VNTR,

variable number tandem repeat), микросателлитных последовательностей или коротких тандемных повторов (STR, short tandem repeat), а также инсерций-делеционных локусов длиной 8-30 п.н. (InDel, insertion and deletion) [4-7]. При этом, как было отмечено ранее, определение полиморфизма InDel-локусов ДНК с использованием количественной ПЦР является наиболее чувствительным методом оценки ДХ: 0,01% (InDel), 0,8-1,6% (STR), 5% (VNTR и RFLP) [7-9]. В свою очередь, для обнаружения биомаркеров МОБ проводят цитогенетический анализ хромосомных aberrаций, молекулярно-генетическое определение онкогенов-мишеней, включая *WT1*, а также иммунофенотипирование поверхностных антигенов клеточной дифференцировки (CD-маркеров). Цитогенетическое исследование предназначено для определения кариотипа клеток костного мозга больного на основе микрофотоирования метафазных пластинок и/или интерфазных и метафазных ядер с использованием FISH. Несмотря на широкое применение методов цитогенетики в диагностике лейкозов, их недостаточная специфичность и чувствительность (10^{-2}), включая FISH (10^{-3}), не всегда позволяет выявлять хромосомные мутации. Поэтому, наряду с цитогенетическим анализом мутаций, применяют более чувствительные методы молекулярно-генетического анализа с использованием ПЦР. Высокая аналитическая чувствительность метода ПЦР, как известно, позволяет выявлять одну лейкозную клетку на 10^4 - 10^6 нормальных клеток. В настоящее время для скрининга наиболее распространенных мутаций онкогенов при лейкозе проводят амплификацию онкогенов-мишеней как с использованием классической ПЦР в пробирках с объемом реакционной смеси 25 или 50 мкл, так и с использованием микрочипов с объемом реакционной смеси 1,2 мкл. Недавно было показано, что применение микрочиповой ПЦР позволяет обнаружить не менее 5 копий гена-мишени и является более предпочтительным методом анализа мутаций, включая больных острым лейкозом с выраженной лейкопенией [10].

В настоящем исследовании у больных гемобластозами, получающих алло-ТГСК, проводили скрининг и мониторинг биомаркеров ДХ с дополнительной оценкой МОБ. Определение биомаркеров ДХ состояло из фенотипирования антигенов эритроцитов и идентификации группы крови, а также анализа полиморфизма InDel-, STR-, Y-локусов ДНК. Тестирование биомаркеров МОБ включало изучение хромосомных aberrаций, а также экспрессии онкогенов и CD-маркеров. Было показано, что для оценки ДХ у больных онкогематологическими заболеваниями после алло-ТГСК могут быть использованы все вышеназванные тесты, однако, предпочтительнее выполнять анализ полиморфизма InDel-локусов ДНК. В то же время, проведение комбинированного мониторинга показателей ДХ (InDel) и МОБ является более целесообразным, так как позволяет эффективнее контролировать течение заболевания и прогнозировать развитие рецидивов в посттрансплантационный период.

МЕТОДИКА

Пациенты

Исследование включало 15 онкогематологических больных, у которых диагностировали острый миелоидный лейкоз (ОМЛ, n=5), острый В-клеточный лимфобластный лейкоз (В-ОЛЛ, n=4), хронический миелолейкоз (ХМЛ, n=3), хронический лимфолейкоз (ХЛЛ, n=1), множественную миелому (ММ, n=1) и апластическую анемию (АА, n=1). Средний возраст пациентов составил 38 лет. Со всеми пациентами было подписано добровольное информационное согласие на исследование. У всех больных была выполнена алло-ТГСК: неродственная (n=1), родственная (n=14), в том числе гаплоидентичная (n=1). Все пациенты получали миелоаблативное кондиционирование. Также, необходимо отметить, что 3 пациентам с острым лейкозом (В-ОЛЛ¹, В-ОЛЛ⁴; ОМЛ¹) до алло-ТГСК проводили по 2 курса индукционной химиотерапии (NHL-BF-90_{В-ОЛЛ¹}, ALL-BFM-2001_{В-ОЛЛ⁴}; 7+3_{ОМЛ¹}), что привело к развитию полной клинико-гематологической ремиссии (ПКГР). Однако, после первого курса терапии у этих пациентов был отмечен первый рецидив. Основные характеристики больных, включая возраст, диагноз, варианты фенотипа антигенов эритроцитов, группы крови, полиморфизма InDel-, STR-, Y-локусов ДНК, а также хромосомные aberrации и онкогены-мишени, представлены в таблице 1. Информация о лечении после алло-ТГСК, мониторинге биомаркеров, исходе заболевания представлена в таблице 2. Следует отметить, что образцы периферической крови и/или костного мозга (КМ) отбирали в пробирки с ЭДТА в дебюте заболевания, до ТГСК и затем каждый месяц после ТГСК.

Скрининг антигенов эритроцитов и идентификация группы крови

Типирование антигенов эритроцитов систем АВО, Резус, Келл выполняли по технологии Скангель ("Bio-Rad", США) с использованием реакции прямой агглютинации с последующим центрифугированием в полиакриламидном геле (ПААГ), как описано ранее [11]. Выявление антител проводили непрямым антиглобулиновым тестом в ПААГ с использованием коммерческих панелей тестированных эритроцитов. Смешанную химеру (СХ, <100%) определяли после идентификации антигенов (антител) эритроцитов и при обнаружении двойных популяций клеток (от донора и реципиента). При выявлении только антигенов (антител) эритроцитов донорского типа диагностировали полную химеру (ПХ, 100%).

Имунофенотипирование и селекция клеток CD34

Определение поверхностных антигенов дифференцировки, или CD-маркеров, у исследуемых больных проводили с использованием коммерческих моноклональных антител и проточного цитометра FacsCanto ("Becton Dickinson", США). Оценку экспрессии CD-маркеров выполняли с помощью программного обеспечения к цитометру, как описано

МОНИТОРИНГ ДОНОРСКОГО ХИМЕРИЗМА И МИНИМАЛЬНОЙ ОСТАТОЧНОЙ БОЛЕЗНИ

ранее [12]. Перед анализом ДХ в клетках-предшественницах CD34 проводили их изолирование из костного мозга, согласно опубликованной методике [13]. После сортировки клеток следовали этапы центрифугирования (4000 g, 10 мин)

и сохранения осадка. К осадку ядродержащих клеток добавляли 0,1 мл буфера (1×PBS/20 мМ EDTA) и полученную клеточную суспензию выдерживали при 4°C в течение короткого времени до начала экстракции ДНК.

Таблица 1. Скрининг биомаркеров донорского химеризма и минимальной остаточной болезни у онкогематологических больных (n=15) в дебюте заболевания

Диагноз, возраст	Биомаркеры			
	МОБ		ДХ	
	хромосомная aberrация	онкоген	полиморфизм InDel-, STR-, Y-локусов ДНК	группа крови (реципиент/донор)
В-ОЛЛ ¹ , 17	t(12;21)(p13;q22)	tel-aml1, <i>WT1</i> ↔	003/18, 015/5; D11S554, D8S1132; СЕР Y	B(III)Rh-dCceeK-/ A(II)Rh+dCCeeK-
В-ОЛЛ ² , 25	t(9;22)(q34;q11)	bcr-abl/p190, <i>WT1</i> ↑	020/1, 028/20; P450CYP19	A(II)Rh-DCceeK-/ O(I)Rh-dCceeK-
В-ОЛЛ ³ , 38	t(9;22)(q34;q11)	bcr-abl/p190, <i>WT1</i> ↔	004/18, 034/1; D10S2325, D2S1360	одинаковые: A(II)Rh+dCCeeK-
В-ОЛЛ ⁴ , 41	t(9;22)(q34;q11)	bcr-abl/p190, <i>WT1</i> ↔	003/18, 005/13; D19S253, SE33	одинаковые: A(II)Rh+dCceeK-
ОМЛ ¹ , M1, 24	t(8;21)(q22;q22)	aml1-eto, <i>WT1</i> ↑	020/1, 025/5; D11S554, D12S391; СЕР Y	O(I)Rh+dCCeeK-/ A(II)Rh+dCCeeK-
ОМЛ ² , M1, 29	не обнаружена	<i>FLT3/ITD</i> , <i>WT1</i> ↑	019/20, 028/20; D2S1360, D8S1132; СЕР Y	одинаковые: A(II)Rh+dCceeK-
ОМЛ ³ , M2, 42	не обнаружена	<i>FLT3/ITD</i> , <i>WT1</i> ↑	015/5, 020/1; D9S1118, D12S391; СЕР Y	AB(IV)Rh+dCceEK-/ B(II)Rh+dCceeK-
ОМЛ ⁴ , M2, 45	не обнаружена	<i>WT1</i> ↑	004/18, 013/6; D11S554, D2S1360	одинаковые: O(I)Rh+dCCeeK-
ОМЛ ⁵ , M2, 40	не обнаружена	<i>WT1</i> ↑	015/5, 018/11; D12S1064, D17S1290	A(II)Rh+dCCeeK-/ O(I)Rh+dCCeeK-
ХМЛ ¹ , хр. ф., 47	t(9;22)(q34;q11)	bcr-abl/p210, E255V, <i>WT1</i> ↔	013/6, 022/10; D10S2325, D12S1064	одинаковые: A(II)Rh+dCceeK-
ХМЛ ² , хр. ф., 55	t(9;22)(q34;q11)	bcr-abl/p210, E255V, <i>WT1</i> ↔	003/18, 034/1; D12S391, D19S253	B(III)Rh+dCceeK-/ A(II)Rh-dCceeK-
ХМЛ ³ , хр. ф., 57	t(9;22)(q34;q11)	bcr-abl/p210, <i>WT1</i> ↔	005/13, 015/5; D7S1517, SE33	B(III)Rh+dCceeK-/ A(II)Rh+dCCeeK-
ХЛЛ ¹ , 47	del11q22.3, del13q14.3, del17p13.1	<i>WT1</i> ↔	015/5, 020/1; D17S1290, SE33	одинаковые: AB(IV)Rh+dCceeK-
ММ ¹ , 24	не обнаружена	<i>WT1</i> ↔	018/11, 005/13; D2S1360, D7S1517	O(I)Rh+dCCeeK-/ A(II)Rh+dCCeeK-
АА ¹ , 35	не обнаружена	<i>WT1</i> ↔	021/4, 028/20; D19S253, MYCL-1	одинаковые: B(III)Rh+dCceeK-/ A(II)Rh+dCCeeK-

Примечание. Верхний индекс: 1- номер пациента, ↑ - количество биомаркера повышено, ↔ - количество биомаркера в норме. В-ОЛЛ - острый В-клеточный лимфобластный лейкоз, ОМЛ - острый миелоидный лейкоз, М1 (М2) - вариант заболевания; ХМЛ - хронический миелолейкоз, хр. ф. - хроническая фаза; ХЛЛ - хронический лимфобластный лейкоз; ММ - множественная миелома; АА - апластическая анемия; МОБ - минимальная остаточная болезнь, ДХ - донорский химеризм.

Таблица 2. Мониторинг биомаркеров донорского химеризма и минимальной остаточной болезни у больных онкогематологическими заболеваниями (n=15) после алло-ТГСК

Диагноз, вариант ТГСК	Биомаркеры МОБ и ДХ	Мониторинг (мес.)										Терапия, исход
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
В-ОЛЛ ¹ , нерод.	InDel	95,0	80,0	60,0	55,0	45,0	-	-	-	-	-	цитозар, дазатиниб, прогрессия ОЛЛ, умер, Д+150
	ABO	80	95	100	100	100	-	-	-	-	-	
	tel-aml1↑	0,22	0,42	76,0	36,9	67,9	-	-	-	-	-	
	WT1↔, км	28,1	35,0	21,5	25,9	34,0	-	-	-	-	-	
	бласти↑	1,0	0,6	49,8	23,0	37,8	-	-	-	-	-	
В-ОЛЛ ² , род.	InDel ^{твм}	97,9 ₁ 60,0 ₂	98,3 ₁ 75,0 ₂	98,1 ₁ 80,0 ₂	98,6 ₁ 98,0 ₂	99,5 ₁ 99,9 ₂	99,4 ₁ 99,9 ₂	95,0 ₁ 99,9 ₂	80,0 ₁ 99,9 ₂	53,3 ₁ 99,9 ₂	49,0 ₁ -	резистентность: иматиниб, нилотиниб; чувствительность: понатиниб, ремиссия, жив, Д+735
	InDel ^{сд34}	- 58,5 ₂	-	96,2 ₁ -	95,1 ₁ -	- 98,9 ₂	- 99,9 ₂	-	-	-	24,2 ₁ -	
	ABO	50 ₁ 100 ₂	80 ₁ 100 ₂	100 ₁ 100 ₂	100 ₁ 100 ₂	100 ₁ 100 ₂	100 ₁ 100 ₂	100 ₁ 100 ₂	100 ₁ 100 ₂	100 ₁ 100 ₂	100 ₁ -	
	bcr-abl/p190↑↓	0,0 ₁ 0,08 ₂	0,0 ₁ 0,2 ₂	0,11 ₁ 0,006 ₂	2,28 ₁ 0,01 ₂	0,44 ₁ 0,0 ₂	0,09 ₁ 1,2 ₂	0,14 ₁ 0,0 ₂	58,0₁ 0,0 ₂	71,7₁ 0,0 ₂	101,2₁ -	
	WT1↑↓, км	0,1 ₁ 72,5 ₂	88,6 ₁ 88,9 ₂	51,7 ₁ 69,3 ₂	218,0 ₁ 62,2 ₂	73,6 ₁ 22,9 ₂	46,2 59,3 ₂	255,1₁ 47,1 ₂	529,3₁ 52,3 ₂	474,7₁ 55,0 ₂	621,5₁ -	
	бласти↑↓	0,8 ₁ 0,2 ₂	0,4 ₁ 1,0 ₂	0,3 ₁ 0,4 ₂	0,2 ₁ 1,2 ₂	1,5 ₁ 1,1 ₂	0,4 ₁ 1,0 ₂	1,4 ₁ 0,7 ₂	46,0₁ 0,2 ₂	17,2₁ 0,5 ₂	47,8₁ -	
В-ОЛЛ ³ , род.	InDel	99,8	99,8	99,8	99,9	99,9	99,9	-	-	-	иматиниб, ремиссия, жив, Д+545	
	ABO ⁼	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	bcr-abl/p190	0,72	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-	-	-		
	WT1↓, км	48,7	45,1	39,5	36,1	32,2	16,9	-	-	-		
	бласти	1,2	0,8	1,0	1,0	1,1	0,6	-	-	-		
В-ОЛЛ ⁴ , род.	InDel	95,0 ₁ 93,0 ₂	95,0 ₁ 90,0 ₂	93,0 ₁ 88,0 ₂	85,0 ₁ 88,0 ₂	97,0 ₁ -	97,5 ₁ -	96,9 ₁ -	98,0 ₁ -	94,0 ₁ -	85,0 ₁ -	резистентность: иматиниб, дазатиниб, нилотиниб, прогрессия ОЛЛ, умер, Д+1095
	ABO ⁼	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	bcr-abl/p190↑	0,0 ₁ 0,01 ₂	0,0 ₁ 0,23 ₂	0,24 ₁ 0,1 ₂	39,6₁ 0,03 ₂	0,55 ₁ -	0,0 ₁ -	0,56 ₁ -	29,4₁ -	13,2₁ -	82,7₁ -	
	WT1↔, км	48,3 ₁ 10,0 ₂	55,6 ₁ 23,8 ₂	67,4 ₁ 20,2 ₂	13,8 ₁ 44,7 ₂	81,0 ₁ -	86,0 ₁ -	82,5 ₁ -	10,5 ₁ -	-	13,4 ₁ -	
	бласти↑	1,0 ₁ 1,0 ₂	2,0 ₁ 0,2 ₂	2,1 ₁ 0,7 ₂	35,4₁ 0,6 ₂	1,0 ₁ -	0,6 ₁ -	1,1 ₁ -	60,0₁ -	-	10,8 ₁ -	
ОМЛ ¹ M1, род.	InDel	94,1	96,3	97,8	97,9	97,2	98,0	99,8	99,9	99,9	99,9	азациитидин, экстрамедуллярный рецидив, прогрессия ОМЛ, умер, Д+395
	ABO	50	50	100	100	100	100	100	100	100	100	
	aml1-eto	0,0	0,0	0,04	0,12	2,1	2,3	2,9	3,9	0,0	0,0	
	WT1↔, км	134,2	135,0	95,1	43,2	90,4	100,5	111,4	188,0	128,5	125,4	
	WT1↑, п/кровь	27,5	121,4	48,5	42,9	35,2	34,1	42,0	314,9	41,0	39,0	
бласти	1,2	1,2	0,0	1,0	0,8	0,6	0,0	0,8	0,6	0,6		
ОМЛ ² M1, род. FLT3/ITD	InDel	97,0	97,0	96,0	90,0	95,0	95,0	-	-	-	-	азациитидин, прогрессия ОМЛ, умер, Д+240
	ABO ⁼	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	WT1↑, п/кровь	53,0	26,2	78,0	55,0	21,0	70,6	-	-	-	-	
	бласти↑	0,8	1,0	2,2	98,0	1,0	1,2	-	-	-	-	
ОМЛ ³ M2, род. FLT3/ITD	InDel	89,1 ₁ 97,0 ₂	97,0 ₁ 97,0 ₂	99,0 ₁ -	99,0 ₁ -	98,0 ₁ -	98,0 ₁ -	97,0 ₁ -	94,8 ₁ -	89,0 ₁ -	89,0 ₁ -	азациитидин, прогрессия ОМЛ, умер, Д+485
	ABO	50 ₁ 100 ₂	100 ₁ 100 ₂	100 ₁ -	100 ₁ -	100 ₁ -	100 ₁ -	100 ₁ -	100 ₁ -	100 ₁ -	100 ₁ -	
	WT1↑, км	88,0 ₁ 59,5 ₂	58,5 ₁ 290,0₂	51,9 ₁ -	110,5 ₁ -	135,1 ₁ -	24,4 ₁ -	427,7₁ -	558,0₁ -	977,0₁ -	112,2 ₁ -	
	бласти↑	0,6 ₁ 1,6 ₂	1,2 ₁ 42,2₂	0,4 ₁ -	0,8 ₁ -	1,0 ₁ -	0,6 ₁ -	2,2 ₁ -	15,0₁ -	37,0₁ -	0,3 ₁ -	
ОМЛ ⁴ M2, род.	InDel	98,6	99,4	99,6	99,1	99,0	98,9	99,1	98,9	99,9	99,9	Д+1825, ремиссия, жив
	ABO ⁼	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	WT1, км	55,2	3,2	90,1	103,7	82,7	88,7	107,1	42	52,5	39,6	
	бласти	0,8	1,0	0,0	0,3	0,2	0,2	0,1	0,1	0,5	0,4	
ОМЛ ⁵ M2, род.	InDel	95,0	96,0	96,0	96,4	-	-	98	98,6	98,9	99,9	Д+2372, ремиссия, жив
	ABO	50	95	100	100	-	-	100	100	100	100	
	WT1, км	62,5	70,1	78,5	0,5	-	-	2,5	3,4	61,4	39,5	
	бласти	1,0	1,0	1,2	1,0	-	-	1,1	1,2	1,0	0,6	

МОНИТОРИНГ ДОНОРСКОГО ХИМЕРИЗМА И МИНИМАЛЬНОЙ ОСТАТОЧНОЙ БОЛЕЗНИ

Таблица 2. Мониторинг биомаркеров донорского химеризма и минимальной остаточной болезни у больных онкогематологическими заболеваниями (n=15) после алло-ТГСК (продолжение)

Диагноз, вариант ТГСК	Биомаркеры МОБ и ДХ	Мониторинг (мес.)										Терапия, исход
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
ХМЛ ¹ хр. ф., род. гаплогенотипическая, ABL/E255V	InDel	10,1 ₁ 98,0 ₂	10,1 ₁ 99,0 ₂	30,5 ₁ 99,8 ₂	25,8 ₁ 99,8 ₂	- 99,9 ₂	- 99,9	- 99,9 ₂	- 99,9	- 99,9 ₂	- 99,9 ₂	иматиниб, ремиссия, жив, Д+555
	ABO ⁼	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	
	bcr-abl/p210 [↑]	6,1 ₁ 0,04 ₂	29,7 ₁ 0,0 ₂	32,7 ₁ 0,02 ₂	33,2 ₁ 0,04 ₂	- 0,01 ₂	- 0,13 ₂	- 0,02 ₂	- 0,0 ₂	- 0,01 ₂	- 0,0 ₂	
	бласты [↑]	3,4 ₁ 0,1 ₂	0,4 ₁ 0,1 ₂	0,9 ₁ 0,0 ₂	3,8 ₁ 0,0 ₂	- 0,0 ₂	- 0,8 ₂	- 1,0 ₂	- 0,9 ₂	- 1,0 ₂	- 1,0 ₂	
ХМЛ ² хр. ф., род. ABL/E255V	InDel	97,0	98,0	98,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	иматиниб, ремиссия, жив, Д+699
	ABO	50	100	100	100	100	100	100	100	100	100	
	bcr-abl, p210	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	бласты	0,4	1,2	0,0	0,6	0,2	0,5	0,0	0,1	0,3	0,0	
ХМЛ ³ хр. ф., род.	InDel	80,0	80,0	50,0	48,0	85,0	95,6	-	-	-	-	резистентность: иматиниб, дазатиниб, нилотиниб, прогрессия ХМЛ, сепсис, умер, Д+221
	ABO	50,0	95,0	100	100	100	100	-	-	-	-	
	bcr-abl, p210	0,63	1,39	1,6	4,03	1,1	1,2	-	-	-	-	
	бласты	1,2	2,2	0,1	1,0	1,0	1,1	-	-	-	-	
ХЛЛ ¹ , род.	InDel	51,2	51,9	94,2	93,0	-	-	-	-	-	-	профилактика РТПХ, прогрессия ХЛЛ, умер, Д+130
	ABO ⁼	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	del17p13.1	25,0	20,0	12,0	12,0	-	-	-	-	-	-	
	бласты	1,2	3,1	1,0	0,9	-	-	-	-	-	-	
ММ ¹ , род.	InDel	93,0	95,0	97,8	99,0	-	-	-	-	-	-	Д+1642, ремиссия, жив
	ABO	95,0	100	100	100	-	-	-	-	-	-	
	бласты	0,2	0,8	0,1	1,2	-	-	-	-	-	-	
АА ¹ , род.	InDel	90,0	95,0	94,0	99,0	-	-	-	-	-	-	Д+1825, ремиссия, жив

Примечание. Верхний индекс: ¹ - номер пациента, [↑], [↓], [↔] - количество биомаркера повышено, понижено, в норме, = - одинаковая группа крови (ABO) у реципиента и донора. Нижний индекс: ₁, ₂ - первая и вторая ТГСК. InDel - полиморфизм инсерций-делеционных локусов ДНК, ABO - группа крови, МОБ - минимальная остаточная болезнь, ДХ - донорский химеризм, Д+ - дни после ТГСК, В-ОЛЛ - острый В-клеточный лимфобластный лейкоз, ОМЛ - острый миелоидный лейкоз, М1(М2) - вариант заболевания; ХМЛ - хронический миелолейкоз, хр. ф. - хроническая фаза, км - костный мозг; ТГСК - трансплантация гемопоэтических стволовых клеток, ABL/E255V - мутация в тирозинкиназном домене гена ABL, FLT3/ITD - мутация в околомембранном домене гена FLT3; InDel^{ТБМ} - полиморфизм ДНК (цельный костный мозг); InDel^{CD34} - полиморфизм ДНК (популяция клеток CD34).

Выделение ДНК

Экстракцию ДНК выполняли из 0,2 мл периферической крови и/или 1 мл костного мозга, а также 0,1 мл суспензии клеток CD34 с использованием коммерческого набора реактивов QIAamp DNA mini kit ("Qiagen", Германия), предназначенного для выделения ДНК на колонках. Перед изолированием ДНК из периферической крови (костного мозга) проводили лизирование эритроцитов, за которым следовали этапы центрифугирования и сохранения осадка. К осадку ядродержащих клеток добавляли лизирующий раствор и дальнейшую экстракцию ДНК выполняли согласно прилагаемому протоколу. Элюирование ДНК проводили с использованием 100 мкл буфера для элюции. Для элюирования ДНК, экстрагированной из клеток-предшественниц CD34, использовали 30 мкл буфера для элюции. Полученные образцы ДНК хранили при -20°C до момента постановки ПЦР.

Скрининг полиморфизма Y-, STR-локусов и количественный анализ ДХ

Для поиска информативных биомаркеров в парах донор-реципиент амплифицировали 10 нг ДНК с использованием коммерческих олигонуклеотидов и реактивов ПЦР, предназначенных для тестирования специфических последовательностей STR-локуса. Количественную оценку ДХ проводили после выполнения фрагментного анализа для STR-локусов ДНК и гибридизации *in situ* с флуоресцентной меткой (FISH) для специфических участков Y-хромосомы, как описано ранее [7, 14].

Скрининг полиморфизма InDel-локусов и количественный анализ ДХ

Поиск информативных InDel-локусов ДНК проводили до ТГСК в парах донор-реципиент. Для этого амплифицировали 10 нг ДНК с использованием коммерческой лиофилизированной

панели AlleleSEQR Chimerism Screening Plate и набора реактивов для ПЦР, а именно: 5xPCR Master Mix (“Abbot”, Германия). По результатам тестирования InDel-локусов ДНК (n=34) отбирали не менее 2 информативных биомаркеров, которые использовали для количественной оценки уровней ДХ. С целью количественного определения ДХ амплифицировали 20 нг ДНК, изолированной из ядросодержащих клеток пациента до и после ТГСК. Анализ ДХ выполняли по каналу FAM с помощью программного обеспечения к термоциклеру (“Applied Biosystems”, США) и расчетной формулы: $2^{-\Delta\Delta Ct} * 100\%$, где $\Delta\Delta Ct$ – разница между пороговыми циклами для образцов ДНК пациента до и после ТГСК [6]. Следует отметить, что повышенный уровень ДХ определяли после обнаружения $\geq 95\%$, но $< 99\%$ донорских клеток у реципиента. Тогда как полный (смешанный) ДХ определяли после выявления $\geq 99\%$ ($< 95\%$) донорских клеток у реципиента.

Цитогенетическое исследование

Культивирование клеток костного мозга и/или периферической крови больных лейкозом, приготовление препаратов хромосом и последующее дифференциальное окрашивание хромосом выполняли по стандартной методике [15]. Интерпретацию патологии кариотипа производили после анализа 20 митозов и/или 200 интерфазных ядер после выполнения FISH.

Выделение РНК и синтез кДНК

Экстракцию РНК выполняли из 1,5 мл периферической крови и/или 1 мл костного мозга больных и доноров с использованием коммерческого набора реактивов QIAamp RNA Blood mini kit (“Qiagen”), предназначенного для выделения РНК на колонках. Перед изолированием РНК из периферической крови (костного мозга) проводили лизирование эритроцитов, за которым следовали этапы центрифугирования и сохранения осадка. К осадку ядросодержащих клеток добавляли лизирующий раствор и дальнейшую экстракцию РНК выполняли согласно прилагаемому протоколу. Элюирование РНК проводили с использованием 30 мкл буфера для элюции. Полученные образцы РНК хранили при -70°C до момента постановки обратной транскрипции (ОТ). Реакцию ОТ проводили с использованием коммерческого набора реактивов, предназначенного для синтеза кДНК, а именно: RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (“Fermentas”, Литва).

Скрининг онкогенов

Выявление онкогенов-мишеней проводили у больных лейкозом в дебюте заболевания. Образец кДНК амплифицировали с использованием микрочипов и отечественных реактивов (“Евроген”, Россия), включая праймеры и зонды, предназначенные для обнаружения наиболее распространённых вариантов онкогенов (n=15): bcr-abl (p190, p210), aml1-eto, tel-aml1, sil-tal1, mll-af4 (a,b), pml-rara (1/2/3), e2a-pbx1, rbm15-mkl1, cbfb-myh11 (a,d,e) и референсного

гена *ABL*, как описано ранее [11]. Анализ результатов ПЦР выполняли по каналу FAM с помощью прилагаемого программного обеспечения к термоциклеру AtiaDNA (“Люмэкс”, Россия).

Количественное определение МОБ

Для количественной оценки МОБ или определения уровней экспрессии мРНК транскриптов вышеперечисленных онкогенов, а также гена *WT1* и референс-гена *ABL*, образец кДНК в количестве 100 нг амплифицировали по стандартному протоколу ПЦР с использованием пробирок и набора реактивов для ПЦР, а именно: Fusion Quant kit for RT-QPCR (“Qiagen”) и Universal PCR Master Mix (“Applied Biosystems”) [16, 17]. Анализ результатов выполняли по каналу FAM с помощью программного обеспечения к термоциклеру “Rotor-Gene 6000” (“Corbet Research”, Австралия) после построения калибровочных кривых со стандартными разведениями плазмидных ДНК (10^1 - 10^6).

Скрининг мутаций генов *ABL* и *FLT3*

Анализ точечных мутаций, локализованных в тирозинкиназных доменах (TKD) генов *ABL* и *FLT3*, а также мутаций типа внутренних tandemных дубликаций (ITD), расположенных в околомембранном домене гена *FLT3*, выполняли с помощью прямого секвенирования по методу Сэнгера с использованием секвенатора ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (“Applied Biosystems”), как описано ранее [18, 19].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Первоначально, для определения биомаркеров ДХ проводили скрининг мишеней в парах донор-реципиент с использованием иммунологических и молекулярно-генетических методов исследования, оценивая в то же время информативность каждого из тестов. Для оценки ДХ выполняли фенотипирование антигенов эритроцитов (ABO, Резус, Келл), включая идентификацию группы крови, и генотипирование специфических последовательностей ДНК, а именно: InDel-, STR- и Y-локусов. Было показано, что наиболее информативным методом анализа ДХ является оценка полиморфизма InDel-локусов ДНК. Согласно полученным результатам, этот вариант тестирования позволяет отличить все пары донор-реципиент (n=15) с выявлением различий по не менее, чем 2 из 34 исследуемых биомаркеров (табл. 1). В то же время, оценка полиморфизма STR-локусов ДНК показала, что одна из анализируемых пар донор-реципиент (больной ОЛЛ²), отличалась только по 1 (P450CYP19) из 13 изучаемых биомаркеров-мишеней, описанных ранее [7]. Что касается двух других вариантов анализа ДХ, в частности, оценки полиморфизма специфического участка Y-хромосомы, с использованием FISH и иммунофенотипирования антигенов эритроцитов с идентификацией группы крови, то они позволяют отличить только 4 и 8 из 15 исследуемых пар донор-реципиент, соответственно. Таким образом, анализ полиморфизма InDel-локусов ДНК для оценки

МОНИТОРИНГ ДОНОРСКОГО ХИМЕРИЗМА И МИНИМАЛЬНОЙ ОСТАТОЧНОЙ БОЛЕЗНИ

ДХ у онкогематологических больных характеризуется высокой информативностью. Известно, что выявление не менее 2 биомаркеров-мишеней тестируемого варианта полиморфизма повышает точность количественного определения ДХ. Также следует отметить, что в настоящем исследовании была подтверждена чувствительность количественной ПЦР (AlleleSEQR-PCR) для анализа полиморфизма InDel-локусов ДНК после тестирования серии разведений ДНК (10%, 1%, 0,1%, 0,01%), приготовленных на основе смешивания образцов ДНК донора и реципиента. Показано, что она не отличается от чувствительности заявленной производителем и позволяет обнаружить разведение ДНК реципиента до 0,01%, что соответствует среднему значению порогового цикла $37,2 \pm 0,1$.

После скрининга биомаркеров ДХ у пациентов (n=15) в дебюте заболевания проводили мониторинг ДХ в посттрансплантационный период. Согласно результатам исследования, в большинстве случаев была обнаружена корреляционная зависимость между уровнями ДХ, выявленными разными тестами, в которых наряду с оценкой полиморфизма InDel-локусов ДНК определяли один из вариантов полиморфизма (STR-, Y-) или группы крови,

идентифицируемой вместе с фенотипом антигенов эритроцитов. При этом среднее отклонение между уровнями ДХ, которые определяли после анализа полиморфизма InDel- и STR-локусов ДНК, составило: 8% (ОЛЛ¹), 7% (ОЛЛ²), 1,66% (ОМЛ¹) и 1,18% (ОМЛ²). В то же время среднее отклонение между уровнями ДХ при тестировании полиморфизма InDel- и Y- локусов ДНК составило: 25% (В-ОЛЛ¹), 1,7% (ОМЛ¹), 4,5% (ОМЛ²) и 3,3% (ОМЛ³). И, наконец, среднее отклонение между уровнями ДХ при тестировании полиморфизма InDel-локусов ДНК и фенотипа антигенов эритроцитов (группы крови) составило: 6% (В-ОЛЛ¹), 19,3% (В-ОЛЛ²), 10% (ОМЛ¹), 6,93% (ОМЛ³), 2,27% (ОМЛ⁵), 5% (ХМЛ²), 24,4% (ХМЛ³), 2,28% (ММ1). На рисунках 1 и 2 представлены результаты мониторинга ДХ у больных острым лейкозом (В-ОЛЛ¹, В-ОЛЛ²) с использованием 4-х тестов. Показано, что, несмотря на возможность мониторинга ДХ с использованием разных тестов, выполнение анализа полиморфизма InDel-локусов ДНК у больных онкогематологическими заболеваниями, получающих алло-ТГСК, является предпочтительным из-за его более высокой чувствительности. Также, следует отметить, что согласно более раннему исследованию,

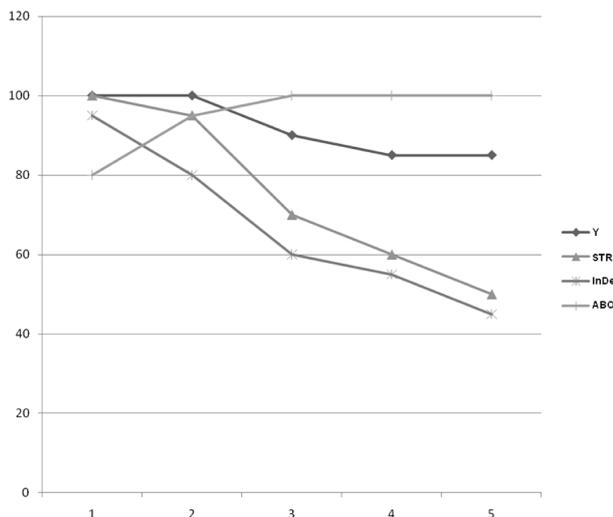


Рисунок 1. Мониторинг биомаркеров ДХ у больного В-ОЛЛ¹ (tel-aml1) на основе тестирования полиморфизма InDel-, STR-, Y- локусов ДНК и группы крови (ABO). Здесь и на рисунке 2: по оси ОХ - уровень ДХ (%); по оси ОУ - периодичность мониторинга (мес.); * - значком отмечен профиль полиморфизма InDel; ▲ - значком отмечен профиль полиморфизма STR; ◆ - значком отмечен профиль полиморфизма Y; + - значком отмечен профиль группы крови (ABO).

Таблица к рисунку 1.

Периодичность мониторинга, мес.	Уровень биомаркера			
	ABO	InDel	SNP	Y
1	80	95	100	100
2	95	80	95	100
3	100	60	70	90
4	100	55	60	85
5	100	45	50	85

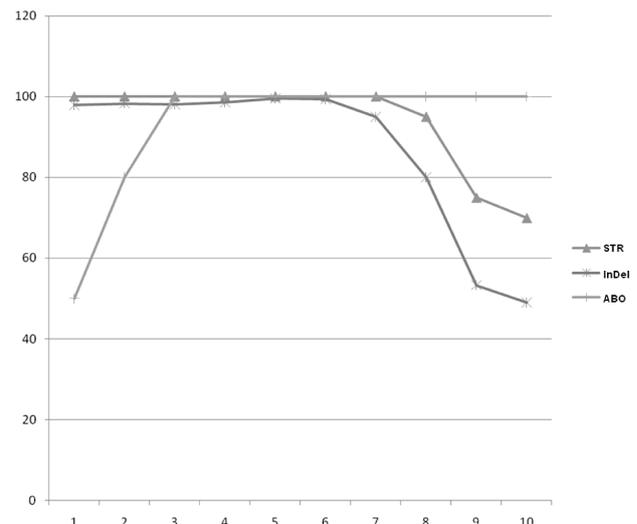


Рисунок 2. Мониторинг биомаркеров ДХ у больного В-ОЛЛ² (Ph+, bcr-abl/p190) на основе тестирования полиморфизма InDel-, STR-локусов ДНК и группы крови (ABO).

Таблица к рисунку 2.

Периодичность мониторинга, мес.	Уровень биомаркера		
	ABO	InDel	STR
1	50	97,9	100
2	80	98,3	100
3	100	98,1	100
4	100	98,6	100
5	100	99,5	100
6	100	99,4	100
7	100	95,0	100
8	100	80,0	95
9	100	53,3	75
10	100	49,0	70

чувствительность анализа STR-локусов ДНК для оценки ДХ у больных ОМЛ, получающих алло-ТГСК и немиелоаблативное кондиционирование, может быть понижена [20, 21]. В таких случаях для отслеживания посттрансплантационных осложнений и, в частности, рецидивов, авторы рекомендуют выполнять мониторинг экспрессии онкогена *WT1*.

В настоящем исследовании у всех пациентов (n=15) проводили мониторинг биомаркеров ДХ, а также дополнительно тестировали биомаркеры-мишени МОБ. Для скрининга и мониторинга биомаркеров МОБ выполняли цитогенетический анализ хромосомных aberrаций и количественный анализ экспрессии онкогенов, включая *WT1*, а также, CD-маркеров. Оценка экспрессии двух последних биомаркеров-мишеней является клинически значимой и особенно актуальной для прогноза рецидивов при ОМЛ, согласно недавно опубликованным результатам [22]. При этом исследователи обнаружили, что повышение уровней экспрессии онкогена *WT1* и параллельное нарастание уровня экспрессии CD-маркеров в костном мозге у больных ОМЛ, получающих алло-ТГСК, как правило, предшествует появлению смешанного ДХ и развитию рецидива. В настоящей работе оценка биомаркеров ДХ с использованием иммунологического тестирования позволила обнаружить у большинства пациентов (7/8) через 2-3 месяца после алло-ТГСК полную смену группы крови реципиента, включая фенотип антигенов эритроцитов, на группу крови донора, подтвердив наличие полной химеры (ПХ, 100%) (табл. 2). Однако, только у 5 из 8 пациентов выявление ПХ коррелировало с повышенным уровнем ДХ ($\geq 95\%$) или полным ДХ (99,9%), согласно результатам анализа полиморфизма InDel локусов ДНК. У остальных трёх больных обнаружение повышенных уровней ДХ (InDel) отмечали спустя 6 месяцев после ТГСК (ХМЛ²) или не отмечали и в более поздний период (В-ОЛЛ¹, В-ОЛЛ²). Следует отметить, что всем трём пациентам проводили переливание эритроцитарной массы доноров, что могло привести к названным различиям между показателями ДХ (InDel и ABO).

Сравнительный анализ полиморфизма InDel-локусов ДНК у исследуемых больных позволил обнаружить у большинства из них (12/15) повышенный уровень ДХ ($\geq 95\%$) через 1-2 месяца после ТГСК. Тем не менее, у двух пациентов (ОМЛ², ОМЛ³) – носителей мутации онкогена FLT3/ITD из группы больных ОМЛ (n=5) – уровень ДХ снизился до 90,0% и 94,0% спустя 4 и 8 месяцев после ТГСК, соответственно. При этом, уровень экспрессии онкогена *WT1* у обоих пациентов увеличивался и превышал норму, как в периферической крови, так и в костном мозге. Повышенная экспрессия *WT1* была обнаружена за 1 месяц до снижения уровня ДХ и за 2 месяца до возникновения костномозгового рецидива. Следует отметить, что в настоящей работе перед выполнением количественной оценки экспрессии онкогена *WT1* у пациентов проводили определение пороговых уровней экспрессии *WT1* в костном мозге и

периферической крови среди здоровых доноров (n=30). Было показано, что они не отличались от пороговых уровней экспрессии *WT1*, обнаруженных для группы здоровых доноров в исследовании, опубликованном ранее, и составляли < 250 и 50 копий гена *WT1* на 10^4 копий гена *ABL* для костного мозга и периферической крови, соответственно [23]. Кроме того, наряду с увеличением экспрессии онкогена *WT1* у вышеназванных пациентов, отмечали повышенные уровни экспрессии CD-маркеров: CD15+(73,5%↑), CD38+(95,8%↑) для ОМЛ², а также CD38+(89,8%↑), CD117+(79,2%↑) для ОМЛ³, что свидетельствовало о нарастании МОБ при ОМЛ и неблагоприятном прогнозе заболевания. При этом у больного ОМЛ² была выявлена популяция клеток с суммарным фенотипом: CD11b+/CD11c+/CD13+/CD15+/CD33+/CD34+/CD38+/CD65+/CD117+/, а у больного ОМЛ³ отмечена коэкспрессия CD-маркеров: CD13+/CD33+/CD34+/CD38+/CD64+/CD117+. Впоследствии оба пациента скончались из-за прогрессии лейкоза. Их общая выживаемость (ОВ) составила 0,6 года (Д+240) для ОМЛ² и 1,3 года (Д+485) для ОМЛ³. Ещё у одного пациента (ОМЛ¹) из группы больных ОМЛ, наряду с выявлением повышенных уровней ДХ (96,0-99,9%) через 2 месяца после ТГСК и позже, была отмечена сверхэкспрессия онкогена *WT1* в периферической крови ($121,4$ копий/ 10^4 копий *ABL*). Тем не менее, экспрессия *WT1* в костном мозге оставалась в пределах нормы ($135,0$ копий/ 10^4 копий *ABL*). Спустя 3 месяца уровень *WT1* в периферической крови достиг максимально высокого уровня ($314,9$ копий/ 10^4 копий *ABL*) на фоне костномозговой ремиссии (0,8% бластных клеток). При этом у пациента отмечалось развитие экстрамедуллярного рецидива с поражением парапанкреатических и параяремных лимфоузлов. У пациента также выявили повышенные уровни экспрессии онкогена *aml1-eto* (3,9%) и CD-маркеров, в частности, CD13+(87,8%↑), CD117+(79,2%↑), CD200+(82,9%↑), последние из которых были коэкспрессированы в популяции клеток с суммарным фенотипом: CD11c-/CD13+/CD33+/CD34+/CD38+/CD56+/CD117+/CD200+/. После курса поддерживающей химиотерапии деметилирующими агентами (азациитидин, 32 мг/м²) у пациента была достигнута полная клинико-гематологическая ремиссия (ПКГР). Однако позже (вне стационара), у пациента развился рецидив с последующим летальным исходом. При этом ОВ больного ОМЛ¹ составила 1,1 год (Д+395). Таким образом, выполнение у всех исследуемых больных ОМЛ (n=5) одновременного мониторинга ДХ (InDel-локусы ДНК) и МОБ, включая оценку уровней экспрессии онкогена *WT1* и CD-маркеров, позволяет эффективнее контролировать течение заболевания в посттрансплантационный период, что согласуется с результатами более раннего исследования [22].

Что касается больных В-ОЛЛ (n=4), то у одного (В-ОЛЛ²) из них через 7 месяцев после ТГСК был обнаружен повышенный уровень ДХ (95%) и, одновременно, отмечалось нарастание экспрессии онкогенов в костном мозге (*WT1*: $255,1$ копий/ 10^4 копий *ABL*, *bcr-abl/p190*: 0,14%).

В то же время выявление у пациента повышенных уровней экспрессии CD-маркеров: CD19+(93,0%↑) и CD34+(90,7%↑) в популяции клеток с суммарным фенотипом: CD10+/CD19+/CD20-/CD22+/CD34+cytCD79a+/nuTdT+/ свидетельствовало о нарастании МОБ при В-ОЛЛ. В дальнейшем, у этого пациента развился костномозговой рецидив (бластные клетки: 46%, bcr-abl/p190: 58,0%, ДХ: 80%). Следует отметить, что в течение первых месяцев после ТГСК этому больному не проводили инфузий донорских лимфоцитов. Однако, из-за обнаружения прямо-пропорциональной зависимости между уровнями ДХ и МОБ через 3-4 месяца после ТГСК, потребовалось провести более точную оценку ДХ. С этой целью у пациента анализировали полиморфизм InDel локусов с использованием двух разных образцов ДНК. При этом один из образцов ДНК экстрагировали из клеток цельного костного мозга (КМ) больного, а другой – из клеток-предшественниц CD34, изолированных из КМ с использованием метода проточной цитометрии (рис. 3). В результате было показано, что через 4 месяца после ТГСК у больного В-ОЛЛ² уровень ДХ был ниже в клетках-предшественницах CD34 (96,2%→95,1%) по сравнению с уровнем ДХ в цельном костном мозге (98,1%→98,6%) (рис. 4). В последующие 3 месяца у этого пациента уровень ДХ вначале повышался до 99,5%, а затем снижался до 95%, тем не менее, оставаясь достаточно высоким. Следует отметить, что у пациента обнаруживали в течении 2-х месяцев обратно-пропорциональную зависимость между уровнем ДХ (InDelCD34) и МОБ; при этом отмечали рост экспрессии онкогена *WT1* (218,3 копий/10⁴ копий *ABL*) и экспрессии bcr-abl/p190 (2,28%). После назначения больному иматиниба (200 мг) экспрессия *WT1* вначале снижалась до 46,2, а затем повышалась до 255,1 копий/10⁴ копий *ABL* и выше, что было связано с возникновением устойчивости к лечению и развитием костномозгового рецидива. Замена

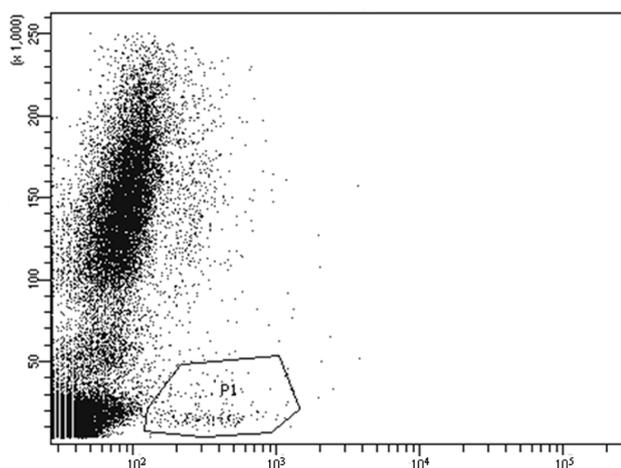


Рисунок 3. Изолирование популяции клеток CD34 из костного мозга больного В-ОЛЛ² (Ph+, bcr-abl/p190) с использованием метода проточной цитометрии. По оси OX - уровень экспрессии антигена CD34. По оси OY - уровень гранулярности клеток SSC. (P1) - значком отмечен профиль популяции клеток CD34.

иматиниба нилотинибом (800 мг) привела только к частичной редукции бластных клеток (46%-17,2%). В дальнейшем, была предпринята терапия понатинибом (45 мг), что, в конечном итоге, привело к ПКГР (рис. 4). Затем пациенту была проведена вторая алло-ТГСК от того же родственного донора. В настоящее время (9 месяцев после ТГСК) у больного ОЛЛ² отмечается ПКГР и молекулярная ремиссия. Все показатели соответствуют норме, включая полный ДХ ($\geq 99,9\%$). Также, у пациента не было обнаружено экспрессии соответствующих CD-маркеров и онкогена bcr-abl/p190, а экспрессия *WT1* сохранялась в пределах нормы, как в КМ, так и в периферической крови. При этом ОВ пациента составила 1,8 года (Д+665). И, наконец, ещё у одного пациента (В-ОЛЛ¹, Ph+, bcr-abl/p190) через 3 месяца после первой ТГСК и впоследствии через 2 месяца после второй ТГСК, обнаружили снижение уровней ДХ до 85% и 88%, соответственно. Также было отмечено, что в дебюте заболевания и в посттрансплантационном периоде уровень экспрессии онкогена *WT1* не был повышен и находился в диапазоне 10,5-48,0 копий/10⁴ копий *ABL*, как в КМ, так и в периферической крови. Тем не менее, экспрессия онкогена bcr-abl/p190 продолжала персистировать и достигала максимально высоких значений (29,4-39,6%) на момент обнаружения костномозгового рецидива. Кроме того, в КМ пациента была выявлена популяция бластных клеток с суммарным фенотипом: CD10+/CD19+/CD22+/CD20+/CD34+/cyt79a+/nuTdT+/. При этом, отмечалась повышенная экспрессия CD22+(99,0%↑) и CD34+(95,8%↑), что коррелировало с прогрессией В-ОЛЛ. У трёх остальных больных (ОЛЛ¹; ХЛЛ¹; ХМЛ³) из 15 исследуемых пациентов через 1-2 месяца после ТГСК был обнаружен смешанный ДХ (<95%). При этом уровень экспрессии онкогена *WT1* оставался средним, не превышая показателей, обнаруженных в дебюте заболевания. Тем не менее, уровень мутаций заметно нарастал: tel-am11 (0,22-0,42-76,0%) при ОЛЛ¹ или снижался незначительно: bcr-abl/p210 (4,0-1,1-1,2%) при ХМЛ³, del13q14.3 (93-25%), del17p13.1 (90-12%) и del11q22.3 (7-5%) при ХЛЛ¹. Следует отметить, что у больного В-ОЛЛ¹ через 3 месяца после ТГСК, наряду с нарастанием экспрессии химерного онкогена tel-am11, также выявили популяцию бластных клеток с aberrантным фенотипом: CD10+/CD19+/CD34-/CD20-/CD22+CD38+/nuTdT+/. При этом отмечали повышенную экспрессию CD-маркеров: CD19+(97,0%↑) и CD22+(95,8%↑), что коррелировало с прогрессией лейкоза. Что касается больного ХЛЛ¹, то через 2 месяца после ТГСК, кроме вышеназванных делеций, обнаружили популяцию В-клеток, коэкспрессирующих CD-маркеры: CD5+/CD19+/CD20-/CD22+/CD43+/CD79b+/CD81+/. При этом экспрессия некоторых из них была также повышена: CD19+(15,2%↑), CD22(12,7%↑), CD43(13,6%↑). И, наконец, у больного ХМЛ³ через 1 месяц после ТГСК обнаружили ПКГР и цитогенетическую ремиссию, однако, без достижения молекулярной ремиссии (bcr-abl/p210: 0,63%). Спустя 4 месяца, на фоне снижения ДХ (48%),

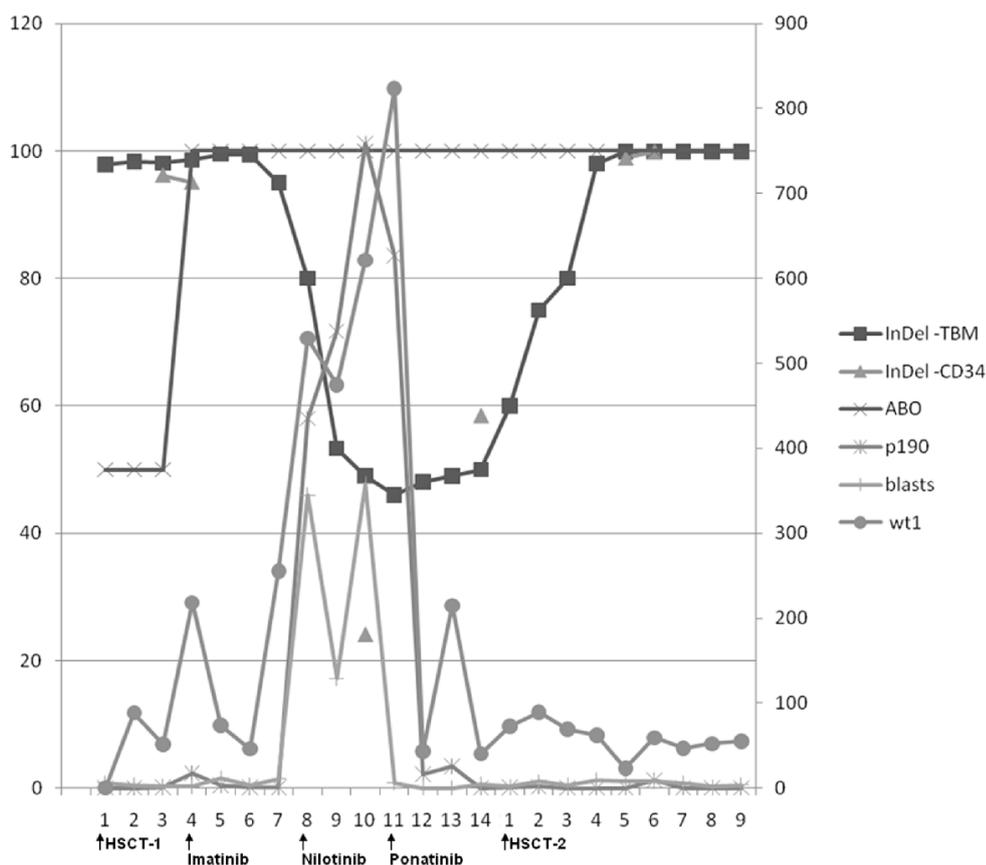


Рисунок 4. Мониторинг биомаркеров ДХ и МОБ у больного В-ОЛЛ² (Ph+, bcr-abl/p190). По оси ОХ - периодичность мониторинга (мес.). По оси ОУ (слева) - уровень биомаркеров ДХ и МОБ. По оси ОУ (справа) - уровень бластных клеток в костном мозге. ■ - значком отмечен профиль полиморфизма InDel^{TBM} локусов ДНК (в целомом костном мозге); ▲ - значком отмечен профиль полиморфизма InDel^{CD34} локусов ДНК (в популяции клеток CD34); × - значком отмечен профиль группы крови (ABO); * - значком отмечен профиль экспрессии онкогена bcr-abl/p190; ● - значком отмечен профиль экспрессии онкогена *WT1*; + - значком отмечен профиль бластных клеток костного мозга.

Таблица к рисунку 4.

Периодичность мониторинга, мес.	Уровень биомаркера					
	ABO	InDel ^{TBM}	InDel ^{CD34}	bcr-abl/p190	<i>WT1</i>	бластные клетки
1 ^{ТГСК1}	50	97,9	-	0,0	0,1	0,8
2	50	98,3	-	0,0	88,6	0,4
3	50	98,1	96,2	0,11	51,7	0,3
4	100	98,6	95,1	2,28	218,3	0,2
5	100	99,5	-	0,44	73,6	1,5
6	100	99,4	-	0,09	46,2	0,4
7	100	95,0	-	0,14	255,1	1,4
8	100	80,0	-	58,0	529,3	46,0
9	100	53,3	-	71,7	474,7	17,2
10	100	49,0	24,2	101,2	621,5	47,8
11	100	46,0	-	83,6	823,2	0,8
12	100	48,0	-	2,11	43,5	0,0
13	100	49,0	-	3,45	214,9	0,0
14	100	50,0	-	0,01	40,2	0,6
1 ^{ТГСК2}	100	60,0	58,5	0,081	72,9	0,2
2	100	75,0	-	0,2	88,9	1,0
3	100	80,0	-	0,006	69,3	0,4
4	100	98,0	-	0,01	62,2	1,2
5	100	99,9	98,9	0,0	22,9	1,1
6	100	99,9	99,9	1,2	59,3	1,0
7	100	99,9	-	0,0	47,1	0,7
8	100	99,9	-	0,0	52,3	0,2
9	100	99,9	-	0,0	55,0	0,5

у пациента было выявлено увеличение экспрессии онкогена bcr-abl/p210 в 6,3 раза (4,0%). Спустя ещё 2 месяца отмечено увеличение уровня ДХ (95,6%). Однако, у пациента сохранялась экспрессия онкогена bcr-abl/p210 (1,2%), что коррелировало с устойчивостью к тирозинкиназным ингибиторам (нилотиниб, дазатиниб). Из-за обострения пневмонии, развития тяжёлой формы инвазивного аспергиллёза лёгких и сепсиса больной ХМЛ³ скончался. При этом ОВ этого и двух других пациентов составила: 0,6 года (ХМЛ³), 0,5 года (В-ОЛЛ²), 0,4 года (ХЛЛ¹). Таким образом, к настоящему времени из 15 трансплантированных пациентов, 8 больных сохраняют ремиссию (В-ОЛЛ², В-ОЛЛ³; ОМЛ⁴, ОМЛ⁵; ХМЛ¹, ХМЛ², ММ¹, АА¹). У остальных 7 пациентов наступил летальный исход, включая больных ХЛЛ¹, ХМЛ³, а также пациентов с острым лейкозом (В-ОЛЛ¹, В-ОЛЛ⁴, ОМЛ¹), у которых отмечали развитие, по крайней мере, одного рецидива до ТГСК и одного рецидива после ТГСК. Кроме того, у больных ОМЛ (ОМЛ², ОМЛ³), которые оказались носителями мутации FLT3/ITD и экспрессировали повышенный уровень онкогена *WT1* после ТГСК, отмечалась устойчивость к азацитидину, что коррелировало с прогрессией лейкоза и сопровождалось гибелью обоих пациентов. Также следует отметить, что в отличие от больных ОМЛ, у больных В-ОЛЛ, ХМЛ и ХЛЛ, как правило, обнаруживаются средние уровни экспрессии онкогена *WT1*, более низкие, чем при ОМЛ или Т-ОЛЛ [24, 25]. Известно, что одной из причин повышения экспрессии *WT1* при ОМЛ является возникновение мутаций в гене *WT1*, часть из которых (G>A) вызывается дезаминированием нуклеотидов ДНК/мРНК в “горячих точках” при участии АЗА, представителя семейства АРОВЕС/ADAR [26]. Кроме того, нарастание количества лейкозных клеток, устойчивых к терапии и имеющих повышенную экспрессию *WT1*, может быть связано с вовлечением АЗА в регуляцию митотической гибели опухолевых клеток при остром лейкозе, что требует дополнительного изучения [27]. В настоящем исследовании только у одного больного В-ОЛЛ² (Ph+, bcr-abl/p190) из группы исследуемых пациентов В-ОЛЛ (n=4), трое из которых несли мутацию bcr-abl/p190, а один – мутацию tel-aml1, была выявлена повышенная экспрессия *WT1*. Поэтому, даже несмотря на небольшую выборку пациентов, можно заключить, что для более эффективного контроля за развитием посттрансплантационных рецидивов, одновременная оценка ДХ (InDel-локусы ДНК) и мониторинг биомаркеров МОБ (онкогенов и CD-маркеров) являются необходимыми.

Таким образом, все тесты, представленные в настоящем исследовании, могут быть использованы для мониторинга ДХ у больных онкогематологическими заболеваниями в посттрансплантационный период. Однако, наиболее чувствительным среди них является анализ полиморфизма InDel-локусов ДНК. Более того, точность этого тестирования может быть повышена после селектирования клеток-предшественниц CD34 с использованием проточной цитометрии. В то же время, обнаружение повышенных уровней ДХ

(≥95%) в течение первых 6 месяцев после алло-ТГСК у некоторых больных лейкозом (В-ОЛЛ², Ph+, bcr-abl/p190), не позволяет исключить развития рецидива. Именно поэтому одновременный анализ биомаркеров ДХ (InDel) и МОБ с количественной оценкой уровней экспрессии онкогенов-мишеней, включая *WT1*, а также уровней экспрессии CD-маркеров является необходимым и целесообразным. При возникновении ситуаций, когда в дебюте заболевания не обнаруживается ни один из онкогенов-мишеней, а уровень экспрессии онкогена *WT1* не отличается от нормы, в таких случаях комбинированный мониторинг CD-маркеров, полиморфизма InDel-локусов ДНК в клетках-предшественниках CD34 и клинических показателей, характерных для соответствующего варианта онкогематологического заболевания, является предпочтительным. Это позволяет эффективнее контролировать течение заболевания и прогнозировать развитие рецидивов в посттрансплантационный период.

ЛИТЕРАТУРА

1. Parker W.T., Lawrence R.M., Ho M., Irwin D.L., Scott H.S., Hughes T.P., Branford S. (2011) *J. Clin. Oncol.*, **29**, 4250-4259.
2. Saglio G., Pane F., Gottardi E., Frigeri F., Buonavita M.R., Guerrasio A., de Micheli D., Parziale A., Fornaci M.N., Martinelli G., Salvatore F. (1996) *Blood*, **87**, 1075-1080.
3. Fehse B., Chukhlovin A., Kühlcke K., Marinetz O., Vorwig O., Renges H., Krüger W., Zabelina T., Dudina O., Finckenstein F.G., Kröger N., Kabisch H., Hochhaus A., Zander A.R. (2001) *J. Hematother Stem Cell Res.*, **10**, 419-425.
4. Sreenan J.J., Pettay J.D., Tbakhi A., Totos G., Sandhaus L.M., Miller M.L., Bolwell B., Tubbs R.R. (1997) *Am. J. Clin. Pathol.*, **107**, 292-298.
5. Frankel W., Chan A., Corringham R.E., Shepherd S., Rearden A., Wang-Rodriguez J. (1996) *Am. J. Hematol.*, **52**, 281-287.
6. Gendzekhadze K., Gaidulis L., Senitzer D. (2013) *Methods Mol. Biol.*, **1034**, 221-237.
7. Lion T., Watzinger F., Preuner S., Kreyenberg H., Tilanus M., de Weger R., van Loon J., de Vries L., Cavé H., Acquaviva C., Lawler M. et al. (2012) *Leukemia*, **26**, 1821-1828.
8. Khan F., Agarwal A., Agrawal S. (2004) *Bone Marrow Transplant.*, **34**, 1-12.
9. Walters M.C., Patience M., Leisenring W., Rogers Z.R., Aquino V.M., Buchanan G.R., Roberts I.A., Yeager A.M., Hsu L., Adamkiewicz T., Kurtzberg J., Vichinsky E., Storer B., Storb R., Sullivan K.M. (2001) *Biol. Blood Marrow Transplant.*, **7**, 665-673.
10. Богданов К.В., Никулина Т.С., Ломаѝа Е.Г., Сляднев М.Н., Зарицкий А.Ю. (2017) *Биоорган. химия*, **43**, 523-531.
11. Богданов К.В., Волкова О.Я., Блау О.В., Иванова Н.Н., Витрищак А.А., Афанасьев Б.В. (2008) *Ученые записки СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова*, **15**, 30-34.
12. Rossi G., Carella A.M., Minervini M.M., Savino L., Fontana A., Pellegrini F., Greco M.M., Merla E., Quarta G., Loseto G., Capalbo S., Palumbo G., Cascavilla N. (2013) *Leuk. Lymphoma*, **54**, 2660-2666.
13. Bornhäuser M., Oelschlaegel U., Platzbecker U., Bug G., Lutterbeck K., Kiehl M.G., Schetelig J., Kiani A., Illmer T., Schaich M. et al. (2009) *Haematologica*, **94**, 1613-1617.

14. Mergenthaler S., Babochkina T., Kiefer V., Lapaire O., Holzgreve W., Hahn S. (2005) *J. Histochem. Cytochem.*, **53**, 319-322.
15. Verma R., Babu A. (1989) in: *Human chromosomes: manual of basic techniques*. Pergamon Press, N.Y., pp. 45-67.
16. Gabert J., Beillard E., van der Velden V.H., Bi W., Grimwade D., Pallisgaard N., Barbany G., Cazzaniga G., Cayuela J.M., Cavé H. et al. (2003) *Leukemia*, **17**, 2318-2357.
17. Willasch A.M., Gruhn B., Coliva T., Kalinova M., Schneider G., Kreyenberg H., Steinbach D., Weber G., Hollink I.H., Zwaan C.M. et al. (2009) *Leukemia*, **23**, 1472-1479.
18. Murphy K.M., Levis M., Hafez M.J., Geiger T., Cooper L.C., Smith B.D., Small D., Berg K.D. (2003) *J. Mol. Diagn.*, **5**, 96-102.
19. Branford S., Rudzki Z., Walsh S., Parkinson I., Grigg A., Szer J., Taylor K., Herrmann R., Seymour J.F., Arthur C., Joske D., Lynch K., Hughes T. (2003) *Blood*, **102**, 276-283.
20. Candoni A., Toffoletti E., Gallina R., Simeone E., Chiozzotto M., Volpetti S., Fanin R. (2011) *Clin. Transplant.*, **25**, 308-316.
21. Мамаев Н.Н., Горбунова А.В., Бархатов И.М., Гудожникова Я.В., Гиндина Т.Л., Катерина В.А., Волчков Е.В., Алянский А.Л., Бабенко Е.В., Слесарчук О.А., Станчева Н.В., Бондаренко С.Н., Афанасьев Б.В. (2015) *Клин. Онкогематол.*, **8**, 309-320.
22. Kwon M., Martínez-Laperche C., Infante M., Carretero F., Balsalobre P., Serrano D., Gayoso J., Pérez-Corral A., Anguita J., Díez-Martin J.L., Buco I. (2012) *Biol. Blood Marrow Transplant.*, **18**, 1235-1242.
23. Cilloni D., Renneville A., Hermitte F., Hills R.K., Daly S., Jovanovic J.V., Gottardi E., Fava M., Schnittger S., Weiss T., Izzo B. et al. (2009) *J. Clin. Oncol.*, **27**, 5195-5201.
24. Busse A., Gökbüget N., Siehl J.M., Hoelzer D., Schwartz S., Rietz A., Thiel E., Keilholz U. (2009) *Ann. Hematol.*, **88**, 1199-1205.
25. Boublikova L., Kalinova M., Ryan J., Quinn F., O'Marcaigh A., Smith O., Browne P., Stary J., McCann S.R., Trka J., Lawler M. (2006) *Leukemia*, **20**, 254-263.
26. Niavarani A., Currie E., Reyat Y., Anjos-Afonso F., Horswell S., Griessinger E., Luis Sardina J., Bonnet D. (2015) *PLoS One*, **10**, e0120089. DOI: 10.1371/journal.pone.0120089. eCollection 2015.
27. Bogdanov K.V., Takimoto M. (2017) *Ann. Hematol.*, **96** (Suppl 1), 69-70.

Поступила: 24. 04. 2017.
Принята к печати: 21. 08. 2017.

DONOR CHIMERISM AND MINIMAL RESIDUAL DISEASE MONITORING IN LEUKEMIA PATIENTS AFTER ALLO-HSCT

**K.V. Bogdanov, D.V. Motorin, T.S. Nikulina, O.S. Pisotskaya, D.V. Babenetskaya,
Y.V. Mirolyubova, O.Y. Volkova, A.Y. Zaritskiy**

Institute of Hematology, Federal V.A. Almazov North-West Medical Research Centre,
2 Akkuratova str., St. Petersburg, 197341 Russia; e-mail: kvbogdanov@yandex.ru

In present research the comparative analysis of donor chimerism (DC) using different tests was performed to improve the diagnostic tool in patients with malignant hematological disorders after allo-HSCT. The RBC antigen typing, identification of ABO blood type and quantitative analysis of InDel-, STR-, Y-polymorphisms were carried out for detection of DC. In addition, the expression of well-known oncogenes and CD-markers for monitoring MRD was evaluated to predict relapse and clinical outcome. According to our research, the analysis of InDel polymorphism using AlleleSEQR-PCR is more sensitive test for estimation of DC as compared with other assays. Moreover, the sensitivity of AlleleSEQR-PCR may be increased after isolation of the CD34 cell population in bone marrow. Nevertheless, observation of high levels in DC ($\geq 95\%$) in some leukemia patients (ALL, Ph+, bcr-abl/p190+) during first 6 months after HSCT cannot exclude the possibility of relapse. Thus, the combined monitoring of both DC (InDel) and MRD (oncogenes, WT1 and CD-markers) is a more advisable and useful test in managing hematologic malignancies and predicting relapse risk after allo-HSCT.

Key words: leukemia, transplantation, monitoring, donor chimerism, MRD