На правах рукописи

СМИРНОВА СВЕТЛАНА ЮРЬЕВНА

КЛОНАЛЬНЫЕ РЕАРАНЖИРОВКИ ГЕНОВ ТЯЖЕЛЫХ И ЛЕГКИХ ЦЕПЕЙ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ И ГЕНОВ Т-КЛЕТОЧНОГО РЕЦЕПТОРА У ПАЦИЕНТОВ С ЗАБОЛЕВАНИЯМИ СИСТЕМЫ КРОВИ

14.01.21 - гематология и переливание крови

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва, 2019

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской федерации

Научные руководители:
доктор медицинских наук Паровичникова Елена Николаевна
доктор биологических наук Судариков Андрей Борисович

Официальные оппоненты:
Семочкин Сергей Вячеславович – доктор медицинских наук, профессор кафедры онкологии, гематологии и лучевой терапии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г.Москва.
Мартынкевич Ирина Степановна – доктор биологических наук, руководитель лаборатории молекулярной генетики ФБГУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии ФМБА России», г.Санкт-Петербург
Ведущая организация: ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва

Защита состоится « __ » _____ 2019 года в ____ на заседании диссертационного совета Д 208.135.01 при федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 125167, г. Москва, Новый Зыковский проезд, 4

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации и на сайте www.blood.ru

Автореферат разослан « __ » _____ 2019 года

Ученый секретарь диссертационного совета
кандидат медицинских наук Сысоева Е.П.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Диагностика лимфопролиферативных заболеваний требует комплексного подхода. Основными методами, позволяющими подтвердить диагноз, являются иммунофенотипирование и иммуногистохимическое исследование опухолевых клеток. Ключевой характеристикой опухолевой пролиферации является клональность опухолевых клеток, поскольку опухолевые клетки являются потомками одной измененной клетки-предшественницы. В настоящее время важным дополнением при проведении дифференциальной диагностики лимфопролиферативных процессов является молекулярно-генетическое исследование клональности по реаранжировкам генов тяжелой и легких цепей иммуноглобулинов (*IG*) и генов Т-клеточного рецептора (*TCR*). При помощи мультиплексной системы праймеров BIOMED-2, клональные реаранжировки обнаруживаются при 99% В-клеточных лимфопролиферативных заболеваний и при 94% Т-клеточных лимфопролифераций.

В 2003 году группой лабораторий European BIOMED-2 (консорциум EuroClonality) выполнена стандартизация аналитического этапа исследования Т- и В-клеточной клональности, подобраны наиболее эффективные наборы праймеров и условия реакций, определены диапазоны длин продуктов специфической и неспецифической амплификации, проведена стандартизация пре- и постаналитического этапа исследования клональности. В то же время, на этапе интерпретации, получаемых после проведения фрагментного анализа данных, возникают закономерные сложности, так как клональная экспансия лимфоцитов может быть следствием иммунного, аутоиммунного процесса, сокращения нормального поликлонального лимфоцитарного разнообразия. Поскольку определение клональности лимфоцитов используется в рутинной лабораторной практике, и учитывая то, что аутоиммунные заболевания могут развиваться на фоне Т- и В-клеточных лимфом, выявление Т-клеточной клональности является диагностической проблемой, решений которой, так же, как и описания природы данных клональных продуктов, в доступной на сегодняшний день литературе не представлено.

Другой проблемой при интерпретации данных клональности является одновременное выявление Т- и В - клеточных клонов. Изначально считалось, что перестройки генов *TCR* могут встречаться только при Т-клеточных опухолях, в то время как перестройки генов *IG* – только при В-клеточных опухолях. На сегодняшний день нет ответа на вопрос, что представляет собой одновременное выявление Т- и В-клеточной клональности у одного пациента. Возможно, одновременное обнаружение двух или более клональных продуктов представляет собой две (или более) опухолевые популяции, которые сосуществуют одновременно у одного пациента, представляя сочетание двух опухолей или биклональность (олигоклональность) опухоли.

Возможно, часть клональных продуктов отражает выраженный нормальный иммунный ответ. Учитывая то, что в опухолевой клетке нарушены механизмы клеточной регуляции, возможно, клональные перестройки генов Т-клеточного рецептора и иммуноглобулинов происходят одновременно в одной опухолевой клетке. В каждом отдельном случае может быть сочетание всего вышеперечисленного.

Феномен клональной гетерогенности и вариабельности – одновременного наличия нескольких клональных продуктов (отличных по длине в парах нуклеотидов) в одном биологическом материале или наличие различных клональных продуктов в различных органах и тканях описан в литературе и затрудняет стадирование и контроль заболевания. Являются ли данные клональные продукты опухолевыми или представляют собой «реактивную» клональность неизвестно. У пациентов с ОЛ феномен клональной вариабельности и гетерогенности объясняется незавершенностью процессов реаранжировки генов *TCR* и *IG* в ранних клетках-предшественницах и, как считается, не свидетельствует о появлении новой опухоли. Возможно ли объяснить клональную гетерогенность и вариабельность при лимфомах генетической нестабильностью, как при ОЛ, и как следует интерпретировать появление новых клональных продуктов в течении заболевания при данных нозологиях, остается неизвестным.

Правильная интерпретация данных молекулярно-генетического исследования Т- и В-клеточной клональности, а также понимание природы описанных выше явлений – актуальная практическая и теоретическая задача, однозначных решений которой на сегодняшний день в мировой литературе нет. Учитывая то, что оценка клональности является дополнительным методом для дифференциальной диагностики, стадирования и контроля ремиссии заболевания необходимо изучить природу клональной вариабельности, гетерогенности и реактивной клональности при гематологических заболеваниях. С этой целью мы применили не только стандартные подходы: сравнение молекулярно-генетических данных клональности с данными гистологии и иммуногистохимии (ИГХ), оценку клональности в динамике на фоне лечения, но также применили новый подход – метод магнитной селекции отдельных лимфоцитарных популяций (CD19+, CD8+, CD4+, CD57+) с последующим определением клональности в каждой из популяции.

Цель исследования

Изучить клональную эволюцию и гетерогенность у пациентов с лимфопролиферативными заболевания и клональность при отсутствии других признаков опухоли.

Задачи исследования

1. Провести ретроспективный анализ клинико-лабораторных данных пациентов, материал которых был направлен в лабораторию молекулярной гематологии с 2008 по 2017 годы для

одновременного исследования реаранжировок генов Т-клеточного рецептора и иммуноглобулинов и определить нозологические формы с одновременным выявлением клональных реаранжировок генов Т-клеточного рецептора и иммуноглобулинов;

2. Определить характер, частоту, стабильность клональных реаранжировок генов Т-клеточного рецептора и иммуноглобулинов у пациентов с острым лимфобластным лейкозом;
3. Исследовать клиренс минимальной остаточной болезни при помощи пациент-специфичных праймеров у пациентов с острым лимфобластным лейкозом, которым проводится лечение протоколу «ОЛЛ-2009»;
4. Исследовать клональную гетерогенность у пациентов с ангиоиммунобластной Т-клеточной лимфомой;
5. Исследовать клональные реаранжировки генов Т-клеточного рецептора и определить их принадлежность к конкретной популяции Т-лимфоцитов при аутоиммунных заболеваниях (аутоиммунная гемолитическая анемия, системная красная волчанка, ревматоидный артрит) и у здоровых лиц;
6. Оценить целесообразность применения селекции отдельных лимфоцитарных популяций (CD19+, CD8+, CD4+, CD3+) в сложных диагностических случаях.

Научная новизна

1. Изучена клональная гетерогенность, реактивная клональность на значительной выборке больных с опухолевыми и неопухолевыми заболеваниями системы крови и у здоровых лиц;
2. Применен метод разделения популяций лимфоцитов в качестве предварительного этапа перед исследованием клональности для дифференциальной диагностики опухолевой и реактивной лимфопролиферации.

Практическая значимость полученных результатов

Разработаны практические рекомендации и предложены дополнительные возможности для интерпретации данных Т- и В-клеточной клональности в сложных диагностических случаях.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Экспансия Т-клеточных клонов не всегда является показателем опухолевого роста, характерна для аутоиммунных заболеваний и также может наблюдаться у здоровых лиц, в отличие от В-клеточной клональности;
2. Молекулярно-генетический метод определения клональности Т- и В - лимфоцитов позволяет оценить имеется ли опухолевое поражение того или иного органа на момент диагностики, при условии, что известна клональная реаранжировка в изначальном опухолевом очаге;
3. В сложных диагностических случаях метод магнитной селекции позволяет выявить популяцию лимфоцитов, несущих клональную реаранжировку, и подтвердить или

опровергнуть принадлежность данных клональных продуктов к опухолевой популяции при сравнении с фенотипом опухоли

4. У пациентов с ОЛЛ при диагностике МОБ следует учитывать возможность клональной эволюции вследствие изначальной опухолевой гетерогенности

Апробация работы

Результаты исследования обсуждены и доложены на II и III Российских конгрессах гематологов (2014, 2016 гг.), 5ом и 6ом ESLHO Симпозиуме Европейского научного общества онкогематологии (2016, 2017 гг.), 22-ом Конгрессе Европейского гематологического общества, 59-ом ежегодном Конгрессе Американского общества гематологов.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 11 научных работ, 7 из них в журналах, рекомендованных ВАК.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 139 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, глав собственных результатов и обсуждения, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка литературы, включающего 16 отечественных и 222 зарубежных источников. Работа иллюстрирована 17 таблицами, 18 рисунками и включает 6 приложений.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Дизайн исследования, пациенты

Исследование состоит из рестроспективной и проспективной частей.

Ретроспективная часть исследования состоит из двух частей. Первая часть исследования включает анализ результатов определения клональных реаранижровок всех пациентов (n=2182), биологический материал которых был направлен в лабораторию молекулярной гематологии ФГБУ НМИЦ «гематологии» Минздрава России для одновременного определения Т- и В-клеточной клональности в период с 2008 по 2011 гг. Вторая часть ретроспективного исследования включает определение клональных реаранжировок Т- и В - лимфоцитов у всех пациентов с ОЛЛ в дебюте заболевания, для которых имеелся архивный материал (n=20), направленный на хранение в лабораторию молекулярной гематологии в период с 2008 по 2011 гг., а также у всех пациентов с рецидивом ОЛЛ (n=3) для которых имелся архивный материал за этот же временной интервал. Кроме того, для пациентов, у которых имелся архивный материал на различных этапах терапии (согласно протоколу ОЛЛ-2009: 7, 36, 70, 105, 130, 150 дни терапии), проводили мониторинг МОБ методом ПЦР в реальном времени с подбором пациент-

специфичных праймеров к выявленным в дебюте заболевания клональным перестройкам генов Т-клеточного рецептора и/или иммуноглобулина.

Проспективное исследование состоит из четырех частей. Первый часть исследования включает пациентов с АИГА на момент диагностики заболевания (n=33) материал которых прислан в лабораторию молекулярной гематологии для исследования Т-клеточной клональности, а также материал этимх пациентов на различных этапах терапии (n=20). Вторая часть проспективного исследования включала молекулярно-генетическое исследование Т- и В - клональности лимфатического узла (n=40), костного мозга (n=28) и периферической крови (n=28) всех пациентов с АИТЛ на момент диагностики, а также на всех контрольных точках на различных этапах терапии (n=14). Третья часть – пациенты с ОЛЛ в дебюте заболевания (n=46), пациенты с рецидивом заболевания (n=3), пациенты на различных этапах терапии – 6 контрольных точек: 7, 36, 70, 105, 130, 150 дни терапии, согласно протоколу ОЛЛ-2009. Четвертая часть проспективного исследования включала 9 пациентов после алло-ТГСК с острыми лейкозами.

Группа отрицательного контроля состояла из 62 здоровых человек (23 донора и 39 добровольцев) следующих возрастных групп: 18-29 лет -17, 31-42 года - 16, 45-56 лет - 13, 58-71 лет – 16 человек. Медиана возраста составила 41 год (от 18 до 71 года). Пациенты с системной красной волчанкой (СКВ) и ревматоидным артритом (РА): 14 пациентов (СКВ – n=6, РА – n=8).

Диагностика и наблюдение всех пациентов с гематологическими заболеваниями поводились в различных отделениях ФГБУ НМИЦ «Гематологии» Министерства Здравоохранения России в период с 2008 по 2017 год. Пациенты с СКВ и РА диагностировались и наблюдались в Научно-исследовательском институте ревматологии имени В.А. Насоновой с 2015 по 2016 год. Кровь от здоровых доноров была получена в «Отделении заготовки крови и ее компонентов» ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России. Диагнозы были установлены в соответствии с классификацией заболеваний ВОЗ 2008 года. Согласие на обработку данных получено от всех пациентов, включенных в исследование.

2.2. Анализ Т- и В-клеточной клональности по реаранжировкам генов Т-клеточных рецепторов и иммуноглобулинов

Клональность Т- и В-лимфоцитов можно оценить на молекулярно-генетическом уровне с помощью анализа CDR3 участков генов *TCR* и *IG*. Участок CDR3 обладает наибольшей вариабельностью и в значительной степени обеспечивает разнообразие Т-клеточных рецепторов и иммуноглобулинов. Используя праймеры к *V* и *J* сегментам этих генов, при помощи ПЦР можно получить множество копий исследуемой области. В поликлональном образце

амплификаты различные по длине и составу CDR3 области, и, наоборот, в моноклональной популяции лимфоцитов – одинаковые. Так как CDR3 область различается всего на 1-10 нуклеотидов, в агарозном геле не видна разница между поликлональным и моноклональным образцом, поэтому для дальнейшего исследования используют метод фрагментного анализа, который основан на разделении меченных флюоресцентным красителем ПЦР-продуктов в капиллярах, заполненных гелем. При капиллярном электрофорезе денатурированные ПЦР-продукты разделяются по длине вне зависимости от нуклеотидного состава. Вместе с ПЦР-продуктом наносится маркер длины (фирменный набор олигонуклеотидов, определенной длины, меченных флюоресцентной краской), по которому прибор определяет длину ПЦР продукта с точностью до 1-2-х нуклеотидов. После обработки сигнала компьютером, результат фрагментного анализа виден как набор пиков в области амплификации (рисунок 1).

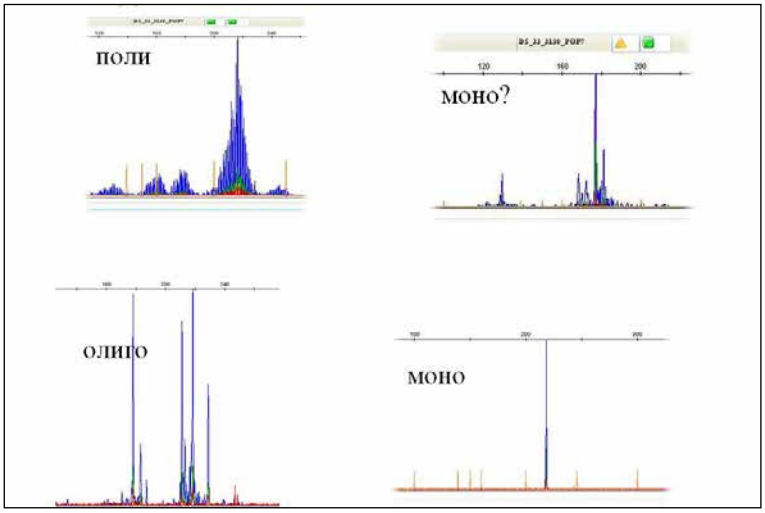

Рисунок 1. Результаты фрагментного анализа. Поли – поликлональный (отрицательный) результат – наличие множества пиков. Олиго – олигоклональный – более 3-х четких пиков. Моно? – сомнительный моноклональный – один или два пика, которые превышают поликлональный фон. Моно – моноклональный (положительный) – один или два пика (моно- или биаллельная реаранжировка).

Отрицательный (поликлональный) результат определяли при наличии множества пиков, профиль которых соответствовал кривой Гаусса. Результат считался положительным (моноклональным) при наличии одного или двух четких пиков (в случае биаллельной реаранжировки). При этом пики должны были полностью доминировать и превышать поликлональный фон более чем в 3 раза. При наличии одного или двух четких пиков, которые превышали поликлональный фон в 2-3 раза, результат оценивался как сомнительный моноклональный.

2.3. Количественная оценка минимальной остаточной болезни при помощи ПЦР в реальном времени

Для количественной оценки уровня минимальной остаточной болезни мы проводили ПЦР в реальном времени с пациент-специфичным праймером, оценивали уровень МОБ по стандартной кривой и нормировали концентрацию и качество исследуемой ДНК по контрольному гену β-глобина.

Для выделения моноклональных продуктов мы проводили агарозный гель-электрофорез. Клональный продукт определялся в виде яркой полоски в области, соответствующей длине продукта. Полоску с продуктом вырезали и выделяли ДНК из агарозного геля при помощи коммерческого набора Cleanup mini (Евроген, Россия).

Секвенирование проводили с использованием набора Big Dye Terminator на автоматическом секвенаторе ABI PRISM 3100-Avant (Applied Biosystems, США). Нуклеотидные последовательности генов сравнивали с последовательностями герминальных V-, D- и J -генов, опубликованных в электронных базах данных (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi и IMGT http://www.imgt.org) и находили нуклеотидную последовательность участка соединения *V-, D-, J-* генов – CDR3 участка. Дизайн пациент-специфичного праймера осуществляли при помощи программы Oligo Calc: Oligonucleotide Properties Calculator (http://basic.northwestern.edu/biotools/OligoCalc.html) таким образом, чтобы температура отжига соответствовала 55 – 57°C, содержание GC составляло около 40-60%, с минимальным количеством G/C на 3’ конце (рисунок 2).

Несмотря на то, что ПЦР в реальном времени является методом количественной оценки, в случае если значение МОБ находится за пределами подсчетной чувствительности, можно говорить лишь о наличии остаточного минимального опухолевого клона без подсчета количества опухолевых клеток (рисунок 3).

2.4. Селекция популяций лимфоцитов периферической крови

Выделение CD4+, CD8+, CD19+, CD3+ и CD25+CD4+ популяций лимфоцитов проводили с помощью набора для клеточной селекции производства Miltenyibiotec (магнитного сепаратора MiniMACS SepaPAtor; колонок для магнитной селекции MS Columns; реагента с фиксированными на магнитных микробусах соответсвующими антителами MicroBeads, human; буфера для селекции) согласно стандартному протоколу производителя.

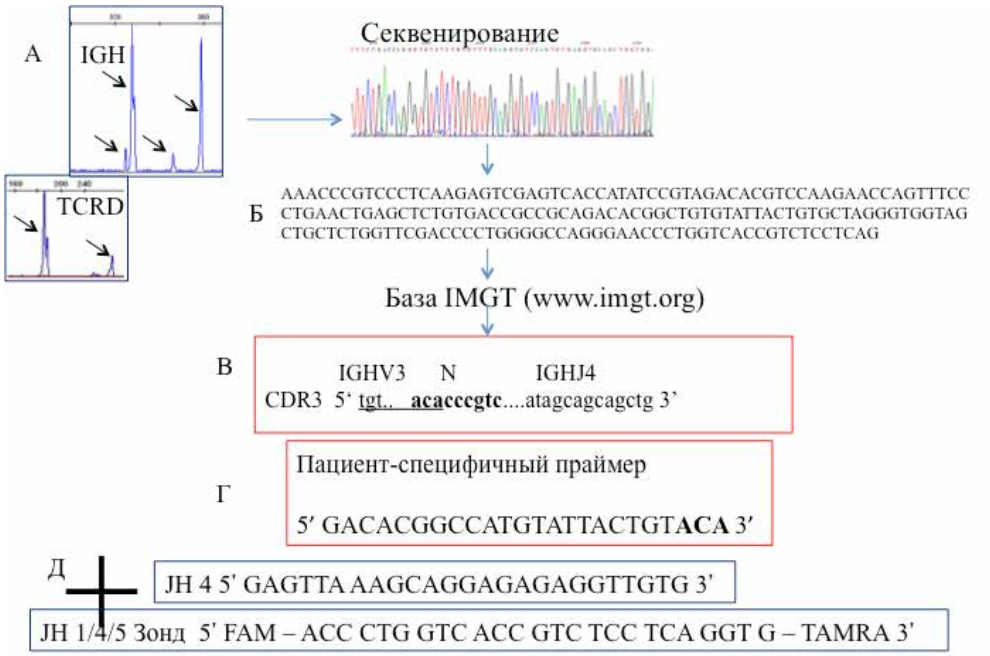

Рисунок 2. Схема подбора пациент-специфичного праймера по генам тяжелой цепи IG (пациент К., 37 лет, В-ОЛЛ). А. Моноклональный результат по генам тяжелой цепи IG, выявленный с помощью фрагментного анализа. Б. Нуклеотидная последовательность клонального продукта. В. Уникальная для данного клона CDR3 область. Г. Последовательность прямого пациент-специфичного праймера. Д. Консенсусные последовательности обратного праймера и флюоресцентного зонда.

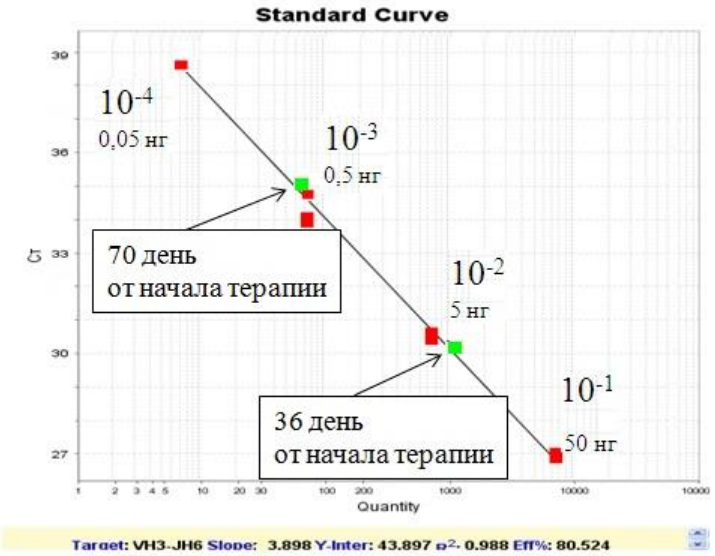

Рисунок 3. Стандартная кривая, построенная по серии разведений моноклональной опухолевой ДНК. Стрелками показан результат определения МОБ после курсов ПХТ. На 36 день от начала терапии количество опухолевых клеток составило $2{,}80 \times 10^{-2}$. На 70 день терапии определяется минимальная остаточная болезнь без подсчета количества опухолевых клеток.

2.5. Статистическая обработка результатов

Для анализа данных использовались стандартные методы описательной статистики, частотный, дисперсионный, регрессионный анализ. Расчеты были сделаны с использованием статистического пакета STATISTICA.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Провести ретроспективный анализ клинико-лабораторных данных пациентов, материал которых был направлен в лабораторию молекулярной гематологии с 2008 по 2017 годы для одновременного исследования реаранжировок генов Т-клеточного рецептора и иммуноглобулинов и определить нозологические формы с одновременным выявлением клональных реаранжировок генов Т-клеточного рецептора и иммуноглобулинов.

За период с 2008 по 2017 год в лабораторию молекулярной гематологии поступили пробы от 2182 пациентов для одновременного исследования Т- и В-клеточной клональности. Одновременное выявление В- и Т-клеточной клональности (четкие клональные пики и клональные пики на поликлональном фоне – сомнительная моноклональная картина) отмечено у 121 пациента (рис. 4), пациенты с сочетанным сомнительным/олигоклональным результатом определения Т- и В-клеточной клональности в таблице и на рисунке не представлены). Одновременно четкая Т- и В-клеточная клональность выявлена у 49 из 121 (40,5%) пациентов. Из них одновременное выявление четких пиков Т- и В-клеточной клональности встречается у пациентов с острым лимфобластным лейкозом (16,3%), аутоиммунной гемолитической анемией (14,3%), ангиоиммунобластной Т-клеточной лимфомой (14,3%). При этом остальные случаи чаще связаны с В-клеточными неходжкинскими лимфомами (18,4%) и очень редко другими Т-клеточными лимфомами (4%) – один случай представлен гепатолиенальной Т-клеточной лимфомой, при котором впоследствии была доказана композитная лимфома.

У 19 (15,7%) пациентов четкая моноклональная картина по реаранжировкам генов Т-клеточного рецептора сочеталась с сомнительным или олигоклональным результатом В-клеточной клональности. При этом, чаще остальных (10 из 19 пациентов (52,6%)) такая ситуация отмечена у пациентов с ангиоиммунобластной Т-клеточной лимфомой. В одном случае (5%) В-клеточной неходжкинской лимфомы и в одном случае миелодиспластического синдрома (МДС) (5%) также отмечено одновременное выявление моноклональной картины по реаранжировкам генов Т-клеточного рецептора и сомнительного клонального результата по реаранжировкам генов иммуноглобулинов. При этом у пациента с диагнозом МДС была выявлена сомнительная моноклональная картина по реаранжировкам генов IGH, которая не определялась при повторном исследовании через 3 месяца терапии, также и четкая клональная картина по реаранжировкам

генов TCR, появилась на терапии, однако при динамическом исследовании не определялась через 12 месяцев наблюдения, что, вероятнее всего, отражает реактивную природу как Т-, так и В - клеточных клонов.

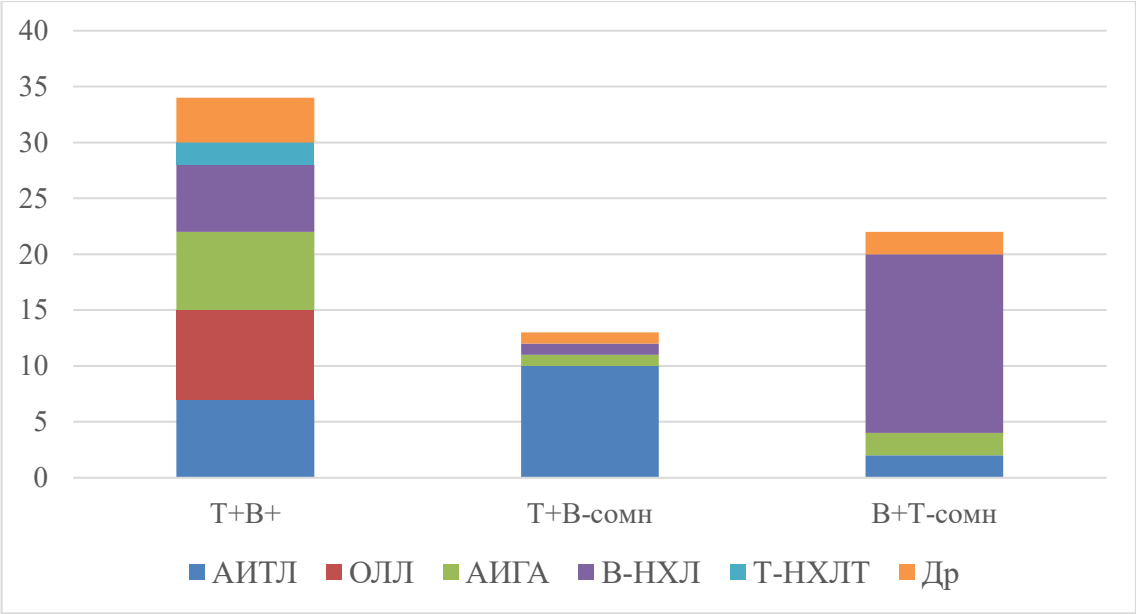

Рисунок 4. Распределение по диагнозам пациентов с сочетанным выявлением Т- и В-клеточной клональности.

У 39 (32,2%) пациентов выявлена четкая В-клеточная клональность в сочетании с сомнительным или олигоклональным результатам Т-клональности – при В-клеточных неходжкинских лимфомах (43,6%) и не встретилась при Т-клеточных неходжкинских лимфомах (0%). У 14 (11,7%) пациентов обнаружено сочетание сомнительной Т- и В-клеточной клональности.

Таким образом В-клеточная клональность является важным диагностическим критерием наличия В-клеточной лимфомы, в отличие от Т-клеточной клональности, при диагностике Т-клеточной лимфомы. Изолированное исследование Т-клеточной клональности имеет ограниченное диагностическое значение, Т-клеточная клональность должна оцениваться только в совокупности с клинико-лабораторными данными.

2. Определить характер, частоту, стабильность клональных реаранжировок генов Т-клеточного рецептора и иммуноглобулинов у пациентов с острым лимфобластным лейкозом.

По нашим данным у пациентов с ОЛЛ при В-клеточном варианте заболевания клональные реаранжировки генов *TCR* выявляются почти в 92% случаев. При Т-клеточной варианте заболевания клональные реаранжировки генов иммуноглобулинов выявляются у 24% пациентов. Для пациентов с ОЛЛ такая картина характерна и объясняется повышенной активностью

рекомбиназного комплекса в опухолевых клетках, вследствие чего реаранжировки происходят непоследовательно.

В таблице 1 спектр клональных реаранжировок при ОЛЛ представлен более подробно. Из таблицы видно, что у пациентов с В-клеточным вариантом заболевания чаще выявлены клональные реаранжировки генов гамма цепи *TCR* (70,3%) и генов тяжелой цепи *IG* (78,4%). У пациентов с Т-ОЛЛ чаще выявляются реаранжировки *TCR,* однако встречаются и клональные перестройки генов тяжелой и легких цепей *IG.* Наши данные несколько отличаются от данных зарубежных исследований, что может быть связано с национальными особенностями или небольшим размером нашей выборки.

Таблица 1. Частота (%) выявления клональных реаранжировок генов *TCRG, TCRB, TCRD* и генов тяжелой и легкой цепей *IG* при В- и Т-вариантах ОЛЛ

		Наши данные		Данные van Dongen J.J. et al.	
Реаранжировки		В-ОЛЛ (*n* = 37)	Т-ОЛЛ (*n* = 29)	В-ОЛЛ	Т-ОЛЛ
TCRG	VG–JG	70.3% (n=26)	89.7% (n=26)	**55**	95
TCRB	VB–JB (полные)	32.4% (n=12)	51.7% (n=15)	21	**77**
	DB–JB (неполные)	24.3% (n=9)	44.8% (n=13)	14	55
	Все TCRB	40.5% (n=15)	65.5% (n=19)	33	**92**
TCRD	VD–JD/DD2–JD	21.6% (n=8)	51.7 % (n=15)	н/д	н/д
	VD–DD3/DD2–DD3	45.9% (n=17)	31% (n=9)	н/д	н/д
	Все TCRD	62.2% (n=23)	65.5% (n=19)	40	50
IGH	VH–JHFR1/FR2/FR3 (полные)	67.6% (n=25)	6.9% (n=2)	**93**	5
	DH–JH (неполные)	21.6% (n=8)	20.7% (n=6)	20	23
	Все IGH	78.4% (n=29)	20.7% (n=6)	98	23
IGK	Vk–Jk	27% (n=10)	0% (n=0)		
	Vk–KDE/IntronRSS–KDE	29.7% (n=11)	3.4% (n=1)		
	Все IGK	35.1% (n=13)	3.4% (n=1)	50	**0**

Для того, чтобы изучить стабильность клональных реаранжировок, мы исследовали 6 пациентов в рецидиве заболевания. В нашем исследовании показано, что у всех пациентов при развитии рецидива заболевания сохранялся хотя бы один клональный продукт из выявленных в дебюте. Нами показано, что у пяти из шести (83%) больных с диагнозом ОЛЛ отмечалось частичное несовпадение клональных перестроек дебюта и рецидива заболевания. Нами обнаружена потеря пациент-специфичных мишеней, выявленных у трех пациентов в дебюте

заболевания. Для того чтобы зафиксировать минорные субклоны в дебюте заболевания и оценить их поведение на фоне проводимой терапии, мы решили повысить первоначальную чувствительность метода. При помощи праймеров, специфичных к семействам V- и J-, мы повторно исследовали первоначальный материал на предмет наличия клональных продуктов, возникших в рецидиве заболевания. Использование таких праймеров увеличивает чувствительность определения опухолевых клеток с 10^{-1} до 10^{-2}–10^{-3}. Однако даже при такой чувствительности субклоны не были обнаружены в дебюте, что свидетельствует о малом размере субклонов и подтверждает данные других исследований.

Таким образом, для пациентов с диагнозом ОЛЛ наличие Т- и/или В-клеточной клональности не может служить признаком линейной принадлежности опухоли. Для этих пациентов характерна изначальная клональная гетерогенность опухоли, что следует учитывать при контроле минимальной остаточной болезни (МОБ).

3. Исследовать клиренс МОБ при помощи пациент-специфичных праймеров у пациентов с острым лимфобластным лейкозом, которым проводится лечение протоколу ОЛЛ-2009.

В нашем исследовании, МОБ после I индукционного курса была выявлена у 80% (12 из 15) больных, после II курса индукции – у 57% (12 из 21) пациентов. Эти данные согласуются с немецкими исследованиями, которые также продемонстрировали персистенцию опухолевого клона: на различных этапах индукционной терапии у 34-52% пациентов детектировали МОБ. После двух курсов консолидирующей терапии по программе ОЛЛ-2009 МОБ выявляли у 34,7% (8 из 23) пациентов, после пятого курса консолидации – у 27,8% (5 из 18) пациентов. По данным немецких авторов к 150 дню (протокол GMALL 06/99 – окончание II курса консолидации – начало I курса реиндукции) МОБ выявляется у 20% пациентов. Данные по клиренсу клона опухолевых клеток на различных этапах терапии по протоколу ОЛЛ-2009 представлены в таблице 2.

Таблица 2. Мониторинг МОБ у пациентов с ОЛЛ на различных этапах терапии по протоколу ОЛЛ-2009.

День терапии	Число пациентов, которым был проведен анализ	Число пациентов, у которых обнаруживается МОБ (%)
36	15	12 (80)
70	21	12 (57,1)
105	23	8 (34,7)
133	21	9 (42,9)
150	18	5 (27,8)
ПТ	18	4 (22,2)

П р и м е ч а н и е: ПТ – поддерживающая терапия (различный дни ПТ, от 1 до 6 месяцев), МОБ – минимальная остаточная болезнь.

Таким образом, несмотря на сниженную интенсивность химиотерапевтического воздействия, клиренс опухолевого клона у больных ОЛЛ, пролеченных по протоколу ОЛЛ-2009, сопоставим с таковым в зарубежных исследованиях.

4. Исследовать клональную гетерогенность у пациентов с ангиоиммунобластной Т-клеточной лимфомой.

В дебюте заболевания в ткани лимфатического узла у 32 из 40 (80%) пациентов выявлена Т-клеточная клональность, у 5 (12,5%) пациентов выявлена сомнительная Т-клеточная клональность по реаранжировкам генов *TCR*, у 2 (5%) пациентов – реаранжировки генов были представлены несколькими клональными продуктами (олигоклональная картина), у одного (2,5%) пациента – Т-клеточная клональность не выявлена.

У 26 из 28 пациентов в материале костного мозга (КМ) дебюта заболевания выявлена Т-клеточная клональность *TCRG* и/или *TCRB*. При этом, лишь у 23% (6 из 26) пациентов, выявленные клональные продукты в КМ, совпадали по длине (в количестве пар нуклеотидов) с клональными продуктами, выявленными в материале ЛУ, в то время как у 46% (12 из 26) пациентов клональные продукты полностью отличались от выявленных в материале ЛУ. У 30% (8 из 26) пациентов клональные реаранжировки совпадали только частично, т.е. в КМ определялись дополнительные клональные продукты, отсутствовавшие в материале ЛУ. У 14 из 40 пациентов клональность в крови и КМ исследована в динамике – у 7 из 14 пациентов (50%) клональные продукты персистировали на протяжении длительного времени и не исчезали при достижении клинической ремиссии заболевания.

Оценка вовлечения в опухолевый процесс КМ и других тканей (печени, ЦНС – исследование спинномозговой жидкости, легких – исследование плевральной жидкости) имеет большое значение, поскольку свидетельствует о диссеминации заболевания, определяет стадию заболевания и предполагает иную терапевтическую тактику. В нашем исследовании у всех пациентов с АИТЛ опухолевые клетки экспрессировали CD4+. Принадлежность выявленных нами клональных продуктов к CD4+ популяции лимфоцитов будет говорить об их опухолевой природе. Для того, чтобы определить к какой популяции лимфоцитов принадлежат, выявленные нами Т-клеточные клоны, мы применили метод магнитной селекции и исследовали CD8+ и CD4+ популяции лимфоцитов у 5 пациентов в ремиссии заболевания с персистирующей Т-клеточной клональностью. У всех пациентов клональные продукты, которые изначально были выявлены в КМ и крови и не совпадали по длине (в парах нуклеотидов) с клональными продуктами, выявленными в ткани ЛУ, принадлежали к CD8+ популяции клеток (рисунок 5).

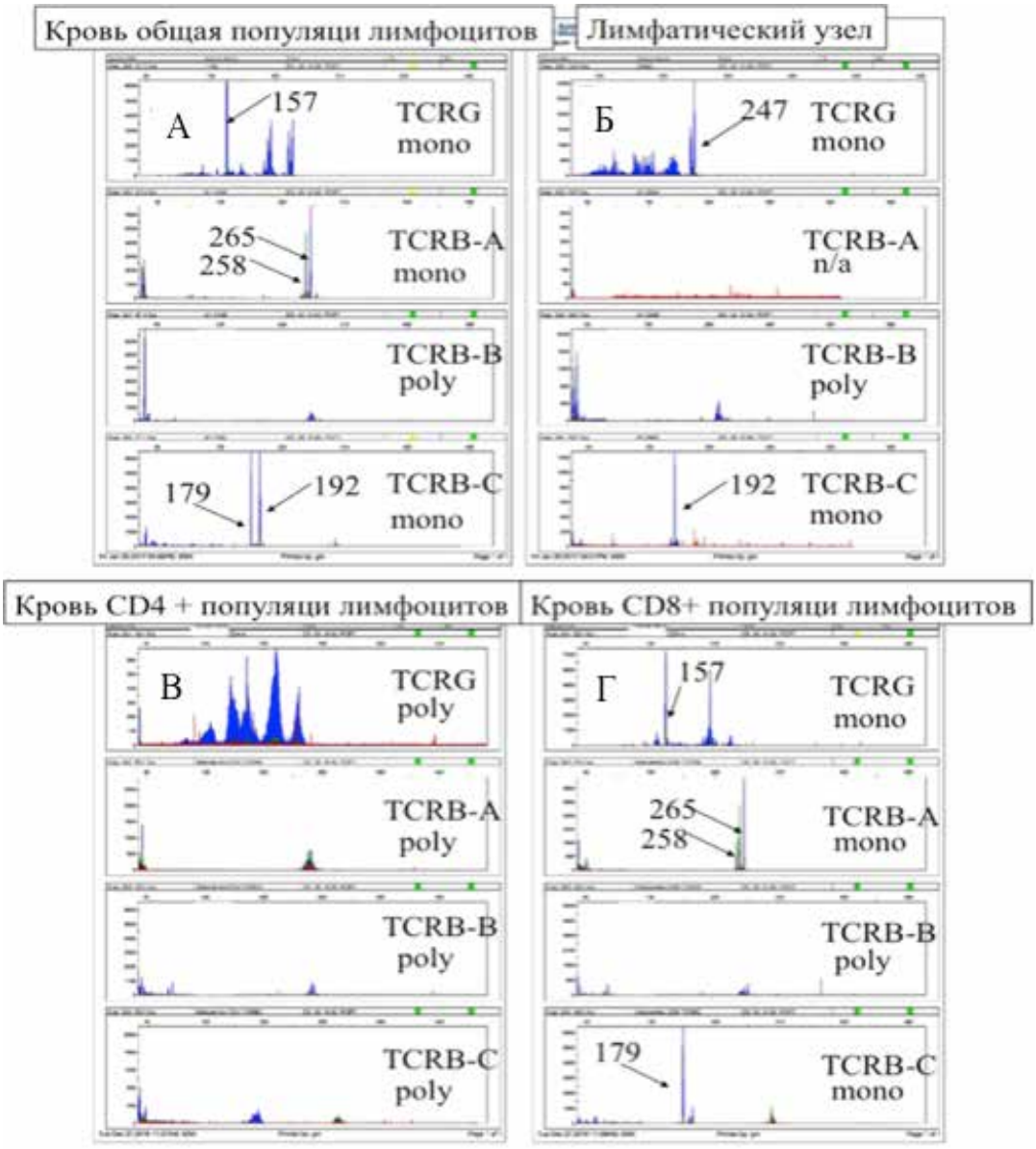

Рисунок 5. Данные определения Т-клеточной клональности по реаранжировкам генов гамма и бета цепи *TCR* (*TCRG* и *TCRB*) у пациента с АИТЛ. (А) Стрелками указаны моноклональные продукты и их размеры в парах нуклеотидов (п.н.), выявленные при исследовании ткани ЛУ. (Б) Указаны моноклональные продукты, выявленные при исследовании общей популяции лимфоцитов периферической крови. (В) CD4+ популяция лимфоцитов представлена поликлональной картиной. (Г) CD8+ популяция лимфоцитов содержит клональные продукты, которые ранее выявлены в общей популяции лимфоцитов крови и не выявлены в ткани ЛУ.

Таким образом клональные продукты в КМ и крови, не совпадающие с таковыми в ЛУ, выявляются у большинства пациентов с АИТЛ (76%), относятся к CD8+ лимфоцитам, могут персистировать в течение длительного времени (период наблюдения от 1 до 40 мес.), могут сохраняться в ремиссии заболевания и носят реактивный характер, что необходимо учитывать при интерпретации данных клональности в крови и КМ.

5. Исследовать клональные реаранжировки генов Т-клеточного рецептора и определить их

принадлежность к конкретной популяции Т-лимфоцитов при аутоиммунных заболеваниях (аутоиммунная гемолитическая анемия, системная красная волчанка, ревматоидный артрит) и у здоровых лиц.

Из 33 пациентов с АИГА Т-клеточная клональность по генам *TCRG* выявлена у 16 из 33 пациентов (48,5%) и по генам *TCRB* – у 15 из 33 пациентов (45,5%), что достоверно выше в сравнении с группой контроля ($p < 0,05$).

В группе контроля, в которую были включены пациенты с другими анемиями, моноклональных результатов по генам гамма-цепи Т-клеточного рецептора не выявлено (0%), сомнительных результатов было 2 из 33 (6%): 1 при пароксизмальной ночной гемоглобинурии, 1 при наследственной гемолитической анемии.

По генам бета-цепи Т-клеточного рецептора моноклональных пиков не выявлено, сомнительные результаты определяли у 2 пациентов из 33 (6%): 1 при парциальной красноклеточной аплазии, 1 при пароксизмальной ночной гемонлобинурии. Результаты определения Т-клеточной клональности по реаранжировкам генов *TCRG* и *TCRB* у пациентов с АИГА представлены в приложении 3.

Клинические данные были собраны у 27 пациентов с АИГА. Учитывали возраст, пол, тяжесть и длительность заболевания, спленэктомию, концентрацию гемоглобина.

Связи Т-клеточной клональности с возрастом, полом, длительностью и тяжестью заболевания, спленэктомией и основными показателями крови не выявлено.

Мы исследовали Т-клеточную клональность в динамике у 18 пациентов, для которых имелись архивные образцы крови. При этом срок наблюдения составлял от 1 года до 15 лет. У 7 из них поликлональная картина периферической крови сохранялась на протяжении болезни, при этом у 11 пациентов с выявленной моноклональностью по генам *TCRG* и *TCRB* отмечено, что Т-клеточные клоны персистируют на протяжении всего периода заболевания, не зависят от проводимой терапии и не исчезают в ремиссии.

Чтобы получить представления о иммунофенотипе этих клеточных клонов, мы провели иммуномагнитную селекцию клеток у 5-х пациентов. Схема селекции лимфоцитов периферической крови пациентки представлена на рисунке 6. Из лейкоцитов периферической крови были выделены три популяции лимфоцитов: CD4+, CD8+ и CD4+25+. Наше исследование клональности в CD4+, CD8+, CD25+CD4+ популяциях Т-лимфоцитов показало, что клональные лимфоциты принадлежат к CD8+ Т-лимфоцитам.

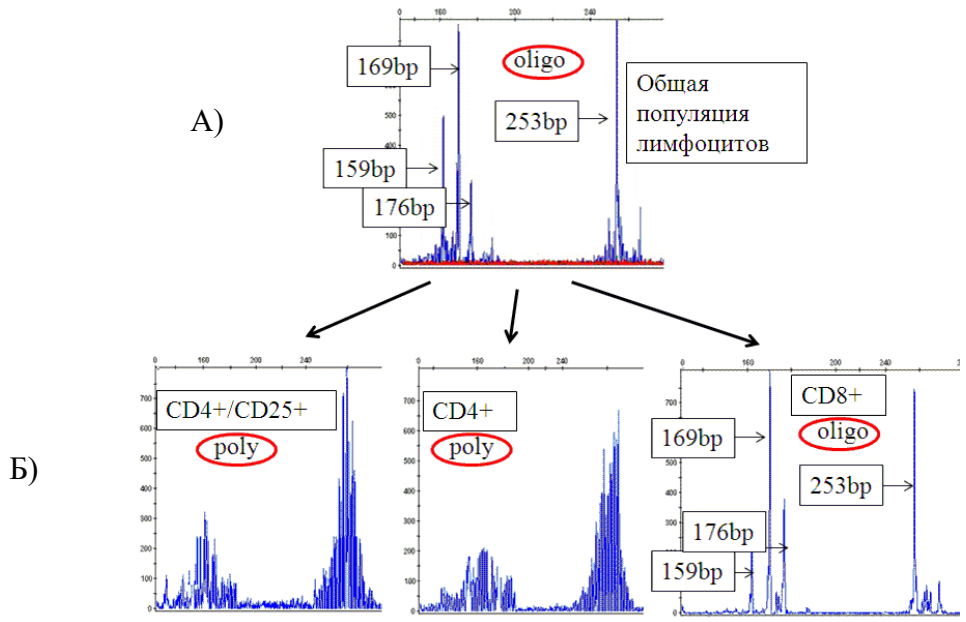

Рисунок 6. А) В общей популяции лимфоцитов периферической крови пациентки №17 с АИГА выявлена олигоклональная картина генов TCRG (клональные продукты размером 159, 169, 176 и 253 пар нуклеотидов). Б) В результате селекции клеток выделены три популяции лимфоцитов – CD4+/CD25+, CD4+, CD8+. Клональные реарранжировки генов TCRG не выявлены в популяциях CD4+/CD25+, CD4+ (поликлональная картина). В популяции CD8+ лимфоцитов выявлены клональные продукты генов TCRG, размеры которых соответствуют размерам, выявленным в общей популяции.

С целью изучения клональности при других аутоиммунных заболеваниях мы исследовали пациентов с СКВ (n=6) и РА (n=8). Клональные реаранжировки по генам *IGH* не были выявлены ни в одном случае. По генам *TCRG* в общей популяции лимфоцитов у 1 пациентки выявлена олигоклональная картина (4 клональных продукта). После селекции клеток, 2 из них были определены в CD4+ популяции, 2 – в CD8+. Также у этой пациентки после проведения магнитной селекции клеток, в CD4+ популяции лимфоцитов были выявлены клоны, которые не определялись в общей популяции. Видимо, описанный феномен связан с тем, что чувствительность метода не позволяет выявить минорные клоны на фоне доминирующих пиков общей популяции клеток. По генам *TCRB* мы выявили аналогичную картину. У 4 пациентов с СКВ в общей популяции лимфоцитов методом фрагментного анализа была выявлена олигоклональная картина, магнитную селекцию клеток проводили у 2 из них. Клональные продукты выявляли как в CD4+, так и в CD8+ популяциях клеток. У 1 пациентки реаранжировки по генам бета и гамма цепей Т-клеточного рецептора были поликлональными. Среди пациентов с РА в нашем исследовании клональные реаранжировки по генам *IGH* не были выявлены ни в одном случае. У 3 пациентов поликлональную картину в общей популяции клеток выявили как по реаранжировкам генов *TCRB*, так и генов *TCRG*. Учитывая это, селекцию субпопуляций лимфоцитов не проводили. У 3 пациентов в общей популяции клеток по реаранжировкам генов

TCRG был выявлен один клональный продукт. После выполнения селекции клеток, у двух пациентов с РА основной клональный продукт выявили в популяции CD8+ клеток, при этом были обнаружены и другие клональные продукты в популяции CD8-CD4- клеток. У 1 пациента с РА в общей популяции лимфоцитов было выявлено 5 клональных реаранжировок по генам *TCRG*, при этом после магнитной селекции клеток 3 клональных продукта определялись в популяции CD4+, 2 других – в популяции CD8+ клеток. По генам *TCRB* методом фрагментного анализа поликлональная картина в общей популяции клеток была выявлена у 4 пациентов с РА. Магнитную селекцию клеток проводили у 4 пациентов, у которых в общей популяции были выявлены олиго и моноклональная картина. Клональные продукты выявляли как в CD4+, так и в CD8+ популяциях клеток.

В группе здоровых доноров и добровольцев, при исследовании реаранжировок генов *TCRG* в общей популяции лимфоцитов были получены следующие результаты: у 7 из 62 доноров (11,3%) – моноклональный; у 11 из 62 доноров (17,7%) – сомнительный моноклональный; 4 из 62 доноров (6,5%) – олигоклональный; у 40 из 62 доноров (64,5%) – поликлональный. Таким образом, у 35,5% (18 из 62) относительно здоровых людей в периферической крови определялось преобладание одной или нескольких популяций Т-лимфоцитов. Корреляции наличия клональных продуктов с возрастом в контрольной группе показано не было. Для того, чтобы определить к какой популяции принадлежат выявленные клональные продукты, мы выполнили селекцию лимфоцитов периферической крови, разделив их на CD8+ популяцию и CD8- популяцию. У 10 из 12 обследованных доноров в CD8+ популяции лимфоцитов обнаружены моноклональные реаранжировки генов *TCR* (n=7), сомнительные моноклональные реаранжировки (n=1) или олигоклональные реаранжировки (n=2). Если в общей популяции был выявлен доминирующий пик, то он же доминировал в CD8+ популяции. При этом у большинства обследованных (у 8 из 12) оставшаяся популяция клеток (CD8-) была поликлональной.

Таким образом, нами показано, что у 35,5% здоровых людей выявляются клональные реаранжировки генов *TCR*, поэтому их следует расценивать как варианты нормы. После проведения магнитной селекции лимфоцитов периферической крови у пациентов с аутоиммунными заболеваниями (СКВ и РА) и у здоровых людей, мы определили, что доминирующие Т-клеточные клоны принадлежат к CD8+ популяции лимфоцитов у абсолютного большинства исследованных пациентов.

ВЫВОДЫ

1. Среди лимфопролиферативных заболеваний, сочетанное выявление Т- и В-клеточной клональности чаще встречается у пациентов с В-клеточными лимфомами. Среди пациентов с Т-лимфомами, сочетанное выявление Т- и В-клеточной клональности не встречается, исключение составляют пациенты с диагнозом ангиоиммунобластной Т-клеточной лимфомы;
2. У пациентов с диагнозом ангиоиммунобластной Т-клеточной лимфомы одновременно могут присутствовать несколько клональных реаранжировок генов Т-клеточного рецептора в одном биологическом материале и/или различные клональные реаранжировки в образцах из различных органов и тканей. Часть клональных Т-лимфоцитов принадлежит к CD8+ популяции лимфоцитов и не имеет отношения к опухоли;
3. Для пациентов с диагнозом ОЛЛ наличие Т- и/или В-клеточной клональности не может служить признаком линейной принадлежности опухоли; для этих пациентов характерна клональная эволюция опухоли, что следует учитывать при контроле минимальной остаточной болезни;
4. CD8+ лимфоциты, имеющие клонально перестроенные гены TCR, могут персистировать в течение длительного времени, выявляются при аутоиммунных заболеваниях, неопухолевых гематологических заболеваниях, у здоровых лиц и не имеют отношения к опухоли;
5. Разделение популяций лимфоцитов методом магнитной селекции с последующим исследованием Т- и В-клеточной клональности в каждой из выделенных популяций помогает выявить популяцию лимфоцитов, несущих клональную реаранжировку, и подтвердить или опровергнуть принадлежность данных клональных продуктов к опухолевой популяции при сравнении с фенотипом опухоли.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

I. Определение Т- и В-клеточной клональности у пациентов с ОЛЛ:

1. При подозрении на рецидив заболевания необходимо проводить повторное полное исследование всех реаранжировок генов *IG* и *TCR*, чтобы оценить возможную смену клональных реаранжировок;
2. Выявление Т и/или В-клеточной клональности при ОЛЛ нельзя расценивать как признак линейной принадлежности опухоли;

3. Мониторинг МОБ с подбором пациент-специфичных праймеров невозможен при отсутствии материала (костного мозга), полученного в дебюте заболевания.

II. Использование Т- и В-клеточной клональности у пациентов с неходжкинскими лимфомами и при подозрении на лимфому:

1. Изолированное исследование клональности в крови, к/м и тканях в процессе лечения без данных о клональности в изначальном опухолевом очаге может привести к ложноположительным результатам;
2. В сложных диагностических случаях рекомендовано исследование клональности в отдельных лимфоцитарных популяциях;
3. При выявлении В-клеточной клональности необходимо динамическое наблюдение и выполнение ИГХ-исследования субстрата, в котором была выявлена В-клональность, всем пациентам.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Smirnova S.J. Expansion of CD8+ cells in autoimmune hemolytic anemia / Smirnova S.J., Sidorova J.V., Biderman B.V., Nikulina E.E., Sudarikov A.B., Tsvetaeva N.V., Nikulina O.F., Kulikov S.M. // Autoimmunity. – 2016. – Т. 49. – № 3. – С. 147-154.

2. Смирнова С.Ю. Эволюция опухолевых клонов при остром лимфобластном лейкозе взрослых / Смирнова С.Ю., Сидорова Ю.В., Рыжикова Н.В., Сычевская К.А., Паровичникова Е.Н., Судариков А.Б. // Acta Naturae (русскоязычная версия). – 2016. – Т. 8. – № 4 (31). – С. 108-118.

3. Смирнова С.Ю. Методика определения минимальной остаточной болезни при остром лимфобластном лейкозе / Смирнова С.Ю., Сидорова Ю.В., Судариков А.Б. // Справочник заведующего КДЛ. – 2015. – № 4. – С. 50-61.

4. Сидорова Ю.В. Определение В-клеточной клональности при лимфоме Ходжкина / Сидорова Ю.В., Рыжикова Н.В., Смирнова С.Ю., Никулина Е.Е., Бидерман Б.В., Ковригина А.М., Моисеева Т.Н., Шаркунов Н.Н., Судариков А.Б. // Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика. – 2014. – Т. 7. – № 1. – С. 63-66.

5. Сидорова Ю.В. Клональные реаранжировки и опухолевые клоны при периферической Т-клеточной лимфоме / Сидорова Ю.В., Чернова Н.Г., Рыжикова Н.В., Смирнова С.Ю., Синицына М.Н., Виноградова Ю.Е., Джулакян У.Л., Ковригина А.М., Звонков Е.Е., Судариков А.Б. // Acta Naturae (русскоязычная версия). – 2015. – Т. 7. – № 3 (26). – С. 130-140.

6. Пенская Е.А. Первичная кожная диффузная В-крупноклеточная лимфома, тип нижних конечностей с атипичной клинической картиной и индолентным течением / Пенская Е.А.,

Бабаева Ф.Э., Кравченко С.К., Ковригина А.М., Горенкова Л.Г., Смирнова С.Ю., Нестерова Е.С., Силаев М.А., Звонков Е.Е., Магомедова А.У., Лезвинская Е.М., Воробьев А.И. // Гематология и трансфузиология. – 2015. – Т. 60. – № 4. – С. 44-47.

7. Быкова А.В. Взаимосвязь полиморфизма гена UGT1A1 с частотой возникновения гипербилирубинемии у больных хроническим миелолейкозом, получающих терапию нилотинибом / Быкова А.В., Абдуллаев А.О., Гусарова Г.А., Челышева Е.Ю., Треглазова С.А., Смирнова С.Ю., Туркина А.Г. // В книге: Современная гематология. Проблемы и решения. VIII Научно-практическая конференция. Тематическая выставочная экспозиция. Программа, материалы конференции, каталог участников выставки. Правительство Москвы, Департамент здравоохранения г. Москвы. В рамках направления "Внедрение новых медицинских технологий, методик лечения и профилактики заболеваний в практическое здравоохранение города Москвы и Московского региона". – 2014. – С. 14-16.

8. Чернова Н.Г. Гепатолиенальная Т-клеточная лимфома: проблемы диагностики и лечения / Чернова Н.Г., Джулакян У.Л., Виноградова Ю.Е., Сидорова Ю.В., Рыжикова Н.В., Коржова С.М., Синицына М.Н., Тихомиров Д.С., Наумова Е.В., Обухова Т.Н., Двирнык В.Н., Судариков А.Б., Ковригина А.М., Кравченко С.К., Меликян А.Л., Кузьмина Л.А., Гальцева И.В., Смирнова С.Ю., Гемджян Э.Г., Звонков Е.Е. и др. // Терапевтический архив. – 2016. – Т. 88. – № 7. – С. 4-14.

9. Образцов И.В. Эксцизионные кольца V(D)I-рекомбинации В- и Т-клеток как прогностический маркер при В-клеточном хроническом лимфолейкозе / Образцов И.В., Гордукова М.А., Северина Н.А., Бидерман Б.В., Смирнова С.Ю., Судариков А.Б., Никитин Е.А., Румянцев А.Г. // Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика. – 2017. – Т. 10. – № 2. – С. 131-140.

10. Сидорова Ю.В. Результаты количественной RHOA GLY17VAL аллель-специфичной полимеразной цепной реакции и определения Т-клеточной клональности при ангиоиммунобластной Т-клеточной лимфоме / Сидорова Ю.В., Чернова Н.Г., Якутик И.А., Смирнова С.Ю., Рыжикова Н.В., Никулина Е.Е., Алексенко М.Ю., Синицына М.Н., Ковригина А.М., Моисеева Т.Н., Звонков Е.Е., Судариков А.Б. // Онкогематология. – 2017. – Т. 12. – № 4. – С. 41-49.

11. Басхаева Г.А. Роль мутаций гена IKZF1 при В-клеточном остром лимфобластном лейкозе у взрослых больных, получающих лечение по протоколам российского многоцентрового исследования / Басхаева Г.А., Паровичникова Е.Н., Бидерман Б.В., Гаврилина О.А., Давыдова Ю.О., Дроков М.Ю., Зарубина К.И., Лукьянова И.А., Троицкая В.В., Соколов А.Н., Пискунова

И.С., Степанова Е.А., Смирнова С.Ю., Судариков А.Б., Гальцева И.В., Обухова Т.Н., Савченко В.Г. // Гематология и трансфузиология. – 2018. – Т. 63. – № 1. – С. 16-30.

12. Сидорова Ю.В. Первые результаты оценки минимальной резидуальной болезни у больных ангиоиммунобластной Т-клеточной лимфомой методом количественной RHOA GLY17VAL аллель-специфичной полимеразной цепной реакции с LNA-модифицированными праймерами / Сидорова Ю.В., Чернова Н.Г., Смирнова С.Ю., Рыжикова Н.В., Никулина Е.Е., Алексенко М.Ю., Синицына М.Н., Ковригина А.М., Моисеева Т.Н., Звонков Е.Е., Судариков А.Б. //Гематология и трансфузиология.– 2018.–Т.63.–№51. – С. 100-101.

13. Смирнова С.Ю. Клиренс минимальной остаточной болезни в процессе лечения взрослых больных Ph-ОЛЛ по протоколу ОЛЛ-2009 / Смирнова С.Ю., Паровичникова Е.Н., Сидорова Ю.В., Рыжикова Н.В., Бидерман Б.В., Киселева П.В., Гаврилина О.А., Глинщикова О.А., Абакумова А.В., Ахмерзаева З.Х., Басхаева Г.А., Чабаева Ю.В., Куликов С.М., Судариков А.Б. // Гематология и трансфузиология. – 2018. – Т. 63. – № S1. – С. 179.

14. Сорокина Т.В. Композитные лимфомы. Опыт ФГБУ НМИЦ Гематологии Минздрава России / Сорокина Т.В., Аль-Ради Л.С., Чернова Н.Г., Кравченко С.К., Смирнова С.Ю., Моисеева Т.Н. // Гематология и трансфузиология. – 2018. – Т. 63. – № S1. – С. 103.

15. Смирнова С.Ю. В-клеточная клональность у больных аутоиммунной гемолитической анемией / Смирнова С.Ю., Коржова С.М., Цветаева Н.В., Сидорова Ю.В., Ковригина А.М., Никулина Е.Е., Никулина О.Ф., Судариков А.Б. // Гематология и трансфузиология. – 2018. – Т. 63. – № S1. – С. 178-179.

16. Давыдова Ю.О. Мониторинг минимальной остаточной болезни (МОБ) методами многоцветной проточной цитометрии и полимерной цепной реакции у пациентов, вошедших в клиническое исследование по протоколу «ALL-2016» / Давыдова Ю.О., Смирнова С.Ю., Гальцева И.В., Судариков А.Б., Капранов Н.М., Сидорова Ю.В., Гаврилина О.А., Троицкая В.В., Паровичникова Е.Н. // Гематология и трансфузиология. – 2018. – Т. 63. – № S1. – С. 60-61.

17. Sychevskaia K.A. Clonal T-lymphocyte populations in healthy donors / Sychevskaia K.A., Smirnova S., Sidorova Y., Ryzhikova N., Sudarikov A., Savchenko V. // Blood. – 2017. – Т. 130. – № S1. – С. 3598.

18. Sidorova Yu. High incidence of clonal CD8+ T-cell proliferation in non-malignant conditions may hamper the value of t-cell clonality assay for differential diagnosis in oncohematology / Sidorova Yu., Sychevskaya K., Chernova N., Smirnova S., Ryzhikova N., Gorodetskiy V., Naumova E., Julhakyan H., Zvonkov E., Sudarikov A. // Clinical Lymphoma, Myeloma and Leukemia. – 2018. – Т. 18. – № S1. – С. S299-S300.

19. Smirnova S. CD8+ T-cell clones persistent in bone marrow and peripherial blood during course of CD4+ angioimmunoblastic lymphoma / Smirnova S., Sidorova Y., Chernova N., Zvonkov E., Sinicina M., Sychevskaya K., Glinshchikova O., Ryzhikova N., Kovrigina A., Sudarikov A. // Haematologica. – 2017. – Т. 102. – № S2. – С. 575-576.

20. Smirnova S. Comparative analysis of clonal IG and TCR gene rearrangements in adult PH-negative ALL at the diagnosis and at the relapse / Smirnova S., Sidorova J., Biderman B., Sychevskaya K., Parovichnikova E., Ryzhikova N., Sudarikov A. // Haematologica. – 2016. – Т. 101. – № S1. – С. 658-659.

21. Sychevskaya K.A. Clonal evolution of follicular lymphoma cells from onset to relapse / Sychevskaya K.A., Biderman B.V., Kravchenko S.K., Plastinina L., Smirnova S.Yu., Babayeva F., Nikulina E.E., Mangasarova Ya.K., Sudarikov A.B. // HemaSphere. – 2018. – Т. 2. – № S1. – С. 1039.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

CDR – complementarity determining regions, гипервариабельный участок

CD – cluster of differentiation, кластер дифференцировки

EBV, ВЭБ – Epstein-Barr virus, вирус Эпштейна-Барр

Ct – threshold cycle пороговый цикл

HIV, ВИЧ – human immunodeficiency virus, вирус иммунодефицита человека

IG – immuglobulin, иммуноглобулин

АИГА – аутоиммунная гемолитическая анемия

АИТЛ – ангиоиммунобластная Т-клеточная лимфома

Алло-ТГСК – аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ИГХ – иммуногистохимия

КМ – костный мозг

ЛУ – лимфатический узел

МОБ – минимальная остаточная болезнь

ОЛ – острый лейкоз

ОЛЛ – острый лимфобластный лейкоз

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ПХТ – полихимиотерапия

РА – ревматоидный артрит

СКВ – системная красная волчанка