

На правах рукописи

РОМАНЮК ДМИТРИЙ СЕРГЕЕВИЧ

**ВЛИЯНИЕ МИНОРНЫХ АНТИГЕНОВ ГИСТОСОВМЕСТИМОСТИ И
ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ ИММУННЫХ КОНТРОЛЬНЫХ ТОЧЕК НА
ИММУННЫЙ ОТВЕТ ПОСЛЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ АЛЛОГЕННЫХ
ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК**

3.1.28 (14.01.21) – Гематология и переливание крови

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени

кандидата биологических наук

Москва – 2022

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

Научные руководители:

кандидат биологических наук
доктор медицинских наук

Ефимов Григорий Александрович
Паровичникова Елена Николаевна

Официальные оппоненты:

Оппонент 1

Ребриков Денис Владимирович – доктор биологических наук, профессор РАН, проректор по научной работе Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования "Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова" Министерства здравоохранения Российской Федерации

Оппонент 2

Боженко Владимир Константинович – доктор медицинских наук, заведующий научно-исследовательским отделом молекулярной биологии и экспериментальной терапии опухолей Федерального государственного бюджетного учреждения "Российский научный центр рентгено радиологии" Министерства здравоохранения Российской Федерации

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства Здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «__» _____ 2022 года в ____ часов на заседании диссертационного совета Д 208.135.03 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 « ____ » _____ 2022

Ученый секретарь диссертационного совета

кандидат медицинских наук

Сысоева Елена Павловна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Для терапии ряда опухолей гемопоэтической и лимфоидной ткани и некоторых неопухолевых заболеваний кроветворной системы применяют трансплантацию аллогенных гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК) [Lucarelli и др., 2012; Majhail и др., 2015]. Успешность лечения с использованием алло-ТГСК за последние десятилетия значительно выросла [McDonald и др., 2020]. При этом усилия по поиску новых эффективных методов борьбы с рецидивами и связанными с трансплантацией осложнениями не прекращаются, а количество проведённых аллогенных трансплантаций уже превысило миллион [Gratwohl и др., 2015]. Предпринимаются даже попытки отказаться от классической алло-ТГСК в пользу сочетанного применения аллогенных гемопоэтических клеток и генетически модифицированных регуляторных Т-клеток [Meyer и др., 2020].

Когда иммунные клетки от донора попадают в организм реципиента и встречают новые для себя антигены, может развиться реакция «трансплантат против хозяина» (РТПХ) [Efimov и др., 2016]. При этом одной из мишеней иммунного ответа служат минорные антигены гистосовместимости (МАГ) – эти пептиды могут различаться у донора и реципиента из-за популяционного разнообразия несинонимических однонуклеотидных полиморфизмов в белок-кодирующих генах [Vykova, Malko, Efimov, 2018; Griffioen, Bergen, Falkenburg, 2016]. Пептиды МАГ, образующиеся из собственных белков, представляются в контексте главного комплекса гистосовместимости (HLA). МАГ могут влиять на иммунный ответ после алло-ТГСК [Нобо и др., 2013]. Минорные антигены гистосовместимости, которые получают из специализированных для кроветворной ткани генов, могут служить мишенями направленной клеточной терапии рецидивов после алло-ТГСК [Pilunov и др., 2019; Pilunov и др., 2021; Vdovin, Vykova, Efimov, 2017]. При этом в регуляции активности Т-клеток, специфичных к МАГ, играют роль молекулы иммунных контрольных точек, такие как CTLA-4 [Gallardo и др., 2017].

Иммунный ответ на МАГ и его регуляция являются сложным, многофакторным процессом, а его изучение требует разработки методик для исследования данного явления. МАГ, не оцениваемые при обычном подборе донора для алло-ТГСК, могут участвовать в иммунных реакциях в ходе приживления трансплантата, а функциональные полиморфизмы генов ИКТ могут влиять на амплитуду этих реакций. Изучение МАГ позволит предсказывать возможные осложнения алло-ТГСК, связанные с иммунным ответом на МАГ, а также подобрать МАГ-мишень для направленной Т-клеточной терапии рецидивов лейкозов.

Цель исследования

Изучить влияние несоответствий донора и реципиента по минорным антигенам гистосовместимости, а также полиморфизма гена иммунных контрольных точек *CTLA4* на иммунный ответ после трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток.

Задачи исследования

1. Сформировать актуальный набор полиморфизмов, кодирующих минорные антигены гистосовместимости, представляемые в аллели HLA-A*02:01, выбрать полиморфизмы в генах иммунных контрольных точек, влияющие на иммунный ответ против минорных антигенов гистосовместимости и разработать метод быстрого параллельного генотипирования этих полиморфизмов;
2. Определить частоту встречаемости исследуемых полиморфизмов, кодирующих минорные антигены гистосовместимости, у доноров ГСК из регистра ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России и определить несоответствия по выбранным минорным антигенам гистосовместимости между донорами и реципиентами;
3. Определить степень влияния выбранных полиморфизмов в гене *CTLA4* на иммунный ответ после трансплантации от HLA-совместимого родственного и неродственного донора;
4. Определить степень влияния различий в паре донор-реципиент по полиморфизмам, кодирующим минорные антигены гистосовместимости, на иммунный ответ после трансплантации от HLA-совместимого родственного и неродственного донора и на основе проведённого исследования предложить потенциально клинически значимые минорные антигены гистосовместимости и полиморфизмы генов иммунных контрольных точек.

Научная новизна исследования

1. Впервые исследована роль 20 МАГ, представляемых в HLA-A*02:01, в иммунных процессах, происходящих у пациентов с острыми лейкозами после алло-ТГСК. На выборке из 444 человек, показана встречаемость полиморфизмов, кодирующих эти 20 МАГ в России.
2. Установлена связь полиморфизма с.49A>G гена *CTLA4* с иммунными процессами, происходящими у пациентов с острыми лейкозами после алло-ТГСК.
3. С помощью разработанного и запатентованного метода генотипирования выявляли наличие 20 МАГ, представляемых в HLA-A*02:01, и полиморфизма с.49A>G в гене *CTLA4*. Для анализа результатов генотипирования разработано собственное программное обеспечение.

Теоретическая и практическая значимость

Практическая значимость работы заключается, во-первых, в разработке надёжного метода для быстрого определения наличия у доноров и реципиентов 20 МАГ, представляемых в HLA-A*02:01, и полиморфизма с.49A>G в гене *CTLA4*, что позволило генотипировать более

600 потенциальных доноров из регистра «НМИЦ гематологии», а также 140 пар доноров и реципиентов «НМИЦ гематологии». Метод позволил сократить расход реактивов и расходных материалов при уменьшении времени проведения генотипирования. Для автоматизации анализа данных АС-ПЦР-РВ разработано собственное программное обеспечение, дополнительно сократившее время до результата.

Во-вторых, показаны механизм детекции МАГ-специфичных Т-клеток памяти в циркуляции пациентов и подходящие МАГ, на которых следует сфокусировать внимание в дальнейших исследованиях.

В-третьих, разработанный метод исследования МАГ позволит подбирать МАГ-мишени для направленной клеточной терапии рецидива при острых лейкозах.

Положения, выносимые на защиту

- Разработан чувствительный и специфичный метод генотипирования 20 полиморфизмов, кодирующих минорные антигены гистосовместимости, представляемые в контексте HLA-A*02:01, и полиморфизма с.49A>G гена *CTLA4*. Разработано программное обеспечение для автоматизированного анализа результатов;
- Показано, что встречаемость 20 МАГ, представляемых в контексте HLA-A*02:01, в российской популяции сопоставима со встречаемостью в европейской популяции. Выбраны оптимальные для направленной клеточной терапии МАГ: LB-NDC80-1P/A, LB-CCL4-1T, HA-1.
- Показано, что встречаемость полиморфизма с.49A>G гена *CTLA4* в российской популяции сопоставима со встречаемостью в европейской популяции. Показана связь генотипа с.49A>G AA с увеличенной трёхлетней вероятностью развития рецидива и сниженной трёхлетней безрецидивной выживаемостью у пациентов с острыми лейкозами после алло-ТГСК от неродственного HLA-идентичного донора.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 22 печатные работы, из них 8 статей в журналах рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ, один патент.

Апробация

Результаты работы представлены на отечественных и зарубежных конгрессах и конференциях в формате устных и стендовых докладов, тезисов на шестой Школе продвинутой иммунологии сообщества NIF, Неаполь, Италия, 2017 год; на ежегодном симпозиуме «Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток. Генная и клеточная терапия», Санкт-Петербург, 2017 год и на пятом Европейском иммунологическом конгрессе, Амстердам, Нидерланды, 2018 год.

Объем и структура диссертации

Работа изложена по традиционному плану на 122 страницах, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов, заключения, выводов, списка сокращений и списка литературы (192 источника). Список литературы включает 8 отечественных и 184 зарубежных источника. Текст работы содержит 18 рисунков, 12 таблиц и 4 формулы.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Объекты исследования

Объектом исследования являлись 608 доноров гемопоэтических стволовых клеток регистра Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, а также 147 доноров и 137 пациентов до проведения алло-ТГСК. Доноры и пациенты подписывали добровольное информированное согласие.

Методы исследования

Для проведения генотипирования 20 полиморфизмов, кодирующих МАГ, и одного, определяющего активность гена *CTLA4*, использовалась цельная кровь, взятая с антикоагулянтом ЭДТА. ДНК выделяли с помощью прибора Arrow (Isogen Life Science, Нидерланды) или набором для очистки ДНК Wizard (Promega, США).

Для генотипирования использовался метод собственной разработки, названный аллель-специфичная ПЦР в реальном времени. Для подбора праймеров из базы данных «ENSEMBL» с помощью собственной программы получали фрагменты размером 1000 пар нуклеотидов, содержащие целевой нсОНП, также на фрагментах были размечены другие ОНП с частотой минорного аллеля более 0.01. Для подбора праймеров использовались программы просмотра последовательностей «Geneious» версии 4.8, а также программ «OligoAnalyzer» (IDT, США) и «Multiple Primer Analyzer» (Thermo Fisher Scientific, США) и «Primer-BLAST». Для повышения специфичности метода в аллель-специфичные праймеры (АСП), вводилась нуклеотидная замена в предпоследнюю позицию. Праймеры группировали в панели по четыре аллеля в двух наборах (для каждого аллеля нсОНП). В качестве внутреннего контроля в каждом наборе АС-ПЦР-РВ использовали набор праймеров и зонд на ген $\beta 2$ -микроглобулина. Для одной реакции использовали 300 нМ каждого праймера и 200 нМ каждого зонда, для контрольного гена – 150 нМ и 100 нМ соответственно. Реакционные смеси готовили с использованием смесей праймеров и готовой пятикратной смеси для проведения ПЦР «qPCRmix-HS» (Евроген, Россия) с Taq полимеразой. Для АС-ПЦР-РВ выбраны следующие настройки термоциклирования: 95 °С – 2 минуты; 40 циклов: 98 °С – 10 секунд и 61 °С – 30 секунд с фиксацией флуоресценции. Реакции проводили на приборе «CFX96» (Bio-Rad, США). Для получения контрольных матриц

для АС-ПЦР-РВ использовали праймеры, фланкирующие нсОНП и участки связывания праймеров для АС-ПЦР-РВ, и набор «GeneJET Plasmid Miniprep» (Thermo Fisher Scientific, США). Определение аллелей ОНП проводили с помощью собственного программного обеспечения или программы «CFX Manager 3.1» (Bio-Rad, США). Для разработки программы анализа АС-ПЦР-РВ использовался язык программирования R.

Секвенирование по Сэнгеру проводили с помощью наборов реактивов «BigDye» 1.1 или 3.1 (Thermo Fisher Scientific, США), и очищали с помощью набора «BigDye XTerminator» (Thermo Fisher Scientific, США). Секвенирование проводили на генетических анализаторах «Нанофор-05» (ИАП РАН, Россия) или «ABI PRISM 3500» (Thermo Fisher Scientific, США). Анализ результатов проводили с помощью программного обеспечения «Sequencing analysis» версии 5.3 (Thermo Fisher Scientific, США). Для проведения полноэкзомного секвенирования использовали набор «Ion AmpliSeq Exome RDY» и прибор «Ion S5» (Thermo Fisher Scientific, США). Картирование прочтений на эталонный геном производили с помощью набора программ «Torrent Suite» (Thermo Fisher Scientific, США). Кодированные МАГ полиморфизмы анализировали в программе «Integrative Genomics Viewer».

Статистическая обработка результатов исследования

Для создания графиков накопления флуоресценции использовали программу «GraphPad Prism» версии 5.03 (GraphPad Software, США, www.graphpad.com). Распределение количества иммуногенных несоответствий рассчитывали с помощью собственного алгоритма на основе метода Монте-Карло для симуляции выбора как родственных, так и неродственных пар донор-реципиент после 10^7 итераций. Алгоритм реализован с помощью языка программирования Python версии 3.5. Статистический анализ популяционной представленности частот полиморфизмов, кодирующих МАГ, проводили с использованием языка программирования R версии 3.5.1 (the R foundation for Statistical Computing, Австрия).

Значимость различий между когортами считали с помощью теста Пирсона, рангового теста Вилкоксона и точного теста Фишера. Для оценки вероятности рецидива и РТПХ смерть рассматривали как конкурирующий риск и рассчитывали кумулятивную функцию инцидентности. Анализ проводили с помощью программного языка R версии 4.1 (the R foundation for Statistical Computing, Австрия) с помощью библиотеки `cmprsk` версии 2.2-10 (<https://cran.r-project.org/package=cmprsk>). Для оценки общей и безрецидивной выживаемости, а также вероятности развития рецидива, использовали метод Каплана–Майера. Для сравнения различий между 2 группами применяли `log-rank`-тест. При анализе использовали точный тест Фишера. Значимым считали показатель $p < 0,05$. Для оценки статистической достоверности прогностического фактора использовали тест Грея с порогом значимости $p < 0,05$. Поправку на множественное тестирование не проводили.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Аллель-специфичная ПЦР в реальном времени

Для быстрого генотипирования выбранных нсОНП, определяющих МАГ, мы использовали аллель-специфичную ПЦР, совмещённую с ген-специфичными гидролизными зондами (АС-ПЦР-РВ) (Рис. 1А). Независимо проводят две ПЦР-РВ для каждого аллеля, если аллель-специфичный праймер (АСП) связывается со своей мишенью – это приводит к амплификации фрагмента. За визуализацию накопления продукта ПЦР отвечает флуоресцентный зонд, общий для обеих реакций. Метод является существенным улучшением по сравнению с предыдущей панелью тестов для МАГ [Spierings и др., 2006] и позволяет генотипировать 20 МАГ (Табл. 1), представляемых в контексте HLA-A*02:01, для восьми образцов за час, без электрофореза или других дополнительных шагов. Предложенный метод генотипирования МАГ даёт результаты, которые легко анализировать визуально, наличие аллеля – это успешно прошедшая реакция. Если прошли обе реакции, образец гетерозиготен по данному локусу (Рис. 1Б). В случае делеции гена возможно только два состояния – обе реакции прошли или обе не прошли.

В ходе разработки панели генотипирования 20 МАГ было использовано 269 праймеров и зондов, из них 132 – различные варианты аллель-специфичных праймеров, с различными некомплементарными заменами. Такие замены подбирали для создания оптимального сочетания чувствительности и специфичности к исследуемым полиморфизмам, также приходилось учитывать совместимость внутри панелей. В готовый набор входит 38 АСП, 23 общих праймера и 21 гидролизный зонд.

Для проверки динамического диапазона метода использовали смеси контрольных плазмид в серии разведений эквивалентной 0,8 нг - 80 мкг ДНК человека (10 фг - 100 пг каждой плазмиды). С используемым набором реактивов надёжной реакции достигли при эквиваленте 80нг ДНК человека (1пг контрольной плазмиды) (Рис. 2). Проверка специфичности набора показала, что разница пороговых циклов между специфической (со своим аллелем нсОНП) и неспецифической (с другим аллелем нсОНП) АС-ПЦР-РВ составляла минимум 4,9 цикла (Рис. 3).

Для проверки метода использовали образцы ДНК от пяти HLA совместимых пар донор-реципиент. Одна пара была с родственным донором, и четыре с неродственными донорами. У всех пар был аллель *HLA-A*02:01*. Все образцы генотипировали вслепую с помощью АС-ПЦР-РВ и секвенирования по Сэнгеру. Из 200 протестированных событий секвенирование подтвердило все установленные аллели, определённые с помощью АС-ПЦР-РВ. Рисунок 4 демонстрирует сравнение результатов АС-ПЦР-РВ для одного образца.

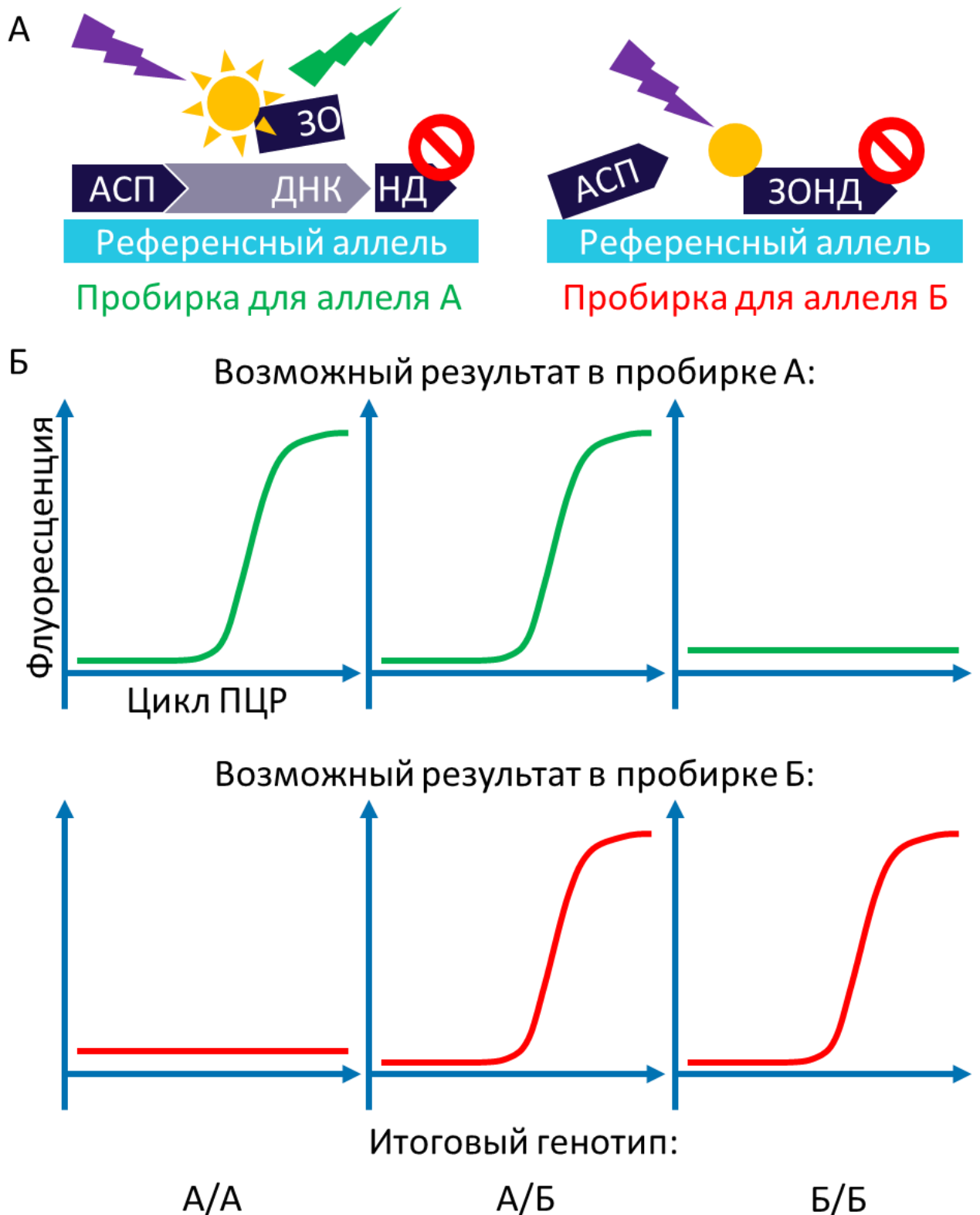


Рисунок 1. Схема метода АС-ПЦР-РВ и интерпретация результата [Romaniuk и др., 2019b]. А. Схема дискриминации аллелей нсОНП с помощью аллель-специфичной ПЦР-РВ на примере референсного аллеля исследуемого МАГ; Б. Возможные результаты для одного нсОНП (по вертикали) в каждой АС-ПЦР-РВ (по горизонтали).

Таблица 1. Минорные антигены гистосовместимости, представляемые в контексте HLA-A*02:01 [Romaniuk и др., 2019a].

МАГ	Ген	Хр.	Нт.	АК	ВИН	Номер	Ссылка
HER-2_P	<i>ERBB2</i>	17	C/G	P/A	0,247	rs1058808	[Wenandy и др., 2009]
HA-1/A2	<i>ARHGAP45</i>	19	G/A	R/H	0,246	rs1801284	[Haan и др., 1998]
HA-2	<i>MYO1G</i>	7	C/T	V/M	0,050	rs61739531	[Haan и др., 1995]
UTA2-1	<i>RESF1</i>	12	T/C	L/P	0,234	rs2166807	[Oostvogels и др., 2012]
LB-ADIR-1F	<i>TOR3A</i>	1	T/C	F/S	0,250	rs2296377	[Bergen и др., 2007]
LB-CLYBL-1Y	<i>CLYBL</i>	13	G/T	D/Y	0,056	rs17577293	[Hombrink и др., 2015]
C19ORF48	<i>C19ORF48</i>	19	T/A	T/S	0,082	rs3745526	[Tykodi и др., 2008]
TRIM22	<i>TRIM22</i>	11	C/T	R/C	0,019	rs187416296	[Wölfel и др., 2007]
LB-PRCP-1D	<i>PRCP</i>	11	T/G	E/D	0,226	rs2229437	[Bergen и др., 2010]
LB-SSR1-1S	<i>SSR1</i>	6	A/G	L/S	0,246	rs10004	[Bergen и др., 2010]
LB-WNK1-1I	<i>WNK1</i>	12	G/T	M/I	0,237	rs12828016	[Bergen и др., 2010]
T4A1	<i>TRIM42</i>	3	C/A	A/E	0,202	rs9876490	[Armistead и др., 2010]
HA-8	<i>PUM3</i>	9	C/G	R/P	0,206	rs2173904	[Brickner и др., 2001]
LB-HIVEP1-1S	<i>HIVEP1</i>	6	A/G	N/S	0,175	rs2228220	[Hombrink и др., 2013]
LB-NISCH-1A(V)	<i>NISCH</i>	3	C/T	A/V	0,220	rs887515	[Hombrink и др., 2013]
UGT2B17/A2	<i>UGT2B17</i>	4			0,123	esv3600873	[Kamei и др., 2009]
LB-CCL4-1T	<i>CCL4</i>	17	T/A	S/T	0,246	rs1719152	[Bergen и др., 2017]
LB-NCAPD3-1Q	<i>NCAPD3</i>	11	C/T	R/Q	0,130	rs12292394	[Bergen и др., 2017]
LB-NDC80-1P(A)	<i>NDC80</i>	18	G/C	A/P	0,241	rs9051	[Bergen и др., 2017]
WDR27-1L	<i>WDR27</i>	6	A/G	L/P	0,205	rs4236176	[Granados и др., 2016]

МАГ – минорный антиген гистосовместимости, Хр. – хромосома, содержащая представленный ген; Нт. – нуклеотидный полиморфизм; АК – аминокислотная замена; ВИН – вероятность иммуногенного несоответствия по МАГ для неродственного донора; Номер – идентификационный номер полиморфизма согласно базам данных dbSNP [Sherry и др., 2001] и Ensembl [Cunningham и др., 2021]. Иммуногенный аллель и соответствующие нуклеотид и аминокислота выделены жирным, первым идёт референсный аллель согласно базе данных Ensembl (версия генома – GRCh38).

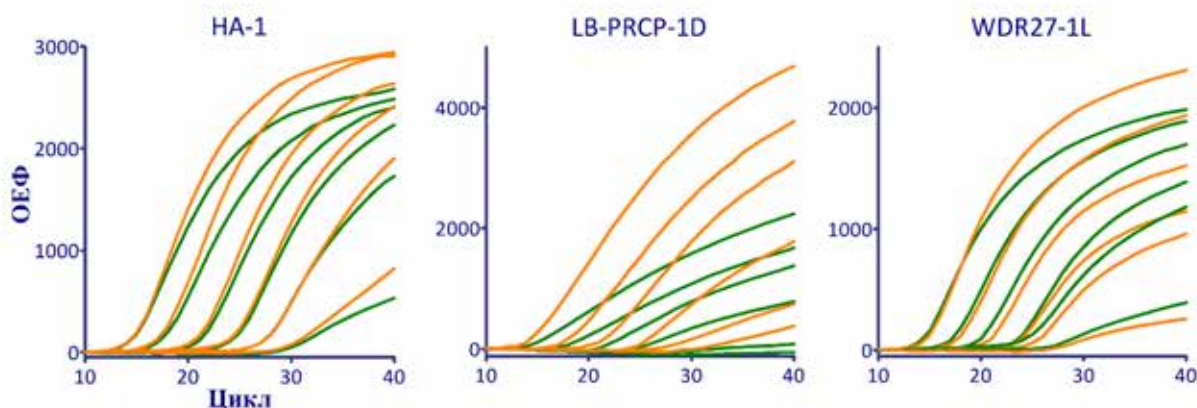


Рисунок 2. Динамический диапазон АС-ПЦР-РВ для выборочных МАГ с контрольными матрицами [Romanіuk и др., 2019b]. Показаны только кривые АС-ПЦР-РВ с соответствующим аллелем, зелёные для референсных аллелей, оранжевые для альтернативных. ОЕФ – относительные единицы флуоресценции.

Дальнейшее тестирование проводили с помощью набора данных полученных после полноэкзомного секвенирования для восьми дополнительных HLA-совместимых пар донор-реципиент. Из 278 сравнений генотипирования с результатами АС-ПЦР-РВ, отличия были в пяти случаях. В случае МАГ LB-WNK1-1I в образце p1032, соответствующий нсОМП, был неверно определён в АС-ПЦР-РВ тесте из-за редкого нсОМП rs56245971, расположенного в семи нуклеотидах от исследуемого. В ходе разработки праймеров этот нсОМП не учитывали, вероятность его появления составляет 0,005%.

Ограничения у разработанного метода те же, что и у других методов, требующих аллель-специфичных праймеров: если в участке связывания праймера содержится ранее неизвестный или редкий (меньше 1% в популяции) полиморфизм, то результат АС-ПЦР может исказиться. Необходимо помнить про эти риски, тем не менее, ввиду огромного количества редких полиморфизмов, кажется разумным не учитывать их при разработке АСП.

Наличие метода для быстрого генотипирования МАГ в парах донор-реципиент позволит ускорить и упростить исследования иммунного ответа на МАГ. Ещё одно возможное применение предложенного метода – это выбор терапевтических мишеней для пост-трансплантационной иммунотерапии рецидивов. АС-ПЦР-РВ может быть использована для предварительного генотипирования доноров и пациентов для определения возможных МАГ-мишеней. Метод АС-ПЦР-РВ для панели МАГ, представляемых в HLA-A*02:01, защищен патентом RU 2675597 C1.

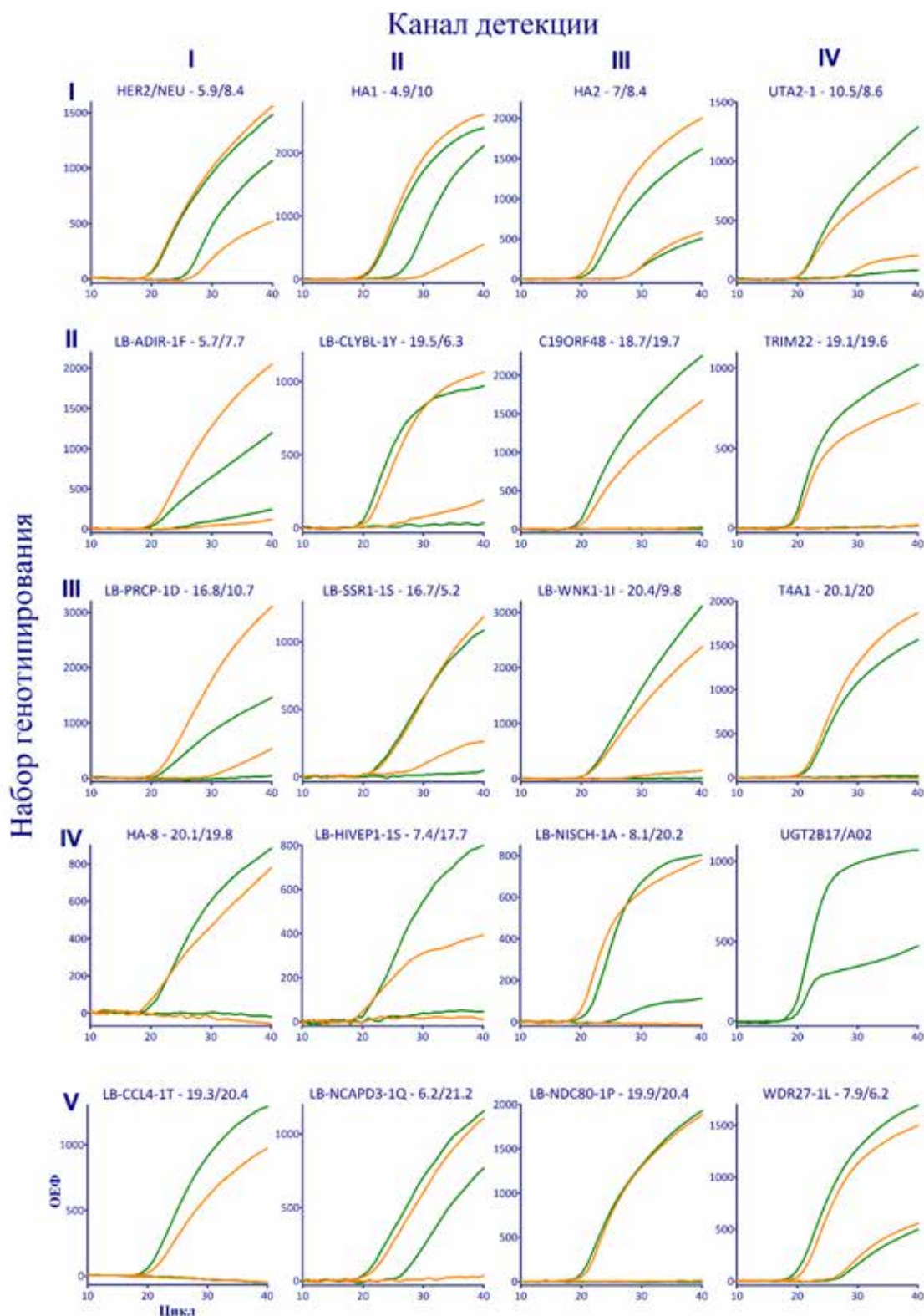


Рисунок 3. Проверка аллель-специфичных праймеров с помощью смеси контрольных плазмид [Romanuk и др., 2019b]. На каждом графике вместе показаны кривые накопления флуоресценции АС-ПЦР-РВ для двух аллелей МАГ и двух контрольных матриц (для каждого аллеля). Каждый ряд – один набор генотипирования, столбец – канал детекции прибора. Реакции с АСП к референсному аллелю показаны зелёным, к альтернативному – оранжевым. Средние значения порогового цикла двух повторов приведены в заголовке графика (сначала для реакции на референсный аллель). Для МАГ UGT2b17/A2 оба набора содержали одинаковые праймеры. ОЕФ – относительные единицы флуоресценции.

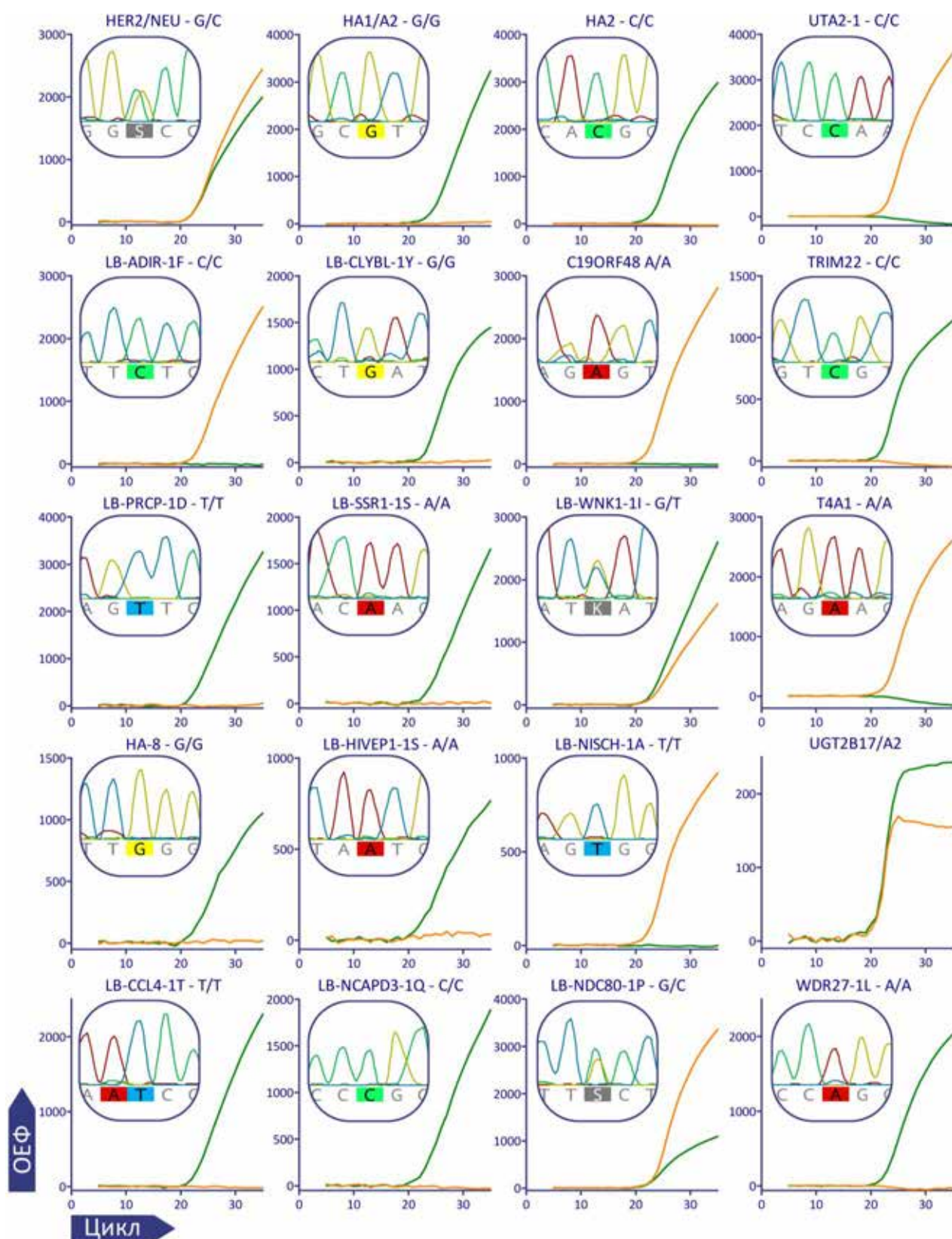


Рисунок 4. Проверка метода генотипирования МАГ АС-ПЦР-РВ на примере образца р909 [Romanіuk и др., 2019b]. Ряды – один набор АС-ПЦР-РВ, столбец – канал детекции. Кривые накопления флуоресценции зелёного и оранжевого цвета для референсного и альтернативного аллелей соответственно. ОЕФ – относительные единицы флуоресценции.

Программа AScall для автоматизированного анализа АС-ПЦР-РВ

Максимально возможное количество событий с использованием пятицветного варианта метода АС-ПЦР-РВ и 96-луночного планшета достигает 480. При ручном просмотре и внесении результатов в базу данных такого количества событий не исключены человеческие ошибки. Программа, названная AScall, разработана с целью облегчить анализ данных, полученных методом АС-ПЦР-РВ. Общий план работы программы приведён на рисунке 5. Программа AScall написана на языке программирования R с библиотекой Shiny. На вход принимаются данные от широкого перечня ПЦР-РВ приборов, как первичные, так и с вычисленными пороговыми циклами. Поддерживаемые форматы файлов включают rdml, lc96r, xlsx и другие. В программе возможен совместный анализ нескольких файлов. AScall работает в разных операционных системах в виде браузерного приложения. Её можно использовать по адресу <http://shtest.evrogen.net/AScall/> или локально, на персональном компьютере. Программа обладает интерфейсом, схожим с программным обеспечением (ПО) для приборов ПЦР-РВ. AScall можно использовать с любым количеством цветовых каналов и образцов.

Панель управления разделена на три зоны: ввод и обработка данных, два вида вывода результатов и набор фильтров для результатов (Рис. 6). ПО позволяет загрузить несколько файлов для совместного анализа и позволяет настроить отдельные пороги и диапазоны для улучшения определения генотипов на определённом оборудовании. Более того, ПО позволяет рассчитать пороговый цикл, используя восемь вариантов приближения с помощью кривых, семь способов расчёта самого порогового цикла и перенастраиваемый диапазон для фоновой флуоресценции (Рис. 6А, Б).

Программа не ограничена приведённой панелью МАГ, а работает с любым правильно сформированным набором праймеров и зондов и любым количеством реакций на лунку, использование универсального формата данных для ПЦР-РВ – RDML позволяет использовать программу AScall для анализа результатов, полученных с помощью различных приборов и в соответствии с методическими рекомендациями по минимальной информации для публикации ПЦР-РВ экспериментов (MIQE).

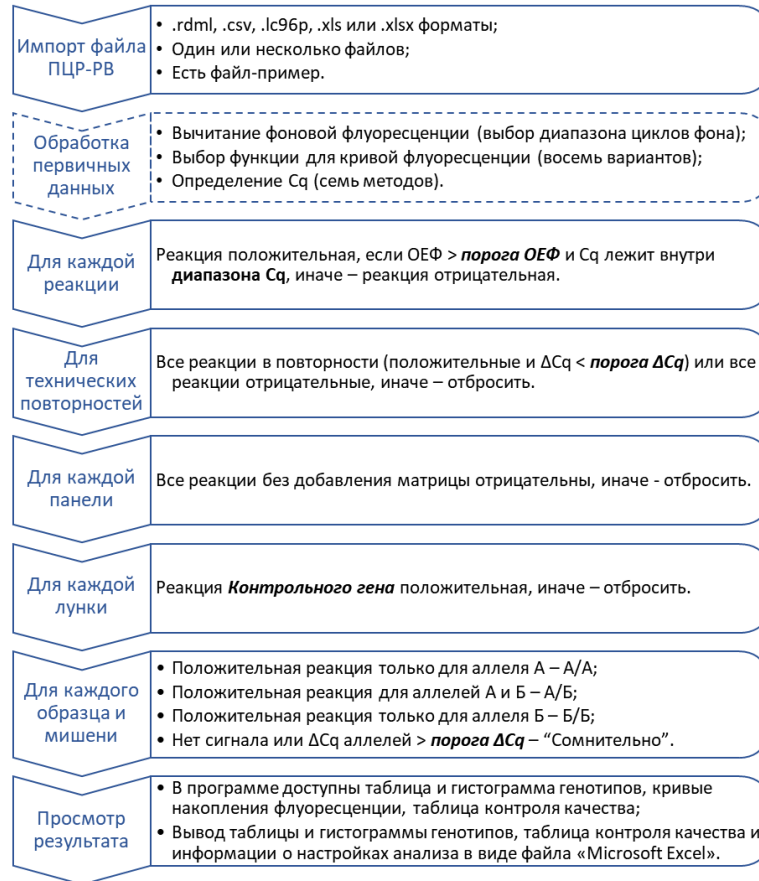


Рисунок 5. Схема анализа данных АС-ПЦР-РВ с помощью программы AScall [Blagodatskikh, Romaniuk, Malko, 2020]. Cq – пороговый цикл; ОЕФ – относительные единицы флуоресценции; ΔCq – разница пороговых циклов между парой АС-ПЦР-РВ для одного МАГ; необязательный шаг показан пунктиром.



Рисунок 6. Панель управления программы AScall [Blagodatskikh, Romaniuk, Malko, 2020]. А. Выбор данных; Б. Настройки анализа; В. Фильтры для отображения данных; Г. Подразделы программы с общей информацией, детализацией результатов и справочной информацией; Д. Общий вид вкладки с обзорными диаграммой и таблицей генотипирования.

Встречаемость аллелей, кодирующих МАГ, представляемые в HLA-A*02:01

С использованием выборки доноров ГСК регистра ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России проведён анализ популяционной частоты для 20 полиморфизмов, кодирующих МАГ, связанные с HLA-A*02:01. После генотипирования и отбраковки некоторых результатов (неполный генотип хотя бы для одного из МАГ), статистический анализ провели для 444 генотипов. Проверку на независимое распределение в популяции по закону Харди-Вайнберга (ЗХВ) прошли 18 нсОМП ($p = 1 \times 10^{-6}$). Из-за технических ограничений проверку не проводили для делеции гена *UGT2B17* (МАГ UGT2B17/A2) и нсОМП rs187416296 (МАГ TRIM22). Мы сравнили результаты с базой данных «1000 геномов» (Рис. 7А). Европейская популяция была выбрана для сравнения как наиболее близкая к исследуемой по данным анализа с помощью метода главных компонент (Рис. 7Б). Отдельное сравнение для всех МАГ выявило значимые отличия частот для МАГ LB-NISCH-1A, LB-PRCP-1D, LB-CLYBL-1Y, HA-8, UTA2-1 и LBWNK1-1I. В абсолютных значениях наибольшее различие составило 0,07 для МАГ LBWNK1-1I.

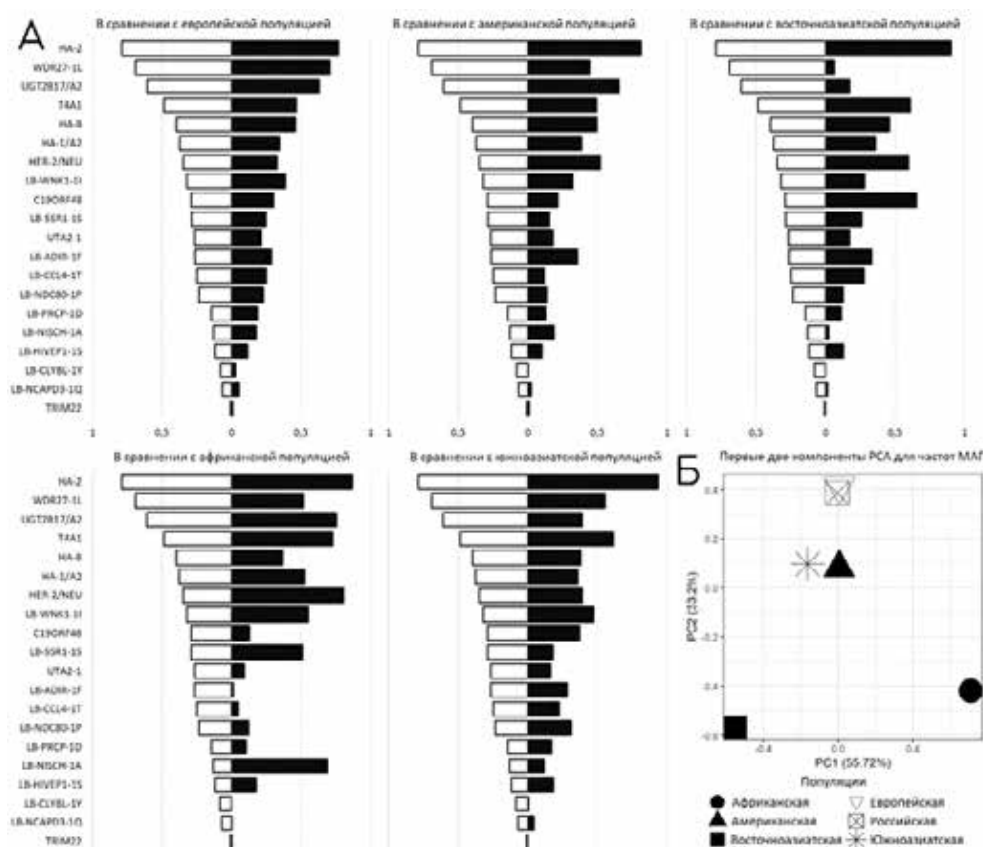


Рисунок 7. Популяционная представленность 20 кодирующих МАГ полиморфизмов [Romanjuk и др., 2019a]. А. Частоты иммуногенных аллелей нсОМП в российской популяции в сравнении с суперпопуляциями проекта «1000 геномов» [Birney, Soranzo, 2015]. Для кодоминантных МАГ указана только частота одного из двух аллелей. Частоты по данным «НМИЦ гематологии» слева (белые), соответствующие частоты в указанной суперпопуляции – справа (черные). Б. Сравнение частот иммуногенных аллелей методом главных компонент.

Расчётная иммуногенность МАГ, представляемых в HLA-A*02:01

Вероятность, что донор и реципиент будут иметь иммуногенное несоответствие по МАГ, можно рассчитать исходя из частоты аллелей нсОНП, кодирующих МАГ [Armistead и др., 2010; Вукова, Malko, Efimov, 2018]. Иммуногенное несоответствие возникает в случае, если у донора нет аллелей, кодирующих МАГ, а у реципиента есть хотя бы один такой аллель. Вероятность иммуногенного несоответствия (ВИН) по МАГ в европейской популяции варьирует от 0,02 для TRIM22 до 0,25 для LB-ADIR-1F. ВИН нелинейно зависит от частоты аллелей, ВИН равная 0,25 – это максимально возможный для доминантных МАГ показатель, достижимый при частоте кодирующего МАГ аллеля – 0,293. С помощью полученных данных была рассчитана ВИН для HLA-совместимых пар (Табл. 1). ВИН рассчитывали отдельно для родственных и неродственных пар. МАГ LB-SSR1-1S оказался самым иммуногенным как для европейской популяции, так и для выборки «НМИЦ гематологии». ВИН составила 0,33 для неродственных пар. С помощью полученных частот и ВИН для выборки «НМИЦ гематологии» мы вычислили распределение количества несоответствий для случайной пары «донор-реципиент». Компьютерная симуляция для родственных и неродственных пар показала, что три и более несоответствия могут возникнуть в 30,5% и 72,7% случаев соответственно. Также было посчитано количество несоответствий для 86 HLA совместимых пар, прошедших ТГСК в «НМИЦ гематологии» и несущих аллель *HLA-A*02:01*. В результате анализа 46 родственных и 40 неродственных пар мы получили подобное ожидаемому количество несоответствий (Рис. 8). В выборке было в среднем 1,74 и 3,82 различия для родственных и неродственных пар соответственно ($p = 1,56604 \cdot 10^{-07}$).

Далее значения ВИН совместили с данными по экспрессии генов, кодирующих МАГ (Табл. 2). Если ген, кодирующий МАГ, экспрессируется преимущественно в гемопоэтической ткани, то иммуногенное несоответствие по МАГ может привести к реакции «трансплантат против лейкоза» (РТПЛ), а такой МАГ – хорошая мишень иммунотерапии рецидива. Если экспрессия есть во всех тканях организма или ограничена другими тканями, то возможна РТПХ. Уровень экспрессии гена, кодирующего МАГ HA-1, в гемопоэтической ткани в три раза выше, чем в других тканях, где обычно проявляется РТПХ. При этом ВИН для МАГ HA-1 равна почти максимальным 0,24. Кроме того, хорошими мишенями для терапии могут быть МАГ LB-CCL4-1T и LB-NDC80-1P/A, их экспрессия преобладает в гемопоэтической ткани, а ВИН составляет 0,25 и 0,30 соответственно. Экспрессируемые в гемопоэтической ткани МАГ в случае иммунного ответа на них могут снижать риск развития рецидива. Полученные для выборки НМИЦ гематологии данные по частотам нсОНП, кодирующих 20 МАГ, могут быть использованы в предсказании осложнений после алло-ТГСК и в разработке новых методов иммунотерапии рецидивов после алло-ТГСК.

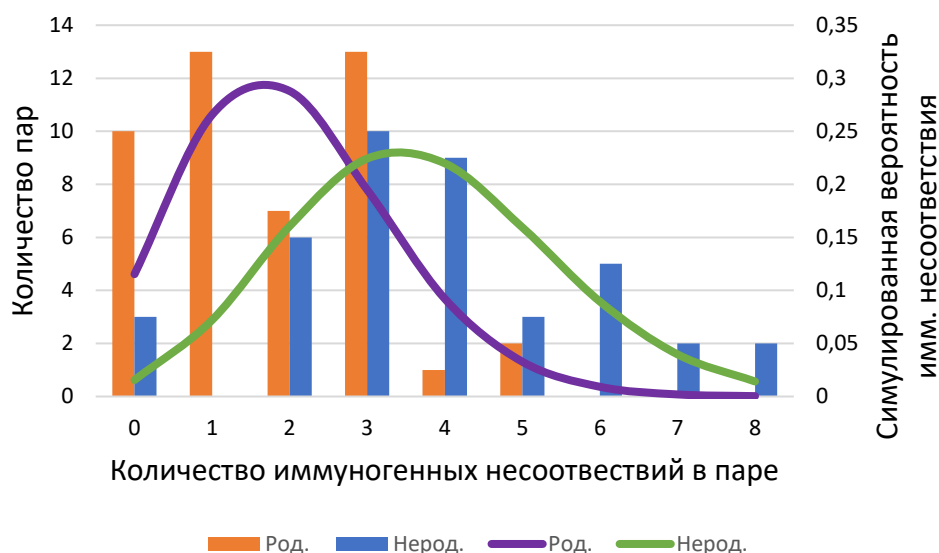


Рисунок 8. Симулированное и реальное распределение количества несоответствий для 46 родственных и 40 неродственных пар донор-реципиент, несущих аллель *HLA-A*02:01*. Линии – данные симуляции, диаграмма – полученные результаты.

Таблица 2. Определение превалирующих для кроветворной ткани МАГ на основании данных проекта «Белковый атлас человека» [Digre, Lindskog, 2020]. [Romaniuk и др., 2019a].

МАГ	Представленность	Органы с макс. ПНМ	Кр. ткань / РТПХ-ткань
HA-1/A2	Тканеспецифична	Легкие	3,31
LB-NDC80-1	Смешанная	Прямая кишка	1,80
HA-2	Тканеспецифична	Легкие	1,34
LB-CCL4-1T	Тканеспецифична	Желчный пузырь	1,17
LB-NCAPD3-1Q	Повсеместно	Эндокринная система	1,00
LB-ADIR-1F	Повсеместно	Эндокринная система	0,70
C19ORF48	Повсеместно	Эндокринная система	0,67
HA-8	Повсеместно	Пищевод	0,51
TRIM22	Повсеместно	Легкие	0,50
UTA2-1	Повсеместно	Желчный пузырь	0,48
LB-SSR1-1	Повсеместно	Эндокринная система	0,46
LB-WNK1-1I	Повсеместно	Пищевод	0,43
LB-HIVEP1-1S	Смешанная	Эндокринная система	0,42
WDR27-1L	Повсеместно	Эндокринная система	0,39
LB-NISCH-1	Повсеместно	Кожа	0,26
LB-PRCP-1D	Повсеместно	Почки	0,18
LB-CLYBL-1	Повсеместно	Почки	0,05
HER-2/NEU	Повсеместно	Эндокринная система	0,01
UGT2B17/A2	Тканеспецифична	Тонкий кишечник	0,00
T4A1	Тканеспецифична	НД	НД

МАГ – минорный антиген гистосовместимости. Представленность – оценка распределения белков, содержащих МАГ, по тканям по данным проекта «Белковый атлас человека». Ткань с макс. ПНМ – не кроветворная ткань, с наибольшей экспрессией белка, содержащего МАГ; ПНМ – нормированное на миллион прочтений количество прочтений целевого транскрипта в ходе РНК-секвенирования; Кр. ткань / РТПХ-ткань – отношение ПНМ белка, кодирующего МАГ в кроветворной ткани к ткани с максимальным ПНМ, значение >1 показывает, что скорее будет развиваться РТПХ; НД – не доступно.

Роль полиморфизма с.49A>G гена *CTLA4* у донора в развитии иммунных реакций после алло-ТГСК

Для определения частоты встречаемости полиморфизма с.49A>G в гене *CTLA4* мы использовали когорту из 102 доноров костного мозга. Полученные от них образцы ДНК генотипировали на нсОМП с.49A>G с помощью метода АС-ПЦР-РВ, описанного ранее. Генотипы А/А, А/Г и Г/Г составили 0,33; 0,49 и 0,18 соответственно. Рассчитанная с помощью закона Харди-Вайнберга частота аллеля А составила – 0,573, аллеля Г – 0,427. Полученные частоты статистически не отличались от значений для европейской суперпопуляции проекта «1000 геномов»: А – 0,641, Г – 0,359.

Для анализа роли полиморфизма с.49A>G гена *CTLA4* у донора была взята группа из 33 пар донор-реципиент после неродственной совместимой алло-ТГСК. Этим 33 пациентам с острыми лейкозами была выполнена трансплантация в статусе полной ремиссии от неродственных HLA-совместимых доноров в «НМИЦ гематологии», в период с 2012 по 2018 г. Для профилактики РТПХ пациенты получали АТГ в суммарной дозе 40 мг/кг с -4 по -1 день, циклоспорин А в дозе 3мг/кг/сут с -1 дня, микофенолата мофетил 3000 мг/сут с +1 дня. Кроме того, для 31 пациента (94%) использовали метотрексат – 15 мг/м² на первый день после ТГСК и 10 мг/м² на 3, 6 и 11 дни после трансплантации. Для доноров было проведено генотипирование полиморфизма с.49A>G, а для пациентов собраны анамнезы. Генотипы донора А/Г и Г/Г связаны с более высокой трёхлетней безрецидивной выживаемостью реципиента. Безрецидивная выживаемость для этих генотипов составила 62,8%, а в группе с генотипом с.49A>G А/А – 12,7%, $p = 0,01$ (Рис. 9). Вероятность развития рецидива после ТГСК составила 83,7% для реципиентов от доноров с генотипом А/А и 29,3% – для генотипов А/Г и Г/Г, $p = 0,03$ (Рис. 10).

Возможным объяснением роли нсОМП с.49A>G гена *CTLA4* в посттрансплантационных осложнениях может быть снижение функциональной активности CTLA-4 за счёт нарушения процесса его секреции [Ligers и др., 2001]. В таком случае общее количество ингибирующих сигналов от мембранного CTLA-4 снижается, и баланс смещается в сторону активирующих Т-клетку сигналов. При трансплантации ГСК от донора с генотипом с.49A>G А/А белок экспрессируется нормально и Т-клеточный иммунный ответ ингибируется, снижая возможность РТПЛ и повышая риск рецидива.

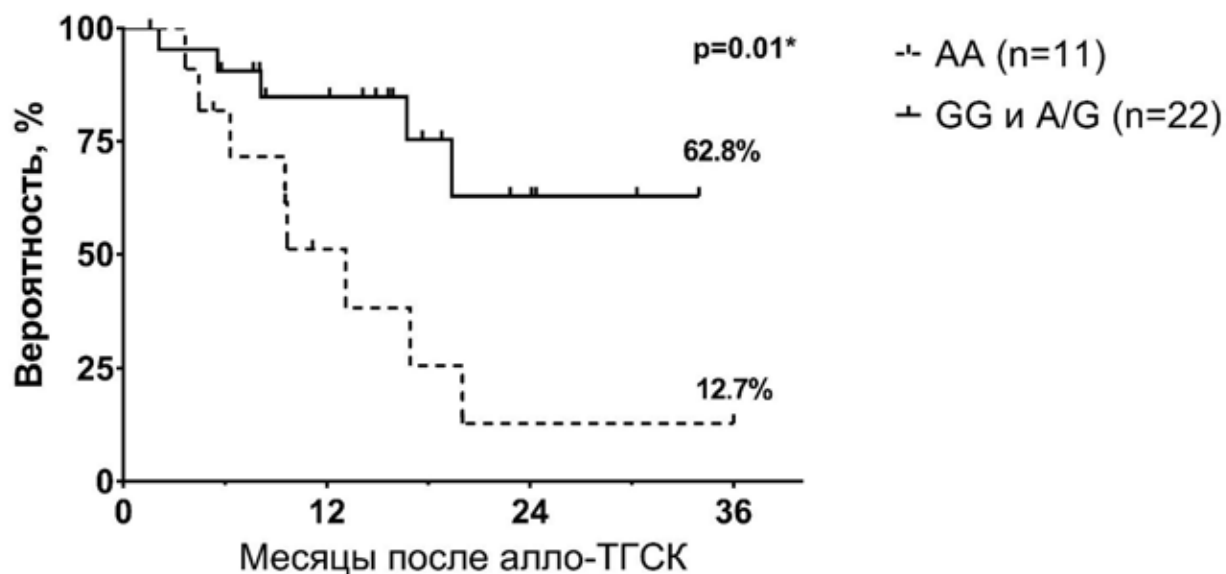


Рисунок 9. Влияние полиморфизма с.49A>G гена *CTLA4* у донора на трёхлетнюю безрецидивную выживаемость пациентов с острыми лейкозами после алло-ТГСК от неродственного HLA-идентичного донора [Romaniuk и др., 2019с].

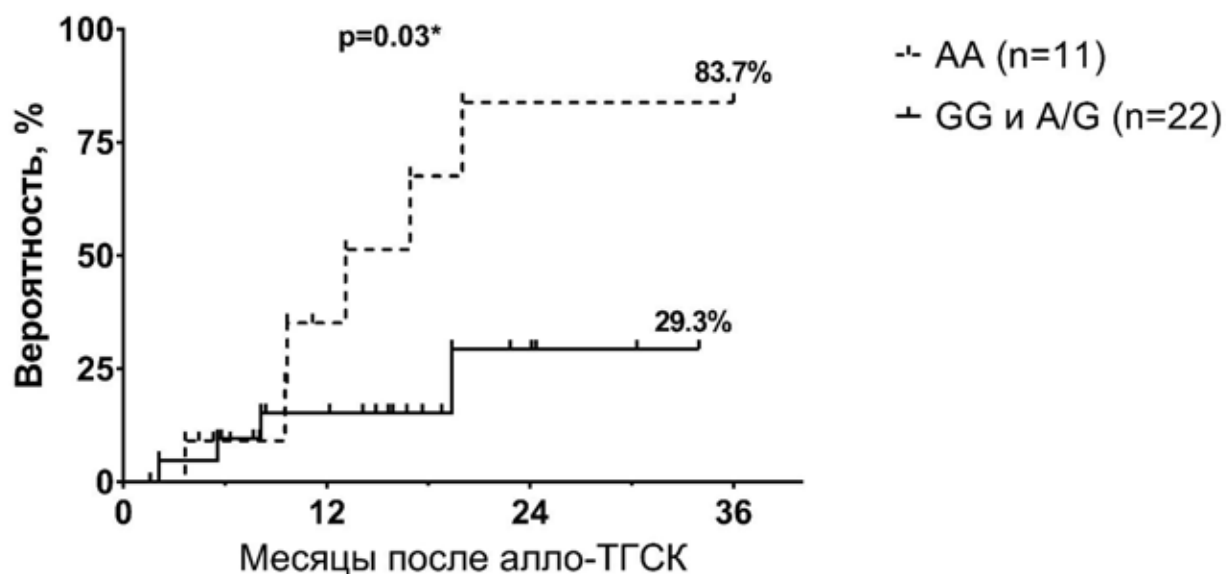


Рисунок 10. Влияние полиморфизма с.49A>G гена *CTLA4* у донора на трёхлетнюю вероятность развития рецидива у пациентов с острыми лейкозами после алло-ТГСК от неродственного HLA-идентичного донора [Romaniuk и др., 2019с].

Иммуногенность МАГ, представляемых в HLA-A*02:01, и влияние полиморфизма с.49A>G в гене *CTLA4* на иммунный ответ после алло-ТГСК

Анализ влияния МАГ на иммунные процессы после ТГСК возможен только с учётом аллеля *HLA* – он определяет, будет ли на поверхности клетки представлен тот или иной МАГ. Мы отобрали когорту из 45 пар доноров и пациентов с острым лейкозом. Трансплантация выполнена в полной ремиссии. Все пары несли аллель *HLA-A*02:01*. Всем пациентам была выполнена алло-ТГСК от HLA-совместимого родственного или неродственного доноров. Для

всех определяли состояния 20 нсОМП, кодирующих МАГ, и отдельно для доноров – состояние нсОМП с.49А>G в гене *CTLA4*. Дополнительно пациентов разделяли на подгруппы с совместимыми родственными донорами (СРД, n = 28) и с совместимыми неродственными донорами (СНД, n = 17). Группы уравновешены по полу, возрасту, статусу болезни перед алло-ТГСК и режиму кондиционирования. Почти всем реципиентам в СНД группе трансплантировали ГСК – 71% против 7,1% в СРД группе. Девять пациентов (7%) из СРД группы и один (6%) из СНД группы получили кроличий АТГ, остальные – лошадиный. Все реципиенты в СРД группе, прошедшие миелоаблативное кондиционирование (МАК), не получали АТГ. Пациенты, прошедшие режим кондиционирования сниженной интенсивности (СИК), и пациенты из группы СНД, прошедшие МАК, дополнительно принимали лошадиный или кроличий АТГ. Далее для этих пар «донор-реципиент» выявляли иммуногенные состояния аллелей, кодирующих МАГ.

Кумулятивную функцию выживания рассчитали для рецидива и оРТПХ для иммуногенных несоответствий для 20 МАГ, представляемых в HLA-A*02:01, для полиморфизма с.49А>G *CTLA4*, для количества иммуногенных несоответствий МАГ (больше или меньше среднего для группы) и для комбинации генотипа А/А с.49А>G в гене *CTLA4* с ситуацией отсутствия иммуногенного несоответствия для МАГ НА-1 и НА-2. Для приведённых факторов рассчитывали достоверность корреляции с вероятностью развития рецидива, оРТПХ или оРТПХ II-IV. Значения p приведены в Таблице 3. Как показатель иммуногенности несоответствия по МАГ рассматривалось возникновение оРТПХ (иммуногенность МАГ) и рецидива основного заболевания (отсутствие иммуногенности МАГ).

Мы обнаружили значимую корреляцию для иммуногенного несоответствия по МАГ НА-8 и LB-ADIR-1F и рецидивом, а для LB-CLYBL-1Y – с оРТПХ в группе СРД. В группе СНД несоответствие по WDR27-1L было связано с развитием оРТПХ (Табл. 3). Мы считаем, что надо с аккуратностью говорить о возможном влиянии LB-CLYBL-1Y и WDR27-1L на вероятность развития РТПХ, так как было только по одному событию в каждой группе. Для повсеместно экспрессируемых МАГ НА-8 и LB-ADIR-1F связь возможна, но требует дополнительной проверки.

Мы проверили совместное влияние полиморфизма с.49А>G в *CTLA4* и МАГ, связанных с HLA-A*02:01. Для этого мы исследовали когорту пациентов с генотипом А/А нсОМП с.49А>G и отсутствием МАГ НА-1 и НА-2 как группу риска с более вероятным рецидивом. Кроме того, в новой выборке мы ещё раз проверили роль с.49А>G независимо от МАГ. Оба сценария не показали значимой связи с клиническими проявлениями после алло-ТГСК.

Таблица 3. Связь иммуногенных несоответствий МАГ и нсОНП с.49А>G *CTLA4* и клинических проявлений.

<i>МАГ</i>	<i>Алло-ТГСК от совместимого родственного донора, n = 28</i>			<i>Алло-ТГСК от совместимого неродственного донора, n = 17</i>		
	Рецидив (р-знач.)	oРТПХ (р-знач.)	oРТПХ II–IV ст. (р-знач.)	Рецидив (р-знач.)	oРТПХ (р-знач.)	oРТПХ II–IV ст. (р-знач.)
<i>CTLA4 с.49А>G</i>	0,46	0,77	0,72	0,89	0,16	0,17
<i>CTLA4 и HA-1</i>	0,9	0,18	0,22	0,71	0,52	0,96
<i>CTLA4 и HA-2</i>	0,78	0,53	0,57	0,21	0,18	0,31
<i>HER-2/NEU</i>	0,48	0,37	0,41	0,8	0,27	0,1
<i>HA-1</i>	0,9	0,18	0,22	0,71	0,52	0,96
<i>HA-2</i>	0,78	0,53	0,57	0,21	0,18	0,31
<i>UTA2-1</i>	0,14	0,9	0,76	0,9	0,22	0,1
<i>LB-ADIR-1F</i>	0,02*	0,18	0,22	0,47	0,47	0,58
<i>LB-CLYBL-1Y</i>	0,63	0,005*	0,0004*	0,47	0,47	0,58
<i>C19ORF48</i>	0,49	0,82	0,62	0,5	0,22	0,31
<i>TRIM22</i>	-	-	-	-	-	-
<i>LB-PRCP-1D</i>	0,3	0,82	0,96	-	-	-
<i>LB-SSR1-1S</i>	0,94	0,24	0,99	0,37	0,6	0,42
<i>LB-WNK1-1I</i>	0,44	0,37	0,41	0,18	0,18	0,31
<i>T4A1</i>	0,48	0,26	0,3	0,58	0,71	0,9
<i>HA-8</i>	0,006*	0,95	0,89	0,54	0,08	0,24
<i>LB-HIVEP1-1S</i>	-	-	-	0,52	0,11	0,22
<i>LB-NISCH-1A(V)</i>	0,47	0,32	0,41	0,9	0,9	0,56
<i>UGT2B17/A2</i>	0,57	0,37	0,41	-	-	-
<i>LB-CCL4-1T</i>	-	-	-	0,19	0,06	0,15
<i>LB-NCAPD3-1Q</i>	0,3	0,37	0,41	0,9	0,9	0,56
<i>LB-NDC80-1P(A)</i>	0,4	0,71	0,3	0,21	0,29	0,77
<i>WDR27-1L</i>	-	-	-	-	0,008*	0,008*
<i>МАГ вместе</i>	0,18	0,53	0,57	0,81	0,77	0,53

ТГСК – трансплантация гемопоэтических стволовых клеток; МАГ – минорный антиген гистосовместимости; oРТПХ – реакция трансплантат против хозяина; Снд – совместимый неродственный донор; Срд – совместимый родственный донор; * - зависимость со значением $p < 0,05$.

В заключение необходимо отметить, что на нашей выборке найдено всего несколько зависимостей, требующих дополнительных исследований. Такая картина, по нашему мнению, возможна из-за нескольких причин. Кроме подбора донора по HLA и возможности МАГ представляться в определённом аллеле HLA, должно произойти ещё несколько событий, чтобы МАГ смог повлиять на клинические проявления после алло-ТГСК. Стоит учитывать вероятность возникновения МАГ-специфичных клонов в тимусе реципиента. Кроме того, эти редкие наивные Т-клетки могут быть удалены за счёт введения АТГ. После алло-ТГСК они должны встретить МАГ в активирующем иммунном контексте. Для проявления РТПЛ ген, кодирующий МАГ, должен экспрессироваться в гемопоэтической ткани. В исследовании мы намеренно сузили когорту пациентов, чтобы избежать влияния скрытых факторов, влияющих на вероятность РТПХ или рецидива и дополнительно разделили на группы родственных и неродственных доноров, из-за различия по типу трансплантата и количеству несоответствий по

МАГ. Последнее – это неотъемлемая особенность этих групп – у родственников степень генетических различий всегда меньше. Однако, значимой роли количества несоответствий по МАГ (больше или меньше среднего по группе) в РТПХ или развитии рецидива мы не обнаружили, возможно из-за недостаточного числа пациентов в группах. Однако в некоторых работах, связанных с изучением роли МАГ в развитии РТПХ, реципиенты, получавшие АТГ или высокодозный циклофосфамид в качестве терапии РТПХ, цензурировались [Martin и др., 2016; Martin и др., 2021]. Супрессия или деплеция Т-клеток донора уменьшает количество и активность Т-клеток, необходимых для развития иммунного ответа на МАГ.

Мы полагаем, что число МАГ, пригодных для терапии рецидивов, будет становиться больше, а понимание их роли в патогенезе заболеваний улучшится.

ВЫВОДЫ

1. Разработана методика для выявления 20 полиморфизмов, кодирующих минорные антигены гистосовместимости, представляемые в контексте HLA-A*02:01, и полиморфизма с.49A>G гена *CTLA4*. Разработано программное обеспечение AScall для автоматизации анализа. Получен патент № RU 2 675 597 С1 на метод генотипирования;
2. На выборке из 444 образцов, показано что встречаемость 14 минорных антигенов гистосовместимости, представляемых в контексте HLA-A*02:01, в российской популяции статистически не отличается от европейской популяции, значимые различия получены только для LB-NISCH-1A, LB-PRCP-1D, LB-CLYBL-1Y, HA-8, UTA2-1 и LBWNK1-1I ($p < 0,05$), при этом наибольшее абсолютное различие частоты не превышало 0,07;
3. На основе проведённых расчётов выбраны оптимальные для направленной клеточной терапии минорные антигены гистосовместимости: LB-NDC80-1P/A, LB-CCL4-1T и HA-1, вероятность иммуногенного несоответствия между донором и реципиентом для этих минорных антигенов гистосовместимости составила 0,29, 0,25 и 0,24 соответственно;
4. Частота полиморфизма с.49A>G гена *CTLA4* в российской популяции статистически не отличается от европейской популяции ($p = 0,38$). Показана связь генотипа AA с.49A>G донора со снижением трёхлетней безрецидивной выживаемости (12,7% против 62,8% для других генотипов, $p < 0,01$) и увеличением трёхлетней вероятности развития рецидива (83,7% против 29,3% для других генотипов, $p < 0,05$) у пациентов с острыми лейкозами после алло-ТГСК от неродственного HLA-совместимого донора;
5. Показана связь минорных антигенов гистосовместимости HA-8 и LB-ADIR-1F с развитием рецидива ($p < 0,05$), а минорных антигенов гистосовместимости LB-CLYBL-1Y и WDR27-1L – с оРТПХ ($p < 0,05$) после алло-ТГСК от HLA-совместимого донора.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ:

1. Способ идентификации иммуногенных несоответствий ДНК в парах донор-пациент при планировании трансплантации гемопоэтических стволовых клеток / Д. Романюк, А. Постовская, А.Вдовин, Г. Ефимов, В. Савченко // Патент РФ № 2675597. 2018. Бюл. № 35.
2. Сравнительный анализ методов генотипирования минорных антигенов гистосовместимости / А. С. Вдовин, А. М. Постовская, Н. А. Быкова, Д. С. Романюк, А. Х. Алиева, П. Р. Ефимова, С. А. Шитиков, У. Л. Джулакян, Г. А. Ефимов // Онкогематология. – 2016. – Т. 11. – №2. – С. 40-50.
3. Клинически значимые минорные антигены гистосовместимости для российских пациентов, получающих трансплантацию стволовых клеток крови / Д. С. Романюк, А. А. Хмелевская, А.М. Постовская [и др.] // МедИммун. – 2019. – Т.21. – №5. – С.847-860.
4. Влияние полиморфизма гена *CTLA4* на вероятность развития рецидива у больных острыми лейкозами после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток / Д. С. Романюк, А. А. Хмелевская, М. Ю. Дроков [и др.] // Онкогематология. – 2019. – Т. 14. – №1.
5. *In silico* анализ последовательностей Т-клеточных рецепторов, специфичных к минорному антигену гистосовместимости HA-2 / С. А. Шитиков, А. А. Кучмий, Н. А. Быкова, С. Ю. Филькин, Д. С. Романюк, Г. А. Ефимов // РИЖ. – 2019; Т. 13. – №1.
6. Модификация цитотоксических лимфоцитов рецептором, специфичным к минорному антигену гистосовместимости ACC1-Y / А. М. Пилунов, А. А. Кучмий, С. А. Шитиков, С. Ю. Филькин, Д. С. Романюк, Ф. Н. Розов, Г. А. Ефимов // Молекулярная Биология. – 2019. – Т. 53.
7. Rapid Multiplex Genotyping of 20 HLA-A*02:01 Restricted Minor Histocompatibility Antigens. *Frontiers in Immunology* / D. Romaniuk, A. Postovskaya, A. Khmelevskaya [et al.] // 2019.
8. 8.AScall - Automatic Allele-Specific qPCR Analysis / K. Blagodatskikh, D. Romaniuk, D. Malko // *Front Bioeng Biotechnol*, – 2020. – Т. 22. – №8. – С. 353.
9. Минорные антигены гистосовместимости как мишени Т-клеточной иммунотерапии / А. М. Пилунов, Д. С Романюк., Г. А. Ефимов, В. Г. Савченко // Гематология и трансфузиология. – 2021. – Т. 66. – №. 3. – С. 322-345.
10. Development of T-Cell Therapy Targeting Hematopoietic Minor Histocompatibility Antigen HA-1 / A. Pilunov, D. Romaniuk [et al.] // *Blood*. – 2019. – Т. 134. – С. 5749.
11. Highly variable frequencies of donor antigen-specific naive cells may dictate the immunogenicity of minor histocompatibility antigens after hematopoietic stem cell transplantation / A. Kuchmiy, S. Sheetikov, D. Romaniuk [et al.] // *Blood*. – 2017. – Т. 130. – С. 3171.
12. P028 Immunogenicity of minor histocompatibility antigens may be dependent on the frequencies of naive precursor cells in the donor repertoire / A. Kuchmiy, S. Sheetikov, D. Romaniuk [et al.] // *Human Immunology*. – 2017. – Т. 78. – С. 73.
13. Minor antigen-specific T cell clones detected after in vitro expansion demonstrate substantial sequence homology / N. Bykova, Z. V. Konova, S. A. Shitikov, D. Romaniuk, A. Kuchmiy, G. A. Efimov // *Bone Marrow Transplantation*. – 2018. – Т. 53. – №. S1. – P. 474-475.

14. Post-transplant T-cell receptor repertoire sequencing allows detecting the immune response to minor histocompatibility antigens / A. A. Khmelevskaya, S. A. Sheetikov, **D. S. Romaniuk** [et al.]. // HLA. – 2020. – Т. 95. – №. 4. – P. 275-276.
15. Выявление мишеней иммунного ответа после трансплантации аллогенных стволовых клеток через анализ репертуара Т-лимфоцитов / А. А. Хмелевская, С. А. Шитиков, **Д. С. Романюк** [и др.] // Гематология и трансфузиология. – 2020. – Т. 65. – №. S1. – С. 234-235.
16. Discovery of a new minor histocompatibility antigen presented in HLA-B* 13:02 allele / N. Bykova, **D. Romaniuk**, G. Efimov, Z. V. Konova // Bone Marrow Transplantation. – 2018. – Т. 53. – №. S1. – P. 468-469.
17. Т-клеточный ответ на минорные антигены гистосовместимости после трансплантации аллогенных стволовых клеток / З. В. Конова, Г. А. Ефимов, Н. А. Быкова, А. А. Кучмий, **Д. С. Романюк**, [и др.] // Гематология и трансфузиология. – 2018. – Т. 63. – №. S1. – С. 24-24.
18. Генетические полиморфизмы, расположенные вне HLA локуса, влияют на исход терапии злокачественных заболеваний системы кроветворения / Ефимов Г. А., **Романюк, Д. С.** [и др.] // Опухолевые маркеры: молекулярно-генетические и клинические аспекты. – 2019. – С. 22-23.
19. Transgenic lymphocytes targeting minor histocompatibility antigens for post-transplant immunotherapy / A. Pilunov, **D. Romaniuk** [et al.] // Cytotherapy. – 2020. – Т. 22. – №. 5. – P. S124.
20. Генетические полиморфизмы, влияющие на исход трансплантации / **Д. С. Романюк** [и др.] // Гематология и трансфузиология. – 2020. – Т. 65. – №. S1. – С. 99-99.
21. Минорные антигены гистосовместимости как мишени для иммунотерапии посттрансплантационных рецидивов острых лейкозов / А. М. Пилунов, **Д. С. Романюк** [и др.] // Гематология и трансфузиология. – 2020. – Т. 65. – №. S1. – С. 95-96.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- Алло-ТГСК – трансплантация аллогенных гемопоэтических стволовых клеток
- АС-ПЦР-РВ – аллель-специфичная полимеразная цепная реакция в реальном времени
- ВИН – вероятность иммуногенного несоответствия
- ЗХВ – закон Харди-Вайнберга
- МАГ – минорный антиген гистосовместимости
- МАК – миелоаблативное кондиционирование
- ПО – программное обеспечение
- РТПЛ – реакция «трансплантат против лейкоза»
- РТПХ – реакция «трансплантат против хозяина»
- СИК – кондиционирование сниженной интенсивности
- HLA – human leucocyte antigen – человеческий лейкоцитарный антиген