

Дмитрий Патыко, «МВ».

После аллотрансплантации гемопоэтических стволовых клеток (аллоТГСК), которую из-за токсичности кондиционирования, риска развития инфекционных осложнений, органной недостаточности или тяжелой реакции «трансплантат против хозяина» проводят, как правило, только пациентам с неблагоприятным прогнозом, рецидив развивается в 30–40 % случаев. Половина рецидивов происходит в первые полгода после пересадки. Но если бы после пересадки удавалось с высокой точностью распознавать, сколько донорских клеток прижилось, а сколько сохранилось своих собственных, грозящих рецидивом, тактика лечения всегда была бы адекватной.

# Как выявить угрозу отторжения донорских клеток?

ИМЕННО ЭТО  
ОБСТОЯТЕЛЬСТВО  
ПОДТОЛКНУЛО

научного  
сотрудника лаборатории  
молекулярно-генетических  
исследований РНПЦ детской  
онкологии, гематологии  
и иммунологии Викторию

Лавриненко к разработке

актуальной темы. Задание

«Разработать и внедрить

комплексный метод определения

химеризма и установить его

клиническое значение у больных

после аллогенной трансплантации

гемопоэтических стволовых

клеток» (государственная научно-

техническая программа «Новые

технологии диагностики и лечения»,

подпрограмма «Трансплантология и

регенеративная медицина») было

выполнено

в 2015 году. Затем последовали

еще два проекта по Белорусскому

республиканскому фонду

фундаментальных исследований,

работа над которыми близка

к завершению. На Республиканском

конкурсе инновационных проектов

2017 года в номинации «Лучший

инновационный проект»

Виктория стала победителем.

Ее новое исследование называется

«Тест-система для определения

химеризма (соотношения клеток

«донор — реципиент») у пациентов

после аллогенной трансплантации

методом ПЦР в реальном времени

полиморфизмов

инсерция/делеция».

— Мониторинг химеризма в мире

применяется с начала 1980-х годов,

— поясняет Виктория Лавриненко.

— Причем методов появилось

много. Но от большинства из них

со временем пришлось отказаться,

так как одни были недостаточно

чувствительными, вторые слишком

трудоемкими, третьи требовали

использования радиоактивных

частиц. Раньше, например, пытались

определять эритроцитарный

химеризм, что технически

относительно легко выполнить,

но поскольку эритроциты живут

120 дней, то такой маркер не

годился для продолжительного

мониторинга, он слабо

коррелировал с химеризмом

лейкоцитов. А врачу как раз важно

знать, прижились ли лейкоциты.

Поэтому эритроцитарное

генотипирование применяется

сейчас только при переливании

крови.

В ТРАНСПЛАНТОЛОГИИ ДЛЯ  
МОНИТОРИНГА ХИМЕРИЗ-

МА в костном мозге и перифе-

рической крови в большинстве

лабораторий сейчас чаще исполь-

зуется пришедший из кримина-

листики метод мультиплексной

полимеразной цепной реакции

коротких tandemных повторов

(STR-ПЦР). С его помощью опреде-

ляются повторяющиеся последо-

вательности ДНК, длина которых

у каждого человека уникальна.

Эти наборы получили наиболь-

шее распространение. Правда, и

они позволяют давать только гру-

бую оценку. Криминалистов это

устраивает. Но при транспланта-

ции нужно определить не толь-

ко чьи это клетки, а сколько их,

как изменяется их соотношение,

чтобы вовремя заметить опас-

ный процесс и предсказать раз-

витие рецидива основного за-

болевания. Если врач видит, что

после трансплантации имеется

риск рецидива, он может назна-

чить либо таргетные препара-

ты, направленные на лейкозный

клон, либо провести инфузию до-

норских лимфоцитов, то есть им-

мунотерапию. Чтобы назначить

иммунотерапию, нужно обяза-

тельно знать уровень химеризма,

так как при одном уровне донор-

ских клеток ее можно проводить,

а при другом нельзя. Кроме того,

химеризм позволяет вовремя вы-

явить угрозу отторжения донор-

ских клеток, сохранить транс-

плантат и жизнь пациента.

ЗА РУБЕЖОМ БЫЛ РАЗРА-

БОТАН НОВЫЙ ПОДХОД,

предусматривающий монито-

ринг химеризма с помощью по-

лимеразной цепной реакции

в реальном времени для выяв-

ления новых маркеров — поли-

морфизмов инсерция/делеция

(InDel). Сравнительные испыта-

ния, проведенные в РНПЦ дет-

ской онкологии, гематологии и

иммунологии, показали, что чув-

ствительность этого метода зна-

чительно выше, чем STR-ПЦР:

0,01 % и 1–5 % клеток реципиен-

та соответственно. То есть даже

если среди 10 тысяч клеток все-

го лишь 1 будет принадлежать

реципиенту, ее обнаружат (а луч-

шим достижением менее чувст-

вительного метода была 1 клет-

ка из сотни). В эксперименте с

помощью метода InDel-ПЦР уда-

лось выявить 10 (62,5 %) из 16 ре-

цидивов, а при использовании

STR-ПЦР только 8 (50 %) из 16.

При этом более продвинутый ме-  
тод позволил предсказать разви-  
тие рецидива примерно на месяц  
раньше, чем это удастся с помо-  
щью STR-маркеров. Плюс исклю-  
чаются ложноположительные и  
ложноотрицательные результа-  
ты, что важно.

Виктория Лавриненко вместе  
с кандидатом биол. наук Татья-  
ной Савицкой, врачом-гематоло-  
гом Юлией Марейко и другими  
сотрудниками, которые отвеча-  
ли за клиническую часть про-  
екта, провели ту же работу, что  
чуть ранее выполнили зарубеж-  
ные коллеги. При методе InDel-  
ПЦР маркеры для оценки клеток,  
дающие хороший результат в од-  
ном этносе, могут оказаться бес-  
полезными при использовании в  
другой популяции. Поэтому под-  
бор трех десятков маркеров по-  
следовательностей ДНК, которые  
могут говорить о риске раннего  
возврата заболевания, их тести-  
рование на информативность  
именно для белорусской популя-  
ции, а также формирование на-  
боров из реактивов отечествен-  
ного производства (это в разы  
снизило стоимость исследова-  
ния) стало основным содержи-  
мом научной работы. Целью иссле-  
дования было также проследить  
процесс развития химеризма у  
пациентов с онкогематологиче-  
скими заболеваниями и изучить  
влияние его динамики на исход  
аллоТГСК (развитие рецидивов,  
бессобытийную выживаемость,  
реакцию «трансплантат против  
хозяина»), определить критерии  
для выделения группы риска раз-  
вития рецидивов.

В РНПЦ детской онкологии,  
гематологии и иммунологии мо-  
ниторинг химеризма начали ис-  
пользовать с первых дней ра-  
боты над исследовательским  
проектом, сейчас это обязатель-  
ный тест. Соотношение клеток  
донора и реципиента проверяет-  
ся на 14-й день после аллоТГСК,  
затем на 30-е сутки. Это ключе-  
вой момент, когда уже можно  
выделить пациентов с высоким  
риском развития ранних рециди-  
вов и еще есть время для назначе-  
ния иммунотерапии. Контроль-  
ные тесты проводятся на 45-е  
сутки, 60-е и так каждые 2–4 не-  
дели в течение 6 месяцев после  
аллоТГСК (затем каждые после-  
дующие полгода на протяжении  
5 лет и более).

— Когда мы проанализиро-  
вали клинические данные, то  
увидели, что безрецидивная вы-  
живаемость в группе, где про-  
водилась иммунная терапия, в 2  
раза выше, чем в группе, где па-  
циенты не получили инфузию  
донорских лимфоцитов при на-  
растающем смешанном химериз-  
ме, — поясняет Виктория Лаври-  
ненко. — То есть безрецидивная  
выживаемость пациентов с на-  
растающим смешанным химе-  
ризмом была порядка 33 %, бла-  
годаря применению иммунной  
терапии повысилась до 74 %. Сто-  
имость лечения рецидива состав-  
ляет примерно 230 тысяч рублей  
(лечение рецидива и проведение  
повторной аллоТГСК). Превен-  
тивная терапия, направленная  
на предотвращение рецидива,  
обходится в 8 тысяч рублей. Та-  
ким образом, только предотвра-  
щение рецидива у одного паци-  
ента позволяет сэкономить 222  
тысячи рублей.

Уже составлена инструкция  
по применению молекулярно-  
генетического метода  
диагностики приживления  
и отторжения трансплантата  
у пациентов после аллоТГСК,  
предназначенная  
для трансплантологов,  
гематологов, онкологов  
и иммунологов. Когда будет  
полностью укомплектован  
отечественный набор реактивов  
(запланирован совместный  
инновационный проект  
с Институтом биоорганической  
химии НАН Беларуси), новинку  
смогут использовать другие  
клиники, где проводится  
трансплантация костного мозга.  
Иные области применения —  
диагностика аутоиммунных  
заболеваний, определение  
происхождения  
Т- и В-лимфоцитов  
у пациентов с первичными  
иммунодефицитами.