

Молекулярно-генетические методы оценки потери гетерозиготности HLA после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток у детей с острыми лейкозами

И.М. Бархатов¹, Л.А. Цветкова¹, А.В. Евдокимов¹, Н.Е. Иванова¹, О.С. Епифановская¹, Ю.Г. Семенко¹, Б.И. Смирнов², А.Д. Кулагин¹, Л.С. Зубаровская¹

¹ Научно-исследовательский институт детской онкологии, гематологии и трансплантологии имени Р.М. Горбачевой ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Минздрава России; Россия, 197022, Санкт-Петербург, ул. Рентгена, 12;

² ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный электротехнический университет «ЛЭТИ» имени В.И. Ульянова (Ленина)» Министерства образования и науки Российской Федерации; Россия, 197376, Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, 5

Контактные данные: Ильдар Мунерович Бархатов i.barkhatov@gmail.com

Согласно ряду наблюдений, до трети посттрансплантационных рецидивов острых лейкозов у детей ассоциированы с потерей гетерозиготности главного комплекса гистосовместимости (HLA). При этом неэффективность реакции «трансплантат против лейкоза», проявляющаяся в отсутствии терапевтического эффекта от инфузии донорских лимфоцитов, указывает на необходимость своевременного выявления данного маркера в целях смены тактики лечения в посттрансплантационном периоде. В целях детекции потери гетерозиготности HLA довольно широко применяется метод с использованием коммерческой системы KMR-HLA, секвенирование нового поколения (NGS), а также метод на основе анализа высокополиморфных STR- и VNTR-маркеров, расположенных в районе HLA-локусов на коротком плече 6-й хромосомы. Ключевой задачей нашего исследования было сравнить информативность данных подходов в диагностике потери гетерозиготности HLA в посттрансплантационном периоде у детей. Полученные частоты выявления потери гетерозиготности HLA были сопоставимы с литературными данными и составили 23 % случаев посттрансплантационного рецидива В-линейного острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ), 33% – Т-линейного ОЛЛ и 23 % – острого миелоидного лейкоза. Также было показано, что метод, основанный на анализе STR-маркеров, обладает чувствительностью, сопоставимой с методами аллель-специфичной полимеразной цепной реакции и NGS, при этом проведение предварительного сортирования бластной популяции повышает чувствительность STR-анализа и может быть рекомендовано в рутинной практике.

Ключевые слова: потеря гетерозиготности HLA, острый лейкоз, дети, аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток

Для цитирования: Бархатов И.М., Цветкова Л.А., Евдокимов А.В., Иванова Н.Е., Епифановская О.С., Семенко Ю.Г., Смирнов Б.И., Кулагин А.Д., Зубаровская Л.С. Молекулярно-генетические методы оценки потери гетерозиготности HLA после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток у детей с острыми лейкозами. Российский журнал детской гематологии и онкологии. 2023;10(4):25–33.

Информация об авторах

И.М. Бархатов: к.м.н., ведущий научный сотрудник отдела клинической онкологии НИИ ДОГиТ им. Р.М. Горбачевой, e-mail: i.barkhatov@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0002-8000-3652>

Л.А. Цветкова: врач-гематолог отделения трансплантации костного мозга для детей № 1 НИИ ДОГиТ им. Р.М. Горбачевой, e-mail: tsetluibov@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0003-4952-0704>

А.В. Евдокимов: врач клинко-лабораторной диагностики НИИ ДОГиТ им. Р.М. Горбачевой, e-mail: leshechka10.09.84@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0003-3809-421X>

Н.Е. Иванова: заведующая лабораторией тканевого типирования НИИ ДОГиТ им. Р.М. Горбачевой, e-mail: nivanova_78@bk.ru; <https://orcid.org/0009-0006-5455-860X>

О.С. Епифановская: биолог лаборатории трансплантационной иммунологии НИИ ДОГиТ им. Р.М. Горбачевой, e-mail: epif-olga@rambler.ru; <https://orcid.org/0000-0002-8168-6811>

Ю.Г. Семенко: биолог лаборатории трансплантологии и молекулярной гематологии НИИ ДОГиТ им. Р.М. Горбачевой, e-mail: fedya-julya@yandex.ru; <https://orcid.org/0009-0001-3436-5249>

Б.И. Смирнов: к.т.н., доцент кафедры радиотехнических систем СПбГЭТУ «ЛЭТИ» им. В.И. Ульянова, e-mail: mdandmcondapl@mail.ru

А.Д. Кулагин: д.м.н., директор НИИ ДОГиТ им. Р.М. Горбачевой, заведующий кафедрой гематологии, трансфузиологии и трансплантологии им. проф. Б.В. Афанасьева ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова, e-mail: kulagingem@rambler.ru; <https://orcid.org/0000-0002-9589-4136>

Л.С. Зубаровская: д.м.н., заместитель директора по трансплантации, руководитель отдела детской онкологии, гематологии и трансплантологии НИИ ДОГиТ им. Р.М. Горбачевой, профессор кафедры гематологии, трансфузиологии и трансплантологии им. проф. Б.В. Афанасьева ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова, e-mail: zubarovskaya_ls@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0003-2594-7703>, SPIN-код: 1853-2906

Вклад авторов

И.М. Бархатов, Л.А. Цветкова, А.В. Евдокимов, Н.Е. Иванова, О.С. Епифановская, Ю.Г. Семенко: разработка дизайна статьи, сбор данных, анализ научного материала, анализ полученных данных, обзор публикаций по теме статьи, подготовка списка литературы, написание текста рукописи, составление резюме

Б.И. Смирнов: анализ полученных данных

А.Д. Кулагин, Л.С. Зубаровская: научное редактирование статьи

Molecular biology techniques for assessing the loss of HLA heterozygosity after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in children with acute leukemia

I.M. Barkhatov¹, L.A. Tsvetkova¹, A.V. Evdokimov¹, N.E. Ivanova¹, O.S. Epifanovskaya¹, Yu.G. Semenko¹, B.I. Smirnov², A.D. Kulagin¹, L.S. Zubarovskaya¹

¹Raisa Gorbacheva Memorial Research Institute of Children Oncology, Hematology and Transplantation, First Pavlov State Medical University of St. Petersburg, Ministry of Health of Russia; 12 Rentgena St., Saint Petersburg, 197022, Russia;

²Saint Petersburg Electrotechnical University "LETI", Ministry for Education and Science of the Russian Federation; 5 Professor Popov St., Saint Petersburg, 197376, Russia

According to several observations, up to a third of post-transplant relapses in childhood acute leukemia are associated with the loss of heterozygosity of the major histocompatibility complex (HLA). Furthermore, the inefficacy of the graft-versus-leukemia reaction, as evidenced by the lack of therapeutic effect from the infusion of donor lymphocytes, indicates the need for timely detection of this marker to change the treatment strategy in the post-transplant period. To detect the loss of HLA heterozygosity, the method using the commercial KMR-HLA system and analysis using next-generation sequencing (NGS), as well as the method based on the analysis of highly polymorphic STR and VNTR markers located in the HLA loci region on the short arm of chromosome 6, are widely used. The primary objective of our study was to compare the informativeness of these approaches in diagnosing HLA heterozygosity loss in children during the post-transplant period. The obtained data on the frequency of detecting HLA heterozygosity loss were comparable to the literature data and constituted 23 % of cases of post-transplant relapse of B-cell acute lymphoblastic leukemia, 33 % of cases of T-cell acute lymphoblastic leukemia, and 23% of cases of acute myeloid leukemia. We also demonstrated that the method based on STR marker analysis has sensitivity comparable to allele-specific PCR and NGS sequencing methods. Meanwhile, preliminary sorting of the blast population increases the sensitivity of STR analysis and can be recommended in routine practice.

Key words: loss of HLA heterozygosity, acute leukemia, children, allogeneic hematopoietic stem cell transplantation

For citation: Barkhatov I.M., Tsvetkova L.A., Evdokimov A.V., Ivanova N.E., Epifanovskaya O.S., Semenko Yu.G., Smirnov B.I., Kulagin A.D., Zubarovskaya L.S. Molecular biology techniques for assessing the loss of HLA heterozygosity after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in children with acute leukemia. Russian Journal of Pediatric Hematology and Oncology. 2023;10(4):25–33.

Information about the authors

I.M. Barkhatov: Cand. Of. Sci. (Med.), Leading Researcher Department of Clinical Oncology Raisa Gorbacheva Memorial Research Institute of Children Oncology, Hematology and Transplantation at First Pavlov State Medical University of St. Petersburg, Ministry of Health of Russia, e-mail: i.barkhatov@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0002-8000-3652>

L.A. Tsvetkova: Hematologist Department of Bone Marrow Transplantation for Children No. 1 Raisa Gorbacheva Memorial Research Institute of Children Oncology, Hematology and Transplantation at First Pavlov State Medical University of St. Petersburg, Ministry of Health of Russia, e-mail: tsvetluibov@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0003-4952-0704>

A.V. Evdokimov: Doctor of Clinical and Laboratory Diagnostics Raisa Gorbacheva Memorial Research Institute of Children Oncology, Hematology and Transplantation at First Pavlov State Medical University of St. Petersburg, Ministry of Health of Russia, e-mail: leshechka.10.09.84@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0003-3809-421X>

N.E. Ivanova: Head of the Laboratory of HLA-Typing Raisa Gorbacheva Memorial Research Institute of Children Oncology, Hematology and Transplantation at First Pavlov State Medical University of St. Petersburg, Ministry of Health of Russia, e-mail: nivanova_78@bk.ru; <https://orcid.org/0009-0006-5455-860X>

O.S. Epifanovskaya: Biologist of the Laboratory of Transplantation Immunology Raisa Gorbacheva Memorial Research Institute of Children Oncology, Hematology and Transplantation at First Pavlov State Medical University of St. Petersburg, Ministry of Health of Russia, e-mail: epif-olga@rambler.ru; <https://orcid.org/0000-0002-8168-6811>

Yu.G. Semenko: Biologist of the Laboratory of Transplantation and Molecular Hematology Raisa Gorbacheva Memorial Research Institute of Children Oncology, Hematology and Transplantation at First Pavlov State Medical University of St. Petersburg, Ministry of Health of Russia, e-mail: fedya-julya@yandex.ru; <https://orcid.org/0009-0001-3436-5249>

B.I. Smirnov: Cand. of Sci. (Tech.), Associate Professor Department of Radio Engineering Systems at Saint Petersburg Electrotechnical University "LETI", Ministry for Education and Science of the Russian Federation, e-mail: mdandmcandapl@mail.ru

A.D. Kulagin: Dr. of Sci. (Med.), Director of Raisa Gorbacheva Memorial Research Institute of Children Oncology, Hematology and Transplantation, Head for Hematology, Transfusiology and Transplantation Chair named after Professor B.V. Afanasyev at First Pavlov State Medical University of St. Petersburg, Ministry of Health of Russia, e-mail: kulagingem@rambler.ru; <https://orcid.org/0000-0002-9589-4136>

L.S. Zubarovskaya: Dr. of Sci. (Med.), Deputy Director for Transplantation, Head of the Department of Pediatric Oncology, Hematology and Transplantation at Raisa Gorbacheva Memorial Research Institute of Children Oncology, Hematology and Transplantation, Professor for Hematology, Transfusiology and Transplantation Chair named after Professor B.V. Afanasyev at First Pavlov State Medical University of St. Petersburg, Ministry of Health of Russia, e-mail: zubarovskaya_ls@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0003-2594-7703>, SPIN-code: 1853-2906

Authors' contributions

I.M. Barkhatov, L.A. Tsvetkova, A.V. Evdokimov, N.E. Ivanova, O.S. Epifanovskaya, Yu.G. Semenko: article design development, data collection, analysis of scientific material, analysis of data obtained, review of publications on the topic of the article, preparation of a list of references, writing the text of the article, composing a resume

B.I. Smirnov: analysis of the received data

A.D. Kulagin, L.S. Zubarovskaya: scientific edition of the article

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. / **Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда № 22-15-00491

(<https://rscf.ru/project/22-15-00491/>). / **Funding.** The study was supported by the Russian Science Foundation grant No. 22-15-00491

(<https://rscf.ru/project/22-15-00491/>).

Введение

Потеря гетерозиготности главного комплекса гистосовместимости (HLA LOH) является одним из механизмов ускользания опухолевых клеток от иммунного надзора и опосредует прогрессию опухоли [1, 2]. Так, на фоне выявленной потери гетерозиготности HLA опухолевыми клетками наблюдается как увеличение опухолевой массы, так и раннее появление метастазов [3, 4] на фоне высокой мутационной нагрузки и формирования неоантигенов [3, 5], что указывает на возможность применения ингибиторов контрольных точек [6]. При гематологических заболеваниях потеря гетерозиготности HLA встречается несколько реже (11 %) [7, 8]. Вместе с тем при аллогенной трансплантации частота HLA LOH значительно выше (около 30 %) и, по результатам ряда исследований, ассоциирована с развитием посттрансплантационных рецидивов [8–12].

В целях идентификации потери гетерозиготности HLA широко используется коммерческий набор HLA-KMR, разработанный компанией GenDx [11, 13]. Однако панель полимеразной цепной реакции (ПЦР) в HLA-KMR специфична только для 3 локусов HLA (HLA-A, HLA-C и HLA-DPB1) и не отражает особенности распространения полиморфных вариантов HLA в различных популяциях. В связи с тем, что используемые в системе праймеры не являются аллель-специфичными, невозможно идентифицировать популяции опухолевых клеток с потерей гетерозиготности до развития рецидива, что не позволяет использовать этот метод для оценки риска развития рецидива заболевания.

В последние годы на первый план выходит метод секвенирования нового поколения (NGS) [13], который позволяет одновременно анализировать большее число пациентов. При этом используются как наборы реагентов, применяемые для типирования пары донор–реципиент, так и разрабатываются кастомные (пользовательские) решения для NGS, нацеленные на выявление потери гетерозиготности в генах HLA 1-го класса, а также методы, основанные на технологии РНК-секвенирования [14, 15]. При этом наиболее значимым параметром является количество прочтений одного и того же участка ДНК. Так, при оценке потери гетерозиготности в посттрансплантационном периоде целесообразно анализировать сиквенсы на основе 5000–10 000 прочтений [16].

Также в некоторых лабораториях применяются методы, используемые для рутинного типирования пациентов и доноров при выборе потенциального донора: технологии SSP (Sequence-Specific Primer), SSO (Sequence-Specific Oligonucleotide) и SBT (Sequence-Based Typing) [17].

Анализ коротких tandemных повторов (STR) на коротком плече 6-й хромосомы, используемый для оценки донорского химеризма и потери гетерозиготности HLA, продемонстрировал свою значимость в предыдущих исследованиях [8, 18]. Однако на текущий момент остается открытым вопрос его информа-

тивности по сравнению с другими методами, в частности NGS и анализом потери гетерозиготности HLA с использованием набора HLA-KMR.

Целью данного исследования стал анализ методов оценки потери гетерозиготности HLA у детей с рецидивом острого лейкоза после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК).

Материалы и методы

В исследование были включены 89 проб ДНК, полученных от 86 пациентов детского возраста с костномозговым рецидивом острого лейкоза после алло-ТГСК. С диагнозом острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ) наблюдались 60 (69 %) пациентов: 48 с В-линейным ОЛЛ (В-ОЛЛ), 12 пациентов с Т-линейным ОЛЛ (Т-ОЛЛ). Острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) диагностирован у 26 (30 %) больных. Медиана уровня бластов по данным миелограммы и иммунофенотипирования на момент включения в анализ в общей группе составила 61 % (0,06–100 %). Медиана уровня донорского химеризма – 30–40 %.

Геномная ДНК из посттрансплантационных образцов пациентов была выделена с помощью набора Blood DNA Column Kit (Иноген, Россия) согласно инструкции производителя. Оценка концентрации ДНК проводилась с использованием спектрофотометра Nanodrop Onekj. У 11 (12 %) пациентов ДНК была выделена из бластной популяции после предварительной сортировки.

Изоляция бластной популяции выполнялась с использованием набора антител к кластерам дифференцировки CD45, CD34, CD19, CD3, CD33, CD19, CD20, CD38, CD10. Использование того или иного набора антител определялось в зависимости от aberrантного иммунофенотипа бластной популяции в дебюте заболевания. Селекция клеток проводилась на клеточном сортере FACS Aria (Becton Dickinson, США) из популяции клеток костного мозга пациентов после алло-ТГСК.

Оценка потери гетерозиготности HLA проводилась с помощью набора праймеров к ряду STR-локусов, расположенных на коротком плече 6-й хромосомы: D6S265, D6S473, D6S277, D6S105, D6S273, D6S291, D6S2674, D6S2675, D6S2664, D6S2876, D6S2661 и D6S2444. Амплификация STR-локусов проводилась с использованием синтетических олигонуклеотидов, меченых на 5' конце флуоресцентными метками FAM, R6G или ROX (табл. 1). Для постановки ПЦР использовали 2,5-кратную реакционную смесь (Синтол, Россия). Программа амплификации: 1-й цикл – денатурация 95 °C, 10 мин; 35 циклов (95 °C – 30 с, 64 °C – 60 с, 72 °C – 60 с); 1-й цикл – финальная элонгация 72 °C – 5 мин. Далее продукты амплификации смешивались с раствором формамида и размерным стандартом LIZ600 (Applied Biosystems, США) с последующим анализом фрагментов в генетическом анализаторе ABIPRISM 3130 (Applied Biosystems, США).

Идентификация потери гетерозиготности HLA заключалась в сопоставлении пиков, соответству-

Таблица 1. Последовательности синтетических олигонуклеотидов, используемых для определения аллельного полиморфизма ряда STR-локусов, расположенных на 6-й хромосоме

Table 1. Sequences of synthetic oligonucleotides used to determine allelic polymorphism of a number of STR loci based on chromosome 6

Праймер Primer	Краситель Dye	Последовательности синтетических олигонуклеотидов 5'-3' Sequences of synthetic oligonucleotides 5'-3'	Размер продукта, п.о. Product size	Концентрация на реакцию, пкмоль Concentration per reaction, pmol
D6S265	FAM	ACGTTTCGTACCCATTAACCTACC ATCGAGGTAAACAGCAGAAAGA	118–140	1,0
D6S473	FAM	TGGTATTTCTGCGCAGTGCT CACAGCCACCTTGAGGAGTT	164–194	1,2
D6S277	FAM	TGGAAAAGGAGCAGCAGGAG AAGGGTGTTCCCTGCTTCAC	419–443	0,8
D6S105	R6G	CGCTTGGCCCTATAAAATCCTAAT TCACATCCTTTGACTGTCTTTGTG	145–167	1,2
D6S273	R6G	CCCACTTCCCCACCTCCTTA TCTGCAACTTTTCTGTCAATCCA	216–236	0,7
D6S291	R6G	CTGTCTACACTCGGCCCATC GGGGATGACGAATTATTTACTAACT	324–336	0,7
D6S2674	ROX	TCCAGGCAAAAGTCAAGCATATC TGAACTTGGGCAATGAGTCTCT	120–180	4,0
D6S2675	ROX	GCGAGATGATGAGACCCAGG CATGACCATGCTTGTGCTGG	350–370	1,5
D6S2664	FAM	CTGGGCAACATGGTGAAATCC TCACTCCAGTCAATCTGGGC	540–580	0,9
D6S2876	ROX	TGGCCTGCCATCATGACTTC CTTAACCTGCCAGAGGGAGC	260–320	0,8
D6S2661	R6G	AAACAGAGCATCCAAGAGCTGC AGAGGCTAAGACGGGAGGAC	185–210	0,7
D6S2444	ROX	TGAATGTGCTAAGAACTTTTCTGC CATGCAGCCTGATTATACTGTTT	415–440	4,0

ющих различным аллельным вариантам высокополиморфных маркеров (рис. 1). В целях выявления информативных маркеров проводилось сравнение STR полиморфизма в пробах донора и реципиента. Далее проводился сравнительный анализ выявленных маркеров у реципиента до и после ТГСК.

Помимо этого у пациентов проводился анализ потери гаплотипа HLA с использованием коммерческих наборов компании GenDx (Нидерланды). При использовании набора выполняется нормализация значений амплификации HLA-аллелей пациента на результаты анализа донорского химеризма, входящего в набор. В целях идентификации HLA-локусов про-

водился анализ информативных маркеров с последующей количественной оценкой порогового уровня флуоресценции исследуемого маркера и маркера, определяющего уровень химеризма реципиента.

Исследование HLA LOH также проводилось с использованием коммерческой системы HLA-KMR (GenDX). Потеря гетерозиготности анализировалась по идентифицированному при предварительном типировании информативному аллелю, характеризующему исключительно клетки реципиента. Далее проводилось типирование на наборе реагентов KMRtype в целях выявления информативного маркера для последующего определения посттрансплантационно-

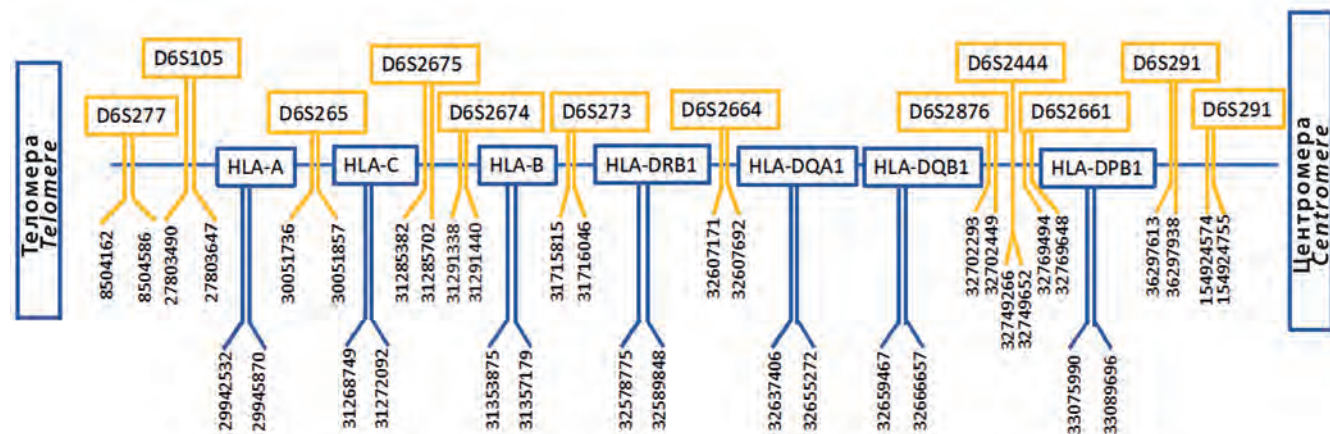


Рис. 1. Схематическое распределение локусов STR, располагающихся на коротком плече 6-й хромосомы

Fig. 1. Schematic distribution of STR loci located on the short arm of chromosome 6

го химеризма и HLA-KMR assay для подтверждения информативности наборов GenDx для оценки аллельной нагрузки HLA в локусах A, C и DPB1. При этом маркер рассматривался как информативный в случае, если пороговый цикл (Ct) у реципиента был ниже 30, а у донора – выше 38. Далее проводился анализ количественных значений аллельной нагрузки информативных локусов HLA с нормализацией значений на уровень посттрансплантационного химеризма, определяемого с использованием набора KMRtype. ПЦР по каждому маркеру выполнялась в 3 повторах для пробы пациента до и после ТГСК. По каждому маркеру в анализ был включен отрицательный контроль.

Анализ потери гетерозиготности методом NGS выполнялся с использованием набора для обогащения целевых последовательностей HLA N5 NGS (Protrans, Германия), позволяющего проводить анализ локусов HLA-A, B, C, DRB1, DQB1, DRB3, DRB4, DRB5, DPB1, DQA1. Секвенирование выполнялось с использованием наборов MiSeq Reagent Nano Kit v2 (Illumina, США). Биоинформатический анализ проводился в программе SeqPilot 5.2.0. Контроль качества и дедупликация выполнены при помощи fastp [10.1093/bioinformatics/bty560]. Генотипирование осуществлялось инструментом OptiType [10.1093/bioinformatics/btu548].

Оценка посттрансплантационного химеризма осуществлялась с использованием STR-маркеров и набо-

ра реагентов Chimerix FA Kit (Иноген, Россия) согласно рекомендациям производителя. Набор включает 16 высокополиморфных маркеров (CSF1PO, FGA, TPOX, TH01, VWA, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539, D18S51, D21S11, Penta D, Penta E, Amelogenin), расположенных на соматических хромосомах, и позволяет идентифицировать по меньшей мере один информативный маркер даже при близкородственной трансплантации. Чувствительность определения посттрансплантационного химеризма с использованием набора составляет от 1 до 5 %.

Результаты

Определение потери гетерозиготности HLA с использованием STR-маркеров

При использовании набора STR-маркеров, расположенных на коротком плече 6-й хромосомы, нам удалось выявить информативные маркеры во всех пробах реципиента после алло-ТГСК (рис. 2).

При оценке потери гетерозиготности HLA в общей группе пациентов мы выявили потерю гетерозиготности HLA в 21 (24 %) из 89 проб ДНК, взятых у пациентов с подтвержденным костномозговым рецидивом. При этом потеря гетерозиготности HLA отмечалась в 23 % случаев В-ОЛЛ (11 из 48), 33 % Т-ОЛЛ (4 из 12), 23 % ОМЛ (6 из 26). По нашим наблюдениям, чаще встречалась делеция HLA 1-го класса (12/21, 57 %), в то время как одномоментная делеция локусов HLA 1-го и 2-го классов встречалась у 6 (29 %) из 21

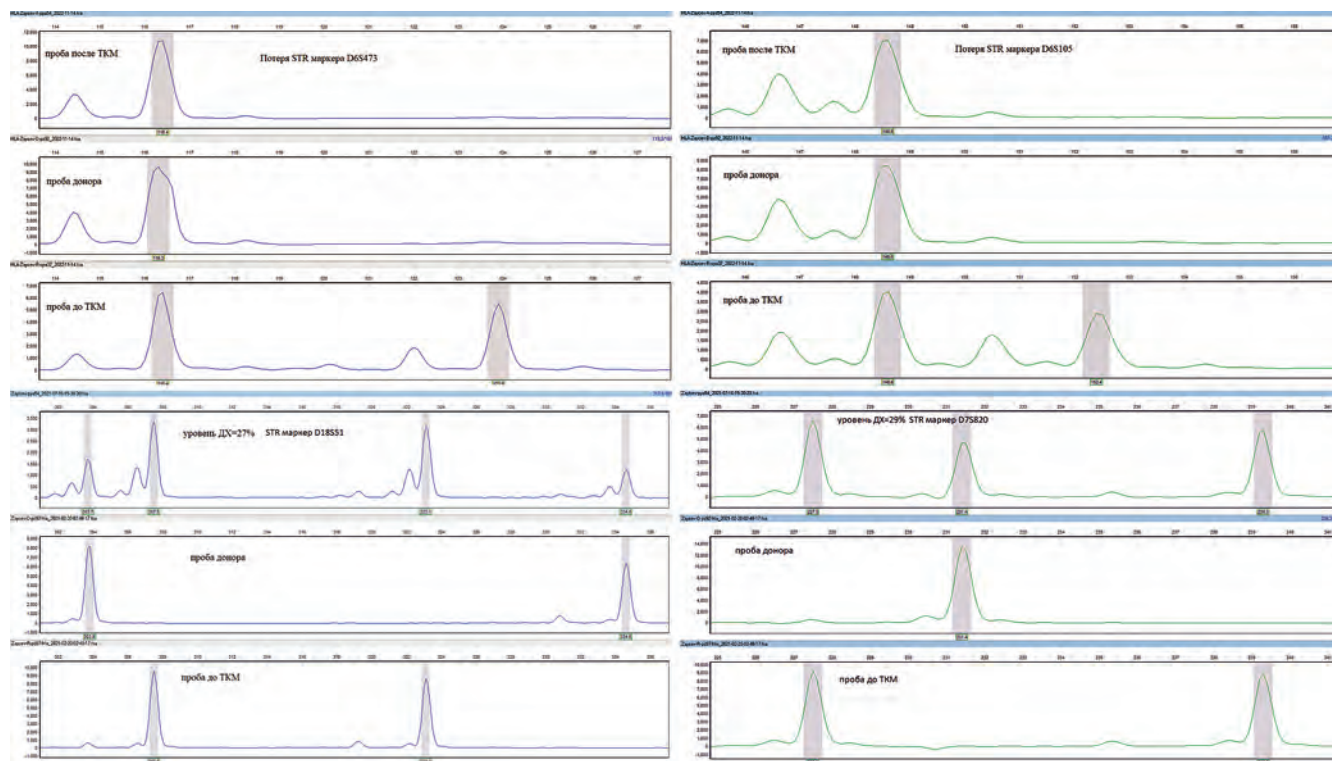


Рис. 2. Пример оценки делеции STR-локусов (D6S473 и D6S105), расположенных на коротком плече 6-й хромосомы. На фоне уровня донорского химеризма (27 % по маркеру D18S51 и 29 % по маркеру D7S820) у реципиента после алло-ТГСК отмечается полное отсутствие аллельного варианта локусов D6S473 и D6S105, что косвенно указывает на потерю гетерозиготности HLA в посттрансплантационном периоде

Fig. 2. An example of assessing the deletion of STR loci (D6S473 and D6S105) located on the short arm of chromosome 6. Against the background of the level of donor chimerism (27 % for the D18S51 marker and 29 % for the D7S820 marker), the recipient after allo-HSCT has a complete absence of the allelic variant of the D6S473 and D6S105 loci, which indirectly indicates a loss of HLA heterozygosity in the post-transplantation period

больного с выявленной делецией локусов HLA 1-го класса.

При сопоставлении данных уровня посттрансплантационного химеризма и идентификации HLA LOH были получены данные, указывающие на то, что чаще делеция STR-локусов короткого плеча 6-й хромосомы идентифицировалась при уровне донорского химеризма от 10 до 30 % (рис. 3). Медиана уровня бластов по данным миелограммы значимо не отличалась в группах пациентов с HLA LOH и неHLA LOH – 78 % (18–95 %) и 60 % (0–100 %) соответственно, $p = 0,09$.

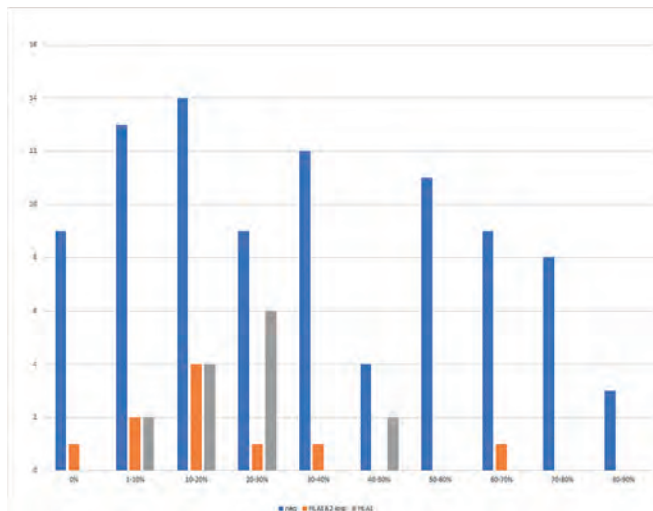


Рис. 3. Частота встречаемости делеции STR-локусов на коротком плече 6-й хромосомы в зависимости от уровня посттрансплантационного химеризма

Fig. 3. Frequency of occurrence of STR loci deletion on the short arm of chromosome 6 depending on the level of post-transplant chimerism

Был проведен сравнительный анализ выявления потери гетерозиготности HLA методом STR как с предварительным сортированием бластной популяции клеток, так и без таковой. Медиана уровня бластов при проведении сортировки бластной популяции составила 25 % (0–94 %) по сравнению с медианой уровня бластов при проведении метода STR без предварительной сортировки клеток – 65 % (0–100 %), $p = 0,1$.

При проведении анализа STR без предварительной сортировки бластной популяции мы выявили потерю гаплотипа в 17 (22 %) из 78 проб, в то время как предварительный сортинг бластной популяции позволил повысить этот показатель до 36 % (у 4 пациентов из 11 обследованных была детектирована потеря гетерозиготности), $p = 0,28$.

Определение потери гетерозиготности HLA с использованием коммерческой системы HLA-KMR

С помощью коммерческой системы HLA-KMR (GenDX, Нидерланды) анализ потери гаплотипа HLA был проведен у 7 пациентов, включенных в исследование.

При сравнении результатов мы не обнаружили существенных различий в выявлении потери гетерозиготности HLA в посттрансплантационном периоде как при использовании подхода, основанного на анализе STR-локусов, так и на основе коммерческой тест-системы с использованием локус-специфичных праймеров. При этом методом HLA-KMR была возможна более ранняя детекция потери HLA-гаплотипа в пробах с полным донорским химеризмом (табл. 2).

Таблица 2. Сравнительный анализ выявления потери гетерозиготности HLA методом STR и системой GenDx

Table 2. Comparative analysis of detection of loss of HLA heterozygosity using the STR method and the GenDx system

Пациент Patient	Время после алло-ТГСК, мес Time after allo-HSCT, months	STR-анализ STR analysis	GenDx-анализ GenDx analysis	Информативный HLA-маркер GenDx Informative HLA marker GenDx	Уровень донорского химеризма Level of donor chimerism
1	16,0	HLA I потеря HLA I loss	HLA I потеря HLA I loss	A*01:01	50–60 %
1	13,2	—	HLA I потеря HLA I loss	A*01:01	97 %
2	14,9	HLA I и II потеря HLA I and II loss	HLA II потеря HLA II loss	KMR520-DPB1	20–30 %
2	9,6	—	HLA II потеря HLA II loss	KMR520-DPB1	97 %
3	21,2	HLA I и II потеря HLA I and II loss	HLA II потеря HLA II loss	KMR520-DPB1	1–10 %
3	14,5	—	HLA II потеря HLA II loss	KMR520-DPB1	97 %
4	9,3	HLA I и II потеря HLA I and II loss	HLA I и II потеря HLA I and II loss	C* 03:04, DPB1* 04:01	10–20 %
4	7,2	—	Точно нельзя определить Cannot be determined exactly	C* 03:04, DPB1* 04:01	97 %
5	8,2	HLA I потеря HLA I loss	HLA I потеря HLA I loss	A*02	40–50 %
5	6,1	—	HLA I потеря HLA I loss	A*02	97 %
6	17,2	Нет потери No loss	Нет потери No loss	A*01:01, DPB1*01:01	97 %
7	28,5	Нет потери No loss	Нет потери No loss	A*02:01	50–60 %

Анализ потери гетерозиготности HLA методом NGS

Анализ потери гетерозиготности HLA методом NGS был выполнен 3 пациентам с предварительно подтвержденной потерей гетерозиготности HLA методом STR.

В результате генотипирования были получены графики (рис. 4), отражающие количество прочтений (ридов) последовательностей гетерозиготных гомологичных аллелей (ось абсцисс отражает нуклеотидную последовательность соответствующего аллеля). В графиках сохраняются вторично выровненные риды, которые могут одинаково хорошо выравниваться на последовательности разных аллелей или на разные участки одной и той же последовательности. Затем были рассчитаны покрытия аллелей ридами, которые выравниваются однозначно на тот или иной аллель. Результаты полуколичественного анализа идентифицируемых аллелей HLA в анализируемых

пробах 3 пациентов в посттрансплантационном периоде приведены в табл. 3.

Спектр молекулярно-генетических изменений у пациентов с потерей HLA

Был проведен анализ наличия закономерностей выявления потери гетерозиготности HLA на фоне различных молекулярно-генетических aberrаций в опухолевых клетках пациентов. Не было выявлено различий молекулярно-генетических изменений в пробах с потерей гетерозиготности HLA и без потери гетерозиготности HLA как при ОЛЛ (рис. 5), так и при ОМЛ (рис. 6), $p > 0,05$. Также проанализирована динамика цитогенетических изменений как явление клональной эволюции опухоли при развитии посттрансплантационного рецидива с потерей гетерозиготности HLA и без потери гетерозиготности HLA.

В случае рецидивов с потерей гетерозиготности HLA в 7 (33 %) из 21 пробы отмечалось формирование новых цитогенетических изменений, при отсут-

Таблица 3. Оценка потери гетерозиготности HLA методом NGS на примере проб 3 пациентов

Table 3. Assessment of loss of HLA heterozygosity using NGS with the samples of 3 patients

Проба Test	Аллель, принадлежащий только реципиенту (покрытие) Allele belonging only to the recipient (coverage)	Аллель, принадлежащий реципиенту и донору (покрытие) Allele shared by recipient and donor (coverage)	Аллель, принадлежащий только донору (покрытие) Allele belonging only to the donor (coverage)
M18	HLA-A*24:02:01:01 (1) HLA-B*44:03 (0)	HLA-A*02:01:01:01 (99) HLA-B*18:01:01:01 (88)	HLA-A*68:01:01:01 (11) HLA-B*35:03:01 (8)
M30	HLA-C*06:02:01:01 (1) HLA-A*01:01:01:01 (1)	HLA-C*02:02:02 (63) HLA-A*02:01:01:01 (97)	HLA-C*03:04:01:01 (0) HLA-A*33:01:01 (42)
M52	HLA-B*49:01 (0) HLA-C*06:02 (0)	HLA-B*07:02:01 (71) HLA-C*07:02:01:01 (23)	HLA-B*14:02:01 (48) HLA-C*08:02:01 (10)

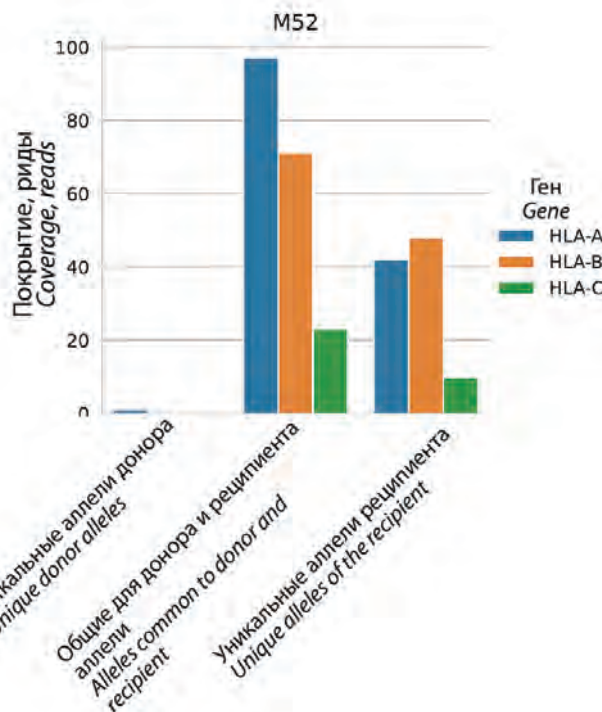
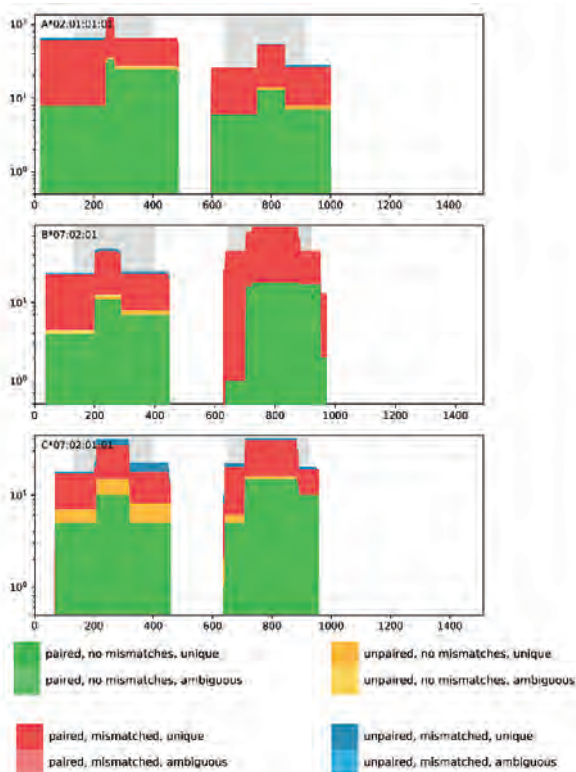


Рис. 4. Пример полуколичественной оценки аллелей HLA донорского и реципиентного происхождения при проведении NGS

Fig. 4. Example of semi-quantitative assessment of HLA alleles of donor and recipient origin during NGS

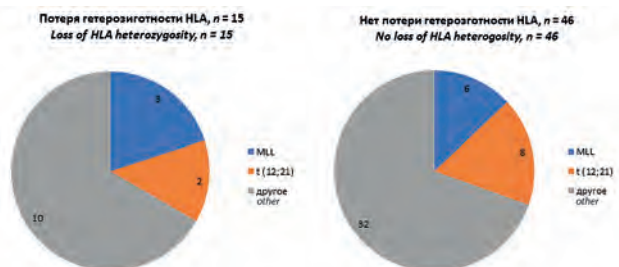


Рис. 5. Спектр молекулярно-генетических изменений при ОЛЛ

Fig. 5. Spectrum of molecular genetic changes in acute lymphoblastic leukemia

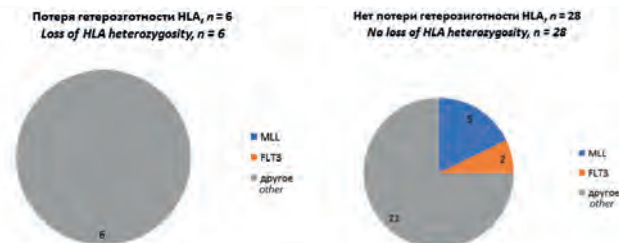


Рис. 6. Спектр молекулярно-генетических изменений при ОМЛ

Fig. 6. Spectrum of molecular genetic changes in acute myeloid leukemia

ствии потери гетерозиготности HLA в 20 (34 %) из 58 проанализированных проб также были выявлены признаки клональной эволюции опухоли. Таким образом, генетическая потеря HLA-гаплотипа является независимой характеристикой опухоли, требующей проведения отдельных диагностических тестов.

Обсуждение

Выявление потери гетерозиготности HLA в посттрансплантационном периоде является одним из факторов, определяющих стратегию ведения пациента с развитием посттрансплантационного рецидива. Так, согласно ряду наблюдений, инфузия донорских лимфоцитов не является эффективным методом лечения рецидивов с потерей гетерозиготности HLA в связи с ускользанием опухолевых клеток от системы иммунного надзора со стороны иммунокомпетентных клеток донорского происхождения [11, 13]. Таким образом формируется селектированный пул неуязвимых клеток, постепенно формирующий популяцию клеток, обуславливающую развитие рецидива заболевания. Наибольшее распространение подобные наблюдения получили при гаплоидентичной ТГСК, когда у исследователей появляется возможность использовать несоответствие по гаплотипу в качестве маркера делеции.

Среди методов оценки потери гетерозиготности можно выделить метод, основанный на анализе коротких tandemных повторов, расположенных на коротком плече 6-й хромосомы. Этот метод прост

в выполнении, однако обладает сравнительно низкой чувствительностью — с минимальным порогом от 1 до 5 %. Одним из подходов, связанных с повышением чувствительности, является предварительная селекция бластной популяции. Так, по нашим данным, применение метода иммунофлуоресцентного сортирования двукратно повысило выявление потери гетерозиготности с помощью STR-анализа при меньшем уровне бластов по данным миелограммы и иммунофенотипирования на момент анализа. С другой стороны, предполагая различия в клиническом значении потери гетерозиготности того или иного гаплотипа HLA, идентификация последнего с использованием STR-анализа представляется невозможной.

Согласно литературным данным, наиболее широко применяется метод локус-специфичной ПЦР в целях идентификации потери гетерозиготности HLA на основе коммерческой тест-системы KMR. Данная методика позволяет обнаруживать потерю HLA при низких значениях реципиентного химеризма, а значит, делает возможным более раннее обнаружение HLA LOH. Мы наблюдали согласованные результаты между HLA-KMR и STR во всех анализированных случаях. Существенным недостатком данной методики является ограниченный набор информативных HLA-маркеров, включающий 10 геномных маркеров. Вместе с тем идентификация потери гетерозиготности HLA при невысоких значениях уровня реципиентного химеризма зачастую проблематична в связи с низкими показателями специфичности и чувствительности коммерческой тест-системы.

На этом фоне метод NGS является наиболее перспективным, позволяющим провести идентификацию утраченного локуса с возможностью полуколичественного анализа. При этом возможны модификации метода, позволяющие повысить его чувствительность за счет увеличения количества прочтений.

Заключение

Согласно полученным данным, анализ STR-полиморфизма в целях идентификации потери гетерозиготности является информативным и доступным методом для реализации в большинстве специализированных лабораторий. При этом сравнительно невысокая чувствительность исследования может быть преодолена путем предварительного сортирования опухолевого клона за счет aberrантной экспрессии поверхностных маркеров. Вместе с тем при необходимости повышения разрешающей способности теста и идентификации делецированного локуса более целесообразным является использование метода NGS.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Zheng H.T., Peng Z.H., Li S., He L. Loss of heterozygosity analyzed by single nucleotide polymorphism array in cancer. *World J Gastroenterol.* 2005;11(43):6740–4. doi: 10.3748/wjg.v11.i43.6740.
- Martínez-Jiménez F., Priestley P., Shale C., Baber J., Rozemuller E., Cuppen E. Genetic immune escape landscape in primary and metastatic cancer. *Nat Genet.* 2023;55:820–31. doi: 10.1038/s41588-023-01367-1.
- Brastianos P.K., Carter S.L., Santagata S., Cahill D.P., Taylor-Weiner A., Jones R.T., Van Allen E.M., Lawrence M.S., Horowitz P.M., Cibulskis K. Genomic characterization of brain metastases reveals branched evolution and potential therapeutic targets. *Cancer Discov.* 2015;5:1164–77. doi: 10.1158/2159-8290.
- McGranahan N., Rosenthal R., Hiley C.T., Rowan A.J., Watkins T.B.K., Wilson G.A., Birkbak N.J., Veeriah S., Van Loo P., Herrero J., Swanton C.; TRACERx Consortium. Allele-Specific HLA Loss and Immune Escape in Lung Cancer Evolution. *Cell.* 2017;171(6):1259–71. doi: 10.1016/j.cell.2017.10.001.
- Rosenthal R., Cadieux E.L., Salgado R., Bakir M.A., Moore D.A., Hiley C.T., Lund T., Tanić M., Reading J.L., Joshi K., Henry J.Y., Ghorani E., Wilson G.A., Birkbak N.J., Jamal-Hanjani M., Veeriah S., Szallasi Z., Loi S., Hellmann M.D., Feber A., Chain B., Herrero J., Quezada S.A., Demeulemeester J., Van Loo P., Beck S., McGranahan N., Swanton C.; TRACERx consortium. Neoantigen-directed immune escape in lung cancer evolution. *Nature.* 2019;567(7749):479–85. doi: 10.1038/s41586-019-1032-7.
- Montesion M., Murugesan K., Jin D.X., Sharaf R., Sanchez N., Guria A., Minker M., Li G., Fisher V., Sokol E.S., Pavlick D.C., Moore J.A., Braly A., Singal G., Fabrizio D., Comment L.A., Rizvi N.A., Alexander B.M., Frampton G.M., Hegde P.S., Albacker L.A. Somatic HLA Class I Loss Is a Widespread Mechanism of Immune Evasion Which Refines the Use of Tumor Mutational Burden as a Biomarker of Checkpoint Inhibitor Response. *Cancer Discov.* 2021;11(2):282–92. doi: 10.1158/2159-8290.CD-20-0672.
- Tamaki K., Morishima S., Suzuki S., Shigenari A., Nomura I., Yokota Y., Morichika K., Nishi Y., Nakachi S., Okamoto S., Karube K., Fukushima T., Shiina T., Masuzaki H. Somatic Mutations and Loss of Heterozygosity of HLA Genes Are Frequently Occurred and Tightly Associated with Poor Prognosis in Adult T Cell Leukemia-Lymphoma. *Blood* 2019;134(Suppl.1):2785. doi: 10.1182/blood-2019-128070.
- Vago L., Perna S.K., Zanussi M., Mazzi B., Barlassina C., Stanghellini M.T., Perrelli N.F., Cosentino C., Torri F., Angius A., Forno B., Casucci M., Bernardi M., Peccatori J., Corti C., Bondanza A., Ferrari M., Rossini S., Roncarolo M.G., Bordignon C., Bonini C., Ciceri F., Fleischhauer K. Loss of mismatched HLA in leukemia after stem-cell transplantation. *N Engl J Med.* 2009;361:478–88. doi: 10.1056/NEJMoa0811036.
- Crucitti L., Crocchiolo R., Toffalori C., Mazzi B., Greco R., Signori A. Incidence, risk factors and clinical outcome of leukemia relapses with loss of the mismatched HLA after partially incompatible hematopoietic stem cell transplantation. *Leukemia.* 2015;29:1143–52. doi: 10.1038/leu.2014.314.
- Vago L., Toffalori C., Ahci M., Lange V., Lang K., Todaro S. Incidence of HLA Loss in a Global Multicentric Cohort of Post-Transplantation Relapses: Results from the HlaLoss Collaborative Study. *Blood.* 2018;132:818. doi: 10.1182/blood-2018-99-112142.
- Muniz P., Kwon M., Carbonell D., Chicano M., Bailen R., Oarbeascoa G. Clinical Utility of the Detection of the Loss of the Mismatched HLA in Relapsed Hematological Patients After Haploidentical Stem Cell Transplantation With High-Dose Cyclophosphamide. *Front Immunol.* 2021;12:642087. doi: 10.3389/fimmu.2021.642087.
- Montesion M., Murugesan K., Jin D.X., Sharaf R., Sanchez N., Guria A., Minker M., Li G., Fisher V., Sokol E.S., Pavlick D.C., Moore J.A., Braly A., Singal G., Fabrizio D., Comment L.A., Rizvi N.A., Alexander B.M., Frampton G.M., Hegde P.S., Albacker L.A. Somatic HLA Class I Loss Is a Widespread Mechanism of Immune Evasion Which Refines the Use of Tumor Mutational Burden as a Biomarker of Checkpoint Inhibitor Response. *Cancer Discov.* 2021;11(2):282–92. doi: 10.1158/2159-8290.CD-20-0672.
- Wang A., Li W., Zhao F., Zheng Z., Yang T., Wang S., Yan J., Lan J., Fan S., Zhao M., Shen J., Li X., Yang T., Lu Q., Lu Y., Bai H., Zhang H., Cai D., Wang L., Yuan Z., Jiang E., Zhou F., Song X. Clinical Characteristics and Outcome Analysis for HLA Loss Patients Following Partially Mismatched Related Donor Transplantation Using HLA Chimerism for Loss of Heterozygosity Analysis by Next-Generation Sequencing. *Cell Transplant.* 2022;31:9636897221102902. doi: 10.1177/09636897221102902.
- Filip I., Wang A., Kravets O., Orenbuch R., Zhao J., Perea-Chamblée T.E., Manji G.A., López de Maturana E., Malats N., Olive K.P., Rabadan R. Pervasiveness of HLA allele-specific expression loss across tumor types. *Genome Med.* 2023;9:15(1):8. doi: 10.1186/s13073-023-01154-x.
- Johansson T., Partanen J., Saavalainen P. HLA allele-specific expression: Methods, disease associations, and relevance in hematopoietic stem cell transplantation. *Front Immunol.* 2022;13:1007425. doi: 10.3389/fimmu.2022.1007425.
- Ahci M., Toffalori C., Bouwmans E., Crivello P., Brambati C., Pultrone C. A new tool for rapid and reliable diagnosis of HLA loss relapses after HSCT. *Blood.* 2017;130(10):1270–3. doi: 10.1182/blood-2017-05-784306.
- Linjama T., Impola U., Niittyvuopio R., Kuittinen O., Kaare A., Rimpiläinen J., Volin L., Peräsaari J., Jaatinen T., Lauronen J., Saarinen T., Juvonen E., Partanen J., Koskela S. Conflicting HLA assignment by three different typing methods due to the apparent loss of heterozygosity in the MHC region. *HLA.* 2016;87(5):350–5. doi: 10.1111/tan.12770.
- Цветкова Л.А., Евдокимов А.В., Бархатов И.М., Паина О.В., Епифановская О.С., Бабенко Е.В., Иванова Н.Е., Рахманова Ж.З., Кожокар П.В., Фролова А.С., Осипова А.А., Рябенко С.В., Козлов Д.В., Гиндина Т.Л., Семенова Е.В., Кулагин А.Д., Зубаровская Л.С. Прогностическое значение потери гетерозиготности HLA после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток при развитии рецидива острого лейкоза у детей. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. 2023;22(2):44–53. doi: 10.24287/1726-1708-2023-22-2-44-53. [Tsvetkova L.A., Evdokimov A.V., Barkhatov I.M., Paina O.V., Epifanovskaya O.S., Babenko E.V., Ivanova N.E., Rakhmanova Zh.Z., Kozhokar P.V., Frolova A.S., Osipova A.A., Ryabenko S.V., Kozlov D.V., Gindina T.L., Semenova E.V., Kulagin A.D., Zubarovskaya L.S. The prognostic value of HLA loss of heterozygosity after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in children with relapsed acute leukemia. *Voprosy gematologii/onkologii i immunopatologii v pediatrii = Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology.* 2023;22(2):44–53. (In Russ.)].

Статья поступила в редакцию: 03.11.2023. Принята в печать: 09.12.2023.

Article was received by the editorial staff: 03.11.2023. Accepted for publication: 09.12.2023.