

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, Н.Н. Попова, В.А. Васильева,
Л.А. Кузьмина, Г.А. Ефимов, Е.Н. Паровичникова, В.Г. Савченко
ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава России;
Россия, 125167 Москва, Новый Зыковский проезд, 4
Контакты: Григорий Александрович Ефимов efimov.g@blood.ru

Введение. Аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК) в настоящее время широко используется в терапии онкогематологических заболеваний. Отдаленные результаты алло-ТГСК напрямую зависят от способности цитотоксических Т-лимфоцитов распознавать и элиминировать остаточные опухолевые клетки. *CTLA-4* – один из регуляторных белков, обеспечивающий контроль над развитием иммунного ответа. Полиморфизмы в гене *CTLA4* могут влиять на его функцию и, следовательно, на эффективность противоопухолевого ответа.

Цель исследования – изучить роль несинонимического однонуклеотидного полиморфизма (нсОНП) с.49А>G в гене *CTLA4* донора в контроле над опухолью у реципиентов аллогенных гемопоэтических стволовых клеток (ГСК).

Материалы и методы. Доноры ГСК были генотипированы по нсОНП с.49А>G гена *CTLA4* методом полимеразной цепной реакции в реальном времени с аллель-специфичными праймерами. Полученные данные проверяли секвенированием по Сэнгеру случайно выбранных 22 образцов ДНК. Общую и безрецидивную выживаемость, вероятность развития рецидива рассчитывали по методу Каплана–Майера. Для оценки различий между 2 группами использовали log-rank-тест. Значимым считали значение $p < 0,05$.

Результаты. Частоты аллелей нсОНП с.49А>G гена *CTLA4* в изученной группе 102 доноров ГСК значимо не отличались от частот, полученных проектом «1000 геномов» для европейской популяции. Влияние полиморфизма *CTLA4* у донора на контроль над опухолью оценено на когорте пациентов с острыми лейкозами после проведения им алло-ТГСК от неродственного донора, совместимого по аллелям человеческого лейкоцитарного антигена (*human leukocyte antigen, HLA*). Показано, что в группе пациентов, ставших реципиентами ГСК от доноров, у которых полиморфизм с.49А>G находился в гомозиготном состоянии А/А, 3-летняя безрецидивная выживаемость была значимо ниже ($p = 0,01$) и составила 12,7 % против 62,8 % в группе с нсОНП G/G и А/G. Вероятность развития рецидива также значимо различалась для группы с А/А и группы с G/G и А/G вариантами с.49А>G и составила 83,7 и 29,3 % соответственно ($p = 0,03$).

Заключение. Пациенты с острыми лейкозами, ставшие реципиентами аллогенных неродственных полностью HLA-совместимых ГСК с генотипами G/G или А/G полиморфизма *CTLA4* с.49А>G, имеют значимо более низкий риск возникновения рецидива, чем пациенты, перенесшие трансплантацию от доноров с генотипом А/А. Это указывает на целесообразность генотипирования по данному полиморфизму для подбора оптимального донора.

Ключевые слова: аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток, реакция «трансплантат против хозяина», аллель-специфичная полимеразная цепная реакция в реальном времени, несинонимический однонуклеотидный полиморфизм, *CTLA4*

Для цитирования: Романюк Д.С., Хмелевская А.А., Дроков М.Ю. и др. Влияние полиморфизма гена *CTLA4* на вероятность развития рецидива у больных острыми лейкозами после трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток. Онкогематология 2019;14(1):76–82.

DOI: 10.17650/1818-8346-2019-14-1-76-82

Effect of *CTLA4* gene polymorphism on relapse probability among patients with acute leukemias after allogeneic hematopoietic stem cells transplantation

D.S. Romaniuk, A.A. Khmelevskaya, M. Yu. Drokov, N.N. Popova, V.A. Vasilieva, L.A. Kuzmina,
G.A. Efimov, E.N. Parovichnikova, V.G. Savchenko

National Research Center for Hematology, Ministry of Health of Russia; 4 Novyy Zыkovskiy Proezd, Moscow 125167, Russia

Background. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT) is being widely applied as a therapy for hematological malignancies. The long-term outcome of allo-HSCT depends directly on the ability of cytotoxic T-lymphocytes to recognize and eliminate the residual tumor. *CTLA-4* is one of the regulatory proteins that provide control over the development of the immune response. Polymorphisms in the *CTLA4* gene can affect its function and the efficiency of the antitumor response.

The objective: to study the effect of non-synonymous single nucleotide polymorphism (nsSNP) с.49А>G in the donor *CTLA4* gene on tumor control in the recipient of allogeneic hematopoietic stem cells (HSC).

Materials and methods. Donors of HSC were genotyped for nsSNP c.49A>G in the *CTLA4* gene by the real-time polymerase chain reaction using the allele-specific primers. Genotyping data was validated by Sanger's sequencing of 22 randomly selected samples. The overall survival, the event-free survival and relapse probability were calculated using the Kaplan–Mayer method. A log-rank test was used to assess the statistical significance of group disparities. A *p*-value of 0.05 was considered as significant.

Results. The frequencies of the *CTLA4* gene c.49A>G polymorphism alleles in the observed population (102 healthy donors of HSC) correspond to the frequencies obtained by the “1000 genomes” project for the European population. The effect of the donor *CTLA4* polymorphism on the tumor control was evaluated on the cohort of patients with acute leukemia after human leukocyte antigen (HLA) matched HSCT from an unrelated donor. It was shown, the three-year relapse-free survival was significantly lower for those patients who received grafts from a donor with the homozygous A/A state of nsSNP c.49A>G (*p* = 0.01), it was 12.7 % versus 62,8 % in group with c.49A>G G/G and A/G donor genotypes. The incidence of relapse was also significantly different for the group with A/A genotype and for the group with G/G or A/G genotypes of the nsSNP and equaled to 83.7 and 29.3 % respectively (*p* = 0.03).

Conclusion. Patients with acute leukemia, who underwent allo-HSCT from unrelated completely HLA-matched donors with c.49A>G G/G or A/G genotypes have the significantly lower risk of relapse than patients whose donors had the A/A genotype. These results suggest practicality of the nsSNP genotyping for the optimal donor selection.

Key words: allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, graft versus host disease, allele-specific polymerase chain reaction, non-synonymous single nucleotide polymorphism, *CTLA4*

For citation: Romaniuk D.S., Khmelevskaya A.A., Drovok M.Yu. et al. Effect of *CTLA4* gene polymorphism on relapse probability among patients with acute leukemias after allogeneic hematopoietic stem cells transplantation. *Onkogematologiya = Oncohematology* 2019;14 (1):76–82.

Введение

Аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК) широко используется в терапии опухолевых заболеваний системы крови. Т-лимфоциты донора составляют клеточный иммунитет реципиента после алло-ТГСК и обладают способностью элиминировать злокачественные клетки реципиента — противоопухолевый эффект, известный как реакция «трансплантат против лейкоза» [1]. Одновременно Т-клетки могут распознавать негемопоэтические клетки реципиента как «чужие» и атаковать ткани реципиента в процессе, известном как реакция «трансплантат против хозяина» (РТПХ) [2].

В процессе иммунного распознавания для пролиферации и дифференцировки наивных Т-лимфоцитов требуются 2 сигнала: от связи Т-клеточного рецептора с антигенным пептидом, представленным молекулами главного комплекса гистосовместимости, и костимуляторный сигнал, возникающий при взаимодействии белков В7-1 и В7-2 (CD80 и CD86) на поверхности антигенпрезентирующих клеток с молекулами CD28 на Т-клетках. Ингибирующий рецептор CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte associated antigen 4 или CD152) — поверхностный антиген цитотоксических Т-лимфоцитов, который является гомологом и конкурентным антагонистом CD28 за связывание с В7. Он начинает экспрессироваться после активации Т-лимфоцитов и обеспечивает механизм отрицательной обратной связи [3]. При этом CTLA-4 имеет большую аффинность к В7, чем CD28 [4]. CTLA-4 существует в виде 2 изоформ: мембранного рецептора (mCTLA-4) с внеклеточным и внутриклеточным доменами и секретируемой растворимой изоформы (sCTLA-4), которая имеет только внеклеточный домен, связывающий лиганд. Обе изоформы снижают активацию Т-клеток, поддерживают иммунную толерантность и гомеостаз [5].

Ген *CTLA4* содержит 3 широко изучаемых несинонимических однонуклеотидных полиморфизма (нсОНП): -318C>T в промоторном регионе, с.49A>G в экзоне 1 и СТ60 в 3'-нетранслируемой области гена (соответственно rs5742909, rs231775 и rs3087243 согласно онлайн-базе ОНП dbSNP, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>). Показано, что данные полиморфизмы могут влиять на уровень экспрессии и функцию белка CTLA-4 [6–9]. Полиморфизмы в гене *CTLA4* коррелируют с различными аутоиммунными заболеваниями и риском развития некоторых новообразований [10–14]. Полиморфизм с.49A>G находится в положении 49 экзона 1 гена *CTLA4*, и его альтернативное состояние — с гуанином — обуславливает замену треонина на аланин в сигнальной последовательности белка. Такая замена уменьшает экспрессию CTLA-4 на поверхности клетки [7] и снижает способность CTLA-4 ингибировать иммунный ответ [6].

Цель исследования — изучить доли генотипов нсОНП с.49A>G в гене *CTLA4* у доноров гемопоэтических стволовых клеток, а также сопоставить генотип нсОНП с.49A>G неродственных доноров гемопоэтических стволовых клеток, совместимых по молекулам человеческого лейкоцитарного антигена (human leukocyte antigen, HLA), с вероятностью развития рецидива после алло-ТГСК и данными по общей и безрецидивной выживаемости для группы больных острыми лейкозами.

Материалы и методы

Образцы ДНК. Проанализированы образцы крови 102 доноров ГСК для пациентов НМИЦ гематологии, которым проведена алло-ТГСК в период с 2012 по 2018 г. Геномная ДНК выделена с помощью набора для очистки ДНК из цельной крови Wizard (Promega, США).

Генотипирование. Для генотипирования нсОНП rs231775 гена *CTLA4* использовали полимеразную

цепную реакцию (ПЦР) в реальном времени с аллель-специфичными праймерами. Разработаны и синтезированы (Евроген, Россия) следующие праймеры: специфичный для аллеля А – GGCTCAGCTGAACCTGGCaA; специфичный для аллеля G – GGCTCAGCTGAACCTGGCaG; общий праймер – GACAGGGATGAAGAGAAGAAAAACAG. Строчными буквами отмечены внедренные не комплементарные матрицы нуклеотиды, необходимые для повышения специфичности генотипирования. Также синтезирован флуоресцентно меченный ДНК-зонд (FAM-CCAGGACCTGGC-CCTGCACT-BHQ1). В качестве внутреннего контроля использовали ген *B2M* (beta-2-microglobulin, микроглобулин бета-2): праймеры – ATCCGACATTGAAGTTGACTTACTG и AGACCAGTCCTTGCTGAAAGA; зонд – Cy5.5-TGGAGAGAGAATTGAAAAAGTGGAGCATTC-RTQ2. Зонд для *B2M* синтезирован в компании Синтол (Россия).

На реакцию брали 60–100 нг ДНК, для каждого образца ставили 2 реакции – по одной на аллель нсОНП. Параллельно шла контрольная реакция на ген *B2M*. В качестве готовой реакционной смеси использовали qPCRmix-HS (Евроген, Россия) с конечной концентрацией магния 3 mM и конечной концентрацией каждого нуклеотидтрифосфата 0,2 mM. Результат генотипирования определяли по разнице пороговых циклов ПЦР в реальном времени. Генотипирование проводили дважды, независимо и вслепую с помощью прибора CFX96 Touch (Bio-Rad, США). В качестве контроля использовали фрагменты гена *CTLA4*, содержащие исследуемый нсОНП, клонированные с помощью вектора pJet1.2 в составе набора CloneJET PCR Cloning (Thermo Fisher Scientific, США) и бактериального штамма *Escherichia coli* DH5 α . Выделение плазмид осуществляли с использованием набора GeneJET Plasmid Miniprep (Thermo Fisher Scientific, США), их проверку проводили методом секвенирования по Сэнгеру.

Полученные результаты использовали для сопоставления доли генотипов с данными литературы. Дополнительно данные генотипирования 33 доноров аллогенных гемопоэтических стволовых клеток (см. далее) использовали для оценки роли полиморфизма с.49A>G гена *CTLA4* в контроле над опухолью у пациентов с острыми лейкозами после алло-ТГСК.

Секвенирование. Для подтверждения данных генотипирования были просеквенированы 22 случайно выбранных образца ДНК. Использовали те же праймеры, что и для клонирования контрольных фрагментов гена *CTLA4*: TGAAGACCTGAACACCGCTC и CCTGGAATACAGAGCCAGCC (Евроген, Россия). Для ПЦР использовали готовую реакционную смесь ScreenMix (Евроген, Россия) с конечной концентрацией магния 2 mM и концентрацией каждого нуклеотидтрифосфата 0,2 mM. Продукты ПЦР были проверены электрофорезом в 1,5 % агарозном геле и очищены с помощью набора Cleanup Standard (Евроген, Россия). Концентрация продуктов ПЦР была измерена

с использованием NanoPhotometer (IMPLEN, ФРГ) и приведена к 4 нг/мкл. Сиквенс-реакцию проводили с помощью набора BigDye Terminator v1.1 (Applied Biosystems, США) в 2 направлениях. Очистка смеси проводилась с помощью набора BigDye XTerminator (Applied Biosystems, США). Секвенирование выполняли на приборе Нанофор 5 (Синтол, Россия).

Реципиенты аллогенных ГСК. В исследование влияния полиморфизма гена *CTLA4* у донора на вероятность развития рецидива у реципиента после алло-ТГСК были включены пациенты с острыми лейкозами, которые были трансплантированы в полной ремиссии от неродственного HLA-совместимого донора в НМИЦ гематологии в период с 2012 по 2018 г. Все пациенты в качестве профилактики РТПХ получали: антитимоцитарный глобулин в суммарной дозе 40 мг/кг с –4-го по –1-й день; циклоспорин А в дозе 3 мг/кг/сут с –1-го дня; микофенолата мофетил 3000 мг/сут с +1-го дня. Также применяли метотрексат в дозе 15 мг/м² на +1-й и 10 мг/м² на +3, +6 и +11-й день соответственно. Для статистического анализа генотипы G/G и A/G соответствующих доноров были сгруппированы, поскольку в нескольких работах показана роль генотипа с.49A>G AA в развитии аллоиммунных процессов после алло-ТГСК [10, 15]. Полученные группы не различались по тем факторам, которые могли бы повлиять на вероятность развития рецидива и безрецидивную выживаемость: режим кондиционирования, статус заболевания, развитие острой и хронической РТПХ. С учетом невозможности оценить влияние варианта нсОНП с.49A>G гена *CTLA4* на отдаленные результаты у пациентов без донорского кроветворения (с отторжением/неприживлением) такие пациенты также были исключены из анализа. Таким образом, в исследование были включены 33 пациента. Детально характеристики пациентов представлены в таблице.

Для оценки влияния вариантов нсОНП с.49A>G гена *CTLA4* на долгосрочные результаты рассчитывали общую и безрецидивную выживаемость, а также вероятность развития рецидива. Общую выживаемость рассчитывали от даты алло-ТГСК до даты смерти от любых причин, безрецидивную выживаемость – от даты алло-ТГСК до даты рецидива или смерти от любых причин, вероятность развития рецидива – от даты алло-ТГСК до момента рецидива; больные, умершие в период ремиссии, были цензурированы.

Статистический анализ проводили с помощью программного обеспечения GraphPad 7.0. Для оценки общей и безрецидивной выживаемости, а также вероятности развития рецидива использовали метод Каплана–Мейера. Для сравнения различий между 2 группами применяли *log-rank*-тест. При анализе использовали точный тест Фишера. Значимым считали показатель $p < 0,05$.

Результаты

При анализе 102 образцов ДНК доноров было выявлено, что для нсОНП с.49A>G гена *CTLA4* частоты

Характеристика реципиентов гемопоэтических стволовых клеток с различными вариантами несинонимического однонуклеотидного полиморфизма с.49A>G гена *CTLA4*

Characteristics of hematopoietic stem cells recipients with different variants of non-synonymous single nucleotide polymorphism c.49A>G *CTLA4* gene

Характеристика Characteristics	AA (n = 11)	GG, A/G (n = 22)	p
Медиана возраста (диапазон), лет Median of age (range), years	30 (19–60)	33 (22–58)	0,56
Пол, n (%): Gender, n (%):			
мужской male	1 (9,1)	8 (36,4)	0,21
женский female	10 (90,9)	14 (63,6)	
Диагнозы, n (%): Diagnosis, n (%):			
острый миелоидный лейкоз acute myeloid leukemia	8 (72,7)	12 (54,5)	0,45
острый лимфобластный лейкоз acute lymphoblastic leukemia	3 (27,3)	10 (45,5)	
Статус заболевания, n (%): Disease status, n (%):			
ПР1 CR1	6 (54,5)	16 (72,7)	0,43
ПР2 CR2	5 (45,5)	6 (27,3)	
Кондиционирование, n (%): Conditioning, n (%):			
RIC	6 (54,5)	14 (63,6)	0,71
MAC	5 (45,5)	8 (36,4)	
Трансплантат, n (%): Graft, n (%):			
костный мозг bone marrow	6 (54,5)	11 (50,0)	0,99
стволовые клетки крови peripheral blood stem cells	5 (45,5)	11 (50,0)	
Острая РТПХ, n (%): Acute GVHD, n (%):			
да yes	3 (27,3)	7 (31,8)	0,99
нет no	8 (72,7)	15 (68,2)	
Хроническая РТПХ, n (%): Chronic GVHD, n (%):			
да yes	2 (18,2)	10 (45,5)	0,24
нет no	9 (81,8)	12 (54,5)	

Примечание. ПР – полная ремиссия; RIC – кондиционирование со сниженной интенсивностью; MAC – миелоаблативное кондиционирование; РТПХ – реакция «трансплантат против хозяина».

Note. CR – complete remission; RIC – reduced intensity conditioning; MAC – myeloablative conditioning; GVHD – graft versus host disease.

генотипов А/А, А/Г и G/G составили 0,33; 0,49 и 0,18 соответственно. Таким образом, частота аллеля А составила 0,573, частота аллеля G – 0,427. Данные значения статистически не отличаются от частот, полученных проектом «1000 Геномов» ([**а**

Частоты аллеля А – 0,573, аллеля G – 0,427/Frequencies of allele A – 0.573, allele G – 0.427

б

Частоты аллеля А – 0,641, аллеля G – 0,359/Frequencies of allele A – 0.641, allele G – 0.359

■ Аллель А/Allele A ■ Аллель G/Allele G](http://www.internationalge-</p>
</div>
<div data-bbox=)

Рис. 1. Частоты аллелей и генотипов (показаны на графиках) полиморфизма с.49A>G у доноров гемопоэтических стволовых клеток НМИЦ гематологии (n = 102) (а) и в европейской популяции по данным проекта «1000 геномов» (n = 503) (б)

Fig. 1. Alleles and genotypes (shown in the graphs) frequencies of c.49A>G polymorphism in hematopoietic stem cells donors in National Research Center for Hematology (n = 102) (a) and in the European population according to “1000 genomes” project (n = 503) (b)

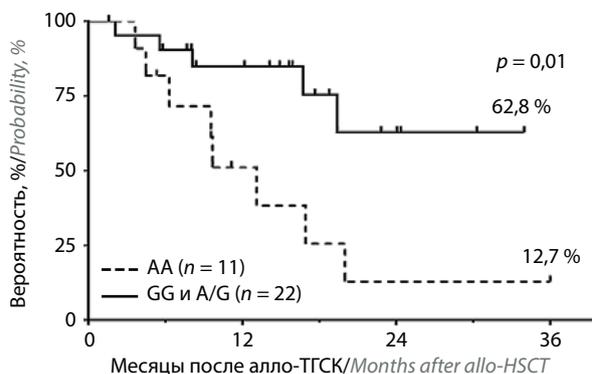


Рис. 2. Безрецидивная выживаемость пациентов с острыми лейкозами после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК) от неродственного HLA-идентичного донора в зависимости от генотипа полиморфизма с.49A>G у доноров гемопоэтических стволовых клеток

Fig. 2. Relapse-free survival of patients with acute leukemia after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT) from unrelated HLA-identical donor, depending on the c.49A>G polymorphism genotype in hematopoietic stem cell donors

nome.org/) для европейской популяции (частота аллеля А – 0,641, G – 0,359) (рис. 1).

Для оценки влияния полиморфизма гена *CTLA4* у донора на Т-клеточный контроль над опухолью после алло-ТГСК были проанализированы клинические данные 33 пациентов с острыми лейкозами, которым выполнена трансплантация от неродственного HLA-совместимого донора.

Было обнаружено достоверное влияние нсОМП с.49A>G (rs231775) на 3-летнюю безрецидивную выживаемость и 3-летнюю вероятность развития рецидива. У реципиентов аллогенных ГСК от доноров с генотипами А/Г или G/G 3-летняя безрецидивная

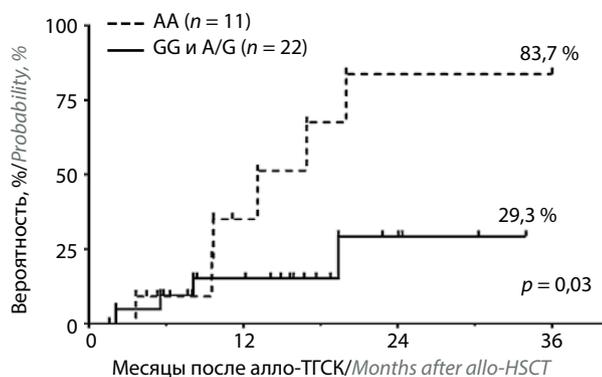


Рис. 3. Вероятность развития рецидива у пациентов с острыми лейкозами после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК) от неродственного HLA-идентичного донора в зависимости от генотипа полиморфизма с.49A>G у доноров гемопоэтических стволовых клеток

Fig. 3. Relapse probability in patients with acute leukemia after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT) from unrelated HLA-identical donor, depending on the c.49A>G polymorphism genotype in hematopoietic stem cell donors

выживаемость была значимо выше ($p = 0,01$) и составила 62,8 % против 12,7 % в группе с нсОМП А/А (рис. 2). Также было показано, что 3-летняя вероятность развития рецидива у пациентов после трансплантации от доноров с генотипом А/А значимо выше, чем у пациентов после трансплантации от доноров с генотипами А/Г и Г/Г – 83,7 и 29,3 % соответственно ($p = 0,03$) (рис. 3). Для показателей 3-летней общей выживаемости у пациентов с острыми лейкозами значимых различий не найдено (рис. 4).

Обсуждение

На 1-м этапе исследования стояла задача проверить частоту генотипов полиморфизма с.49A>G гена *CTLA4* у доноров костного мозга, поскольку роль замены с.49A>G (нсОМП – rs231775) была показана в различных исследованиях для таких заболеваний, как диффузный токсический зоб, неходжкинские лимфомы, ревматоидный артрит и системная красная волчанка [6, 9–14]. Также была показана связь этого полиморфизма с частотой развития хронической РТПХ после HLA-совместимой родственной алло-ТГСК [16]. Рассчитанная нами доля генотипа АА полиморфизма с.49A>G для российской популяции составила 0,33. Таким образом, около трети всех трансплантаций сопряжены с повышенным риском развития рецидива.

Предполагаемый механизм влияния данного полиморфизма на исход трансплантации заключается в снижении функции CTLA-4 за счет нарушения процесса его транслокации на поверхность клеток [7]. Замена треонина на аланин в сигнальной последовательности белка в трети случаев приводит к гликозилированию молекулы CTLA-4 только по 1 из 2 сайтов гликозилирования, что, соответственно, на треть снижает количество CTLA-4 на поверхности клеток [8]. Данное нарушение влияет на величину ингибирующе-

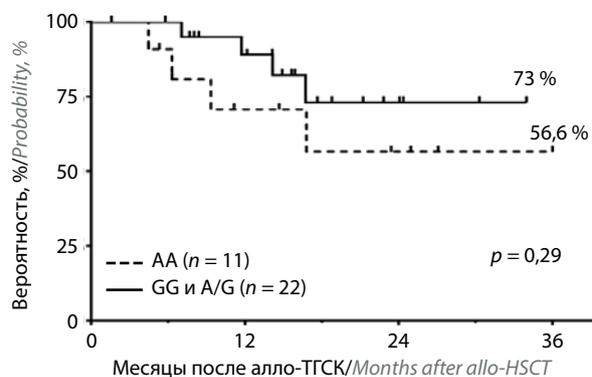


Рис. 4. Общая выживаемость у пациентов с острыми лейкозами после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК) от неродственного HLA-идентичного донора в зависимости от генотипа полиморфизма с.49A>G у доноров гемопоэтических стволовых клеток

Fig. 4. Overall survival in patients with acute leukemia after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT) from unrelated HLA-identical donor, depending on the c.49A>G polymorphism genotype in hematopoietic stem cell donors

го сигнала, поступающего в клетку при стимуляции мембранного CTLA-4, и меняет баланс между активирующим и ингибирующим сигналами. При трансплантации гемопоэтических стволовых клеток от донора с генотипом АА полиморфизма с.49A>G CTLA-4 экспрессируется на нормальном уровне, что обеспечивает ингибирование Т-клеточного иммунного ответа. Это, в свою очередь, уменьшает силу реакции «трансплантат против лейкоза» и увеличивает риск возникновения рецидива.

Анализ гомогенной когорты из 33 пациентов с острыми лейкозами после алло-ТГСК от HLA-совместимых неродственных доноров указывает на роль полиморфизма с.49A>G гена *CTLA4* у донора в контроле над опухолью: для генотипа А/А полиморфизма с.49A>G 3-летняя безрецидивная выживаемость составила 12,7 % и вероятность развития рецидива – 83,7 %; для генотипов А/Г и Г/Г 3-летняя безрецидивная выживаемость – 62,8 % и вероятность рецидива – 29,3 %. В исследованной группе пациентов не обнаружено значимого влияния на вероятность развития и степень тяжести РТПХ, показанного в других исследованиях [15–17], что, возможно, объясняется используемым протоколом профилактики РТПХ, включающим антиtimoцитарный глобулин. Применение антиtimoцитарного глобулина снижает летальность, связанную с РТПХ, но повышает вероятность развития рецидива [18–20]. Помимо этого, стоит отметить, что подбор доноров для рассмотренной группы пациентов проходил по 5 парам генов HLA. И, возможно, на полученный результат исследования повлияло несоответствие некоторых пар доноров и пациентов по 6-й паре генов локуса HLA – HLA-DP или по генам другого полиморфного локуса – KIR [21]. Стоит отметить, что изменение экспрессии CTLA-4, связанное с генотипом полиморфизма с.49A>G как у донора, так

и у реципиента может влиять на эффективность терапии, основанной на блокировке иммунологических контрольных точек, к которым относится и CTLA-4 [22]. Активно исследуется использование блокаторов иммунологических контрольных точек до алло-ТГСК и после нее для терапии онкогематологических заболеваний. Например, блокатор CTLA-4 может применяться до алло-ТГСК и после нее [23].

Заключение

Пациенты, которым выполнили алло-ТГСК от неродственных совместимых доноров с генотипом G/G

или A/G полиморфизма с.49A>G, имеют значимо более низкую вероятность возникновения рецидива, чем пациенты, перенесшие трансплантацию от доноров с генотипом с.49A>G A/A. Детальный механизм этого явления еще предстоит выяснить. Данное исследование указывает на целесообразность типирования нсОМП rs231775 в гене *CTLA4* при подборе неродственного донора для алло-ТГСК. Если полученные данные будут подтверждены с использованием большей выборки, следует учитывать повышенный риск развития рецидива при трансплантации от донора с генотипом A/A полиморфизма с.49A>G.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Kolb H.J. Graft-versus-leukemia effects of transplantation and donor lymphocytes. *Blood* 2008;112(12):4371–83. DOI: 10.1182/blood-2008-03-077974. PMID: 19029455.
- Shlomchik W.D. Graft-versus-host disease. *Nat Rev Immunol* 2007;7(5):340–52. DOI: 10.1038/nri2000. PMID: 17438575.
- Karandikar N.J., Vanderlugt C.L., Walunas T.L. et al. CTLA-4: a negative regulator of autoimmune disease. *J Exp Med* 1996;184(2):783–8. DOI: 10.1084/jem.184.2.783. PMID: 8760834.
- van der Merwe P.A., Bodian D.L., Daenke S. et al. CD80(B7-1) binds both CD28 and CTLA-4 with a low affinity and very fast kinetics. *J Exp Med* 1997;185(3):393–403. DOI: 10.1084/jem.185.3.393. PMID: 9053440.
- Krummel M.F., Allison J.P. CTLA-4 engagement inhibits IL-2 accumulation and cell cycle progression upon activation of resting T cells. *J Exp Med* 1996;183(6):2533–40. DOI: 10.1084/jem.183.6.2533. PMID: 8676074.
- Kouki T., Sawai Y., Gardine C.A. et al. *CTLA-4* gene polymorphism at position 49 in exon 1 reduces the inhibitory function of CTLA-4 and contributes to the pathogenesis of Graves' disease. *J Immunol* 2000;165(11):6606–11. DOI: 10.4049/jimmunol.165.11.6606. PMID: 11086105.
- Ligers A., Teleshova N., Masterman T. et al. *CTLA-4* gene expression is influenced by promoter and exon 1 polymorphisms. *Genes Immun* 2001;2(3):145–52. DOI: 10.1038/sj.gene.6363752. PMID: 11426323.
- Anjos S., Nguyen A., Ounissi-Benkhalha H. et al. A common autoimmunity predisposing signal peptide variant of the cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 results in inefficient glycosylation of the susceptibility allele. *J Biol Chem* 2002;277(48):46478–86. DOI: 10.1074/jbc.M206894200. PMID: 12244107.
- Chistiakov D.A., Savost'yanov K. V., Turakulov R.I. et al. Genetic analysis and functional evaluation of the C/T(-318) and A/G(-1661) polymorphisms of the *CTLA-4* gene in patients affected with Graves' disease. *Clin Immunol* 2006;118(2–3):233–42. DOI: 10.1016/j.clim.2005.09.017. PMID: 16297665.
- Monne M., Piras G., Palmas A. et al. Cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 (*CTLA-4*) gene polymorphism and susceptibility to non-Hodgkin's lymphoma. *Am J Hematol* 2004;76(1):14–8. DOI: 10.1002/ajh.20045. PMID: 15114591.
- Ueda H., Howson J.M. M., Esposito L. et al. Association of the T-cell regulatory gene *CTLA4* with susceptibility to autoimmune disease. *Nature* 2003;423(6939):506–11. DOI: 10.1038/nature01621. PMID: 12724780.
- Donner H., Rau H., Walfish P.G. et al. *CTLA4* alanine-17 confers genetic susceptibility to Graves' disease and to type 1 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82(1):143–6. DOI: 10.1210/jcem.82.1.3699. PMID: 8989248.
- Gonzalez-Escribano M.F., Rodriguez R., Valenzuela A. et al. *CTLA4* polymorphisms in Spanish patients with rheumatoid arthritis. *Tissue Antigens* 1999;53(3):296–300. DOI: 10.1034/j.1399-0039.1999.530311.x. PMID: 10203024.
- Hudson L.L., Rocca K., Song Y.W. et al. *CTLA-4* gene polymorphisms in systemic lupus erythematosus: a highly significant association with a determinant in the promoter region. *Hum Genet* 2002;111(4–5):452–5. DOI: 10.1007/s00439-002-0807-2. PMID: 12384790.
- Gallardo D., Bosch-Vizcaya A., Rodríguez-Romanos R. et al. Donor CTLA-4 genotype modulates the immune response to minor histocompatibility antigen mismatches. *Biol Blood Marrow Transplant* 2017;23(12):2042–7. DOI: 10.1016/j.bbmt.2017.08.003. PMID: 28827064.
- Azarian M., Busson M., Lepage V. et al. Donor CTLA-4 +49 A/G*GG genotype is associated with chronic GVHD after HLA-identical haematopoietic stem-cell transplantations. *Blood* 2007;110(13):4623–4. DOI: 10.1182/blood-2007-08-106385. PMID: 18056853.
- Pérez-García A., la Cámara R.D., Román-Gómez J. et al. *CTLA-4* polymorphisms and clinical outcome after allogeneic stem cell transplantation from HLA-identical sibling donors. *Blood* 2007;110(1):461–7. DOI: 10.1182/blood-2007-01-069781. PMID: 17384200.
- Mohty M., Bay J.O., Faucher C. et al. Graft-versus-host disease following allogeneic transplantation from HLA-identical sibling with antithymocyte globulin-based reduced-intensity preparative regimen. *Blood* 2003;102(2):470–6. DOI: 10.1182/blood-2002-12-3629. PMID: 12649133.
- Pascal L., Tucunduva L., Ruggeri A. et al. Impact of ATG-containing reduced-intensity conditioning after single- or double-unit allogeneic cord blood transplantation. *Blood* 2015;126(8):1027–32. DOI: 10.1182/blood-2014-09-599241. PMID: 26160301.
- Russell J.A., Turner A.R., Larratt L. et al. Adult recipients of matched related donor blood cell transplants given myeloablative regimens including pretransplant antithymocyte globulin have lower mortality related to graft-versus-host disease: a matched pair analysis. *Biol Blood Marrow Transplant* 2007;13(3):299–306. DOI: 10.1016/j.bbmt.2006.10.017. PMID: 17317583.

21. Warren E.H., Zhang X.C., Li S. et al. Effect of MHC and non-MHC donor/recipient genetic disparity on the outcome of allogeneic HCT. *Blood* 2012;120(14): 2796–806. DOI: 10.1182/blood-2012-04-347286. PMID: 22859606.
22. Боголюбова А.В., Ефимов Г.А., Друцкая М.С., Недоспасов С.А. Иммуноterapia опухолей, основанная на блокировке иммунологических контрольных «точек» («чекпойнтов»). *Медицинская иммунология* 2015;17(5):395–406. DOI: 10.15789/1563-0625-2015-5-395-406. [Bogolyubova A.V., Efimov G.A., Drutskaya M.S., Nedospasov S.A. Cancer immunotherapy based on the blockade of immune checkpoints. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology* 2015;17(5):395–406. (In Russ.)].
23. Ijaz A., Khan A.Y., Malik S.U. et al. Significant risk of graft-versus-host disease with exposure to checkpoint inhibitors before and after allogeneic transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2019;25(1):94–9. DOI: 10.1016/j.bbmt.2018.08.028. PMID: 30195074.

Вклад авторов

Д.С. Романюк, А.А. Хмелевская: разработка дизайна эксперимента, получение и анализ данных, написание текста рукописи, создание рисунков;

М.Ю. Дроков: статистический анализ данных, создание рисунков, обзор публикаций по теме статьи, сбор биологических образцов;

Н.Н. Попова, В.А. Васильева, Л.А. Кузьмина: сбор биологических образцов, обзор публикаций по теме статьи;

Г.А. Ефимов: разработка эксперимента, обработка результатов, написание текста рукописи;

Е.Н. Паровичникова: анализ данных, написание текста рукописи;

В.Г. Савченко: анализ полученных данных.

Authors' contributions

D.S. Romaniuk, A.A. Khmelevskaya: study design development, data collection and analysis, article writing, creating figures;

M.Yu. Drovok: statistical analysis of the data, creating figures, reviewing of publications of the article's topic, collection of biological samples;

N.N. Popova, V.A. Vasilieva, L.A. Kuzmina: collection of biological samples, reviewing of publications of the article's topic;

G.A. Efimov: development of the experiment, data processing, article writing;

E.N. Parovichnikova: analysis of the data, article writing;

V.G. Savchenko: analysis of the obtained data.

ORCID авторов/ORCID of authors

Д.С. Романюк/D.S. Romaniuk: <https://orcid.org/0000-0002-9423-1269>

М.Ю. Дроков/M.Yu. Drovok: <https://orcid.org/0000-0001-9431-8316>

Н.Н. Попова/N.N. Popova: <https://orcid.org/0000-0003-0636-4991>

Л.А. Кузьмина/L.A. Kuzmina: <https://orcid.org/0000-0001-6201-6276>

Г.А. Ефимов/G.A. Efimov: <https://orcid.org/0000-0001-7129-6062>

В.Г. Савченко/V.G. Savchenko: <https://orcid.org/0000-0001-8188-5557>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование выполнено за счет собственных средств ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России без спонсорской поддержки.

Financing. The study was performed at the expense of own funds of the National Research Center for Hematology without sponsorship.

Информированное согласие. Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Informed consent. All patients gave written informed consent to participate in the study.

Статья поступила: 05.10.2018. **Принята к публикации:** 13.12.2018.

Article received: 05.10.2018. **Accepted for publication:** 13.12.2018.