

Федеральное государственное бюджетное учреждение  
«Национальный медицинский исследовательский центр гематологии»  
Министерства Здравоохранения Российской Федерации

На правах рукописи

Лучкин Антон Владимирович

**Определение и динамическое исследование длины теломерных районов ДНК  
у больных апластической анемией на разных этапах течения болезни**

3.1.28. – Гематология и переливание крови

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор Михайлова Елена Алексеевна

доктор медицинских наук, Гальцева Ирина Владимировна

Москва, 2023

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	11
1.1. Структура и функции теломерных районов ДНК как важного компонента клеточной защиты.....	11
1.2. Причины укорочения и удлинения теломер.....	16
1.3. Современные представления о патогенезе апластической анемии.....	22
1.4. Подходы к лечению апластической анемии.....	29
1.5. Влияние изменения длины теломер на эффективность лечения апластической анемии.....	31
1.6. Методы измерения длины теломер.....	35
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	38
2.1. Характеристика больных.....	38
2.2. Подготовка биоматериала для проведения исследования.....	46
2.3. Определение длины теломер методом проточной цитометрии (flow-FISH).....	47
2.4. Определение относительной длины теломер с помощью метода flow-FISH.....	50
2.5. Определение абсолютной длины теломер с помощью полимеразной цепной реакции.....	54
2.6. Определение абсолютной длины теломер с помощью метода flow-FISH .....	57
2.7. Разделение больных на группы в зависимости от исходной длины теломер.....	59
2.8. Статистическая обработка данных.....	60
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ.....	62
3.1. Определение относительной и абсолютной длины теломер мононуклеаров крови и костного мозга у больных апластической анемией до начала комбинированной иммуносупрессивной терапии.....	62

3.2. Сравнение относительной и абсолютной длины теломер у больных апластической анемией и доноров.....	63
3.3. Сравнение относительной и абсолютной длины теломер в мононуклеарах, лимфоцитах, моноцитах периферической крови и костного мозга.....	65
3.4. Сравнение относительной и абсолютной длины теломер в группах больных апластической анемией и врожденным дискератозом.....	66
3.5. Относительная и абсолютная длина теломер мононуклеаров крови у больных апластической анемией в зависимости от тяжести и длительности заболевания.....	67
3.6.1. Оценка вероятности ответа и развития рецидива в зависимости от исходной длины теломер.....	69
3.6.2. Оценка частоты клональных осложнений в зависимости от исходной длины теломер.....	71
3.7. Оценка эффективности иммуносупрессивной терапии и вероятности ответа в зависимости от клинико-лабораторных показателей.....	72
3.8. Анализ динамики длины теломер у больных апластической анемией в процессе терапии .....	79
3.9. Сравнение относительной и абсолютной длины теломер между группами больных апластической анемией в дебюте заболевания и с длительным анамнезом рефрактерности к лечению.....	84
Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ.....	87
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	94
ВЫВОДЫ.....	95
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	96
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	97
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	99

## ВВЕДЕНИЕ

Апластическая анемия (АА) - заболевание системы крови, характеризующееся костномозговой недостаточностью, связанной с нарушением иммунных механизмов регуляции кроветворения, количественным дефицитом и функциональными дефектами стволовых кроветворных клеток, ведущих к развитию аплазии костного мозга [5]. В Европе заболеваемость составляет около двух случаев на миллион в год, в то время как в Азии заболевание выявляется в три раза чаще [19]. Выделяют конституциональные и приобретенные формы АА. Конституциональная АА (анемия Фанкони (АФ), врожденный дискератоз (ВД), синдром Швахмана-Даймонда, анемия Даймонда-Блекфена) редко выявляется у взрослых больных, не более чем в 10% случаев.

В 80-85% случаев диагностируется идиопатическая АА, основным механизмом патогенеза которой является аутоагрессия олигоклональных цитотоксических Т-лимфоцитов против клеток-предшественников кроветворения с неконтролируемой продукцией цитокинов (интерферона- $\gamma$  (ИНФ- $\gamma$ ), фактора некроза опухоли- $\alpha$  (ФНО- $\alpha$ ) и др.) и медиаторов пролиферации Т-клеток, апоптоза (интерлейкина-2 и др.) [5]. Эти механизмы инициируют нарушение регуляции клеточного цикла: снижение колониеобразующей способности, подавление пролиферации и индукция апоптоза гемопоэтических клеток. Пусковой фактор активации иммунной системы неизвестен [5; 7]. В настоящее время изучается роль внутренних дефектов гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) в патогенезе АА. Среди них: хромосомные aberrации, одиночные или множественные соматические мутации с развитием клонального кроветворения, потеря гетерозиготности короткого плеча 6 хромосомы, влияние стромального микроокружения, а также укорочение длины теломер (ДТ).

Теломеры являются концевыми участками хромосом, состоящими из гексаповторов «TTAGGG», не несущих наследственной информации, ключевая задача которых - сохранение целостности генетического материала в процессе

митоза за счет способности присоединения новых нуклеотидных последовательностей взамен утерянных и формирования защитных молекулярных центров. Фермент теломераза и вспомогательные белковые комплексы (Шелтериновый, CST, RTEL1 и другие) обеспечивают поддержание адекватной ДТ. ДТ у больных АА может влиять на эффективность лечения [15; 47; 54; 80]. Также ее определение используется для проведения дифференциальной диагностики между приобретенной и некоторыми формами конституциональных аплазий костного мозга [65].

Современные методы исследования системы кроветворения (цитометрические, молекулярные, цитогенетические), а также их сочетание, позволяют повысить эффективность разработанных алгоритмов лечения АА, включающих проведение комбинированной иммуносупрессивной терапии (ИСТ) и выполнение трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК) [5; 66].

### **Актуальность темы исследования**

Существует два основных подхода к лечению АА, включающие проведение ИСТ и выполнение алло-ТГСК. Комбинированная ИСТ является предпочтительной, позволяя достичь 60-90% длительную выживаемость у больных АА. Однако, остается группа рефрактерных больных к стандартной ИСТ (около 20-30%), что определяет необходимость дальнейшего изучения патофизиологических механизмов развития рефрактерности болезни и разработки новых методов терапии [63; 66].

За последнее десятилетие в нескольких крупных исследованиях выделен ряд факторов, позволяющих прогнозировать ответ на ИСТ: интервал «установление диагноза – начало терапии», абсолютное количество нейтрофильных форм лейкоцитов, ретикулоцитов, наличие клона пароксизмальной ночной гемоглобинурии (ПНГ), хромосомных aberrаций и некоторые другие. В то же время, накопленных данных недостаточно для

достоверного прогнозирования результатов лечения, что требует выделения новых «маркеров» рефрактерности к терапии [47; 55].

Таким маркером может служить ДТ, которая определяет вероятность ответа на ИСТ, развития рецидива и клональной трансформации, а также коррелирует с общей выживаемостью больных [15; 55]. Дополнительные исследования по изучению ДТ в динамике на фоне терапии необходимы для более глубокого понимания патогенеза АА и повышения эффективности лечения.

### **Степень разработанности темы исследования**

За последние десятилетия опубликовано много научных работ, посвященных как дополнительному изучению иммунных механизмов, так и роли внутренних дефектов ГСК в патогенезе АА. Роль влияния ДТ на течение болезни до конца не определена. Этим можно объяснить заинтересованность исследователей в данной области. Большинство как отечественных, так и зарубежных работ нацелены на изучение ДТ как фактора прогноза ответа на лечение или развития различных осложнений, но зачастую не затрагивают изменения данного параметра в процессе проводимой терапии, при достижении ремиссии и констатации рефрактерности. Также не проводилось детального сравнения ДТ в различных биологических материалах (кровь и костный мозг) и в разных клеточных популяциях у больных АА.

### **Цель исследования**

Изучение изменений длины теломерных районов ДНК у больных апластической анемией на разных этапах течения болезни.

## **Задачи исследования**

1. Определить относительную и абсолютную длину теломер в мононуклеарах, моноцитах, лимфоцитах периферической крови, костного мозга у больных апластической анемией до начала лечения и у доноров с помощью метода flow-FISH.
2. Сравнить относительную и абсолютную длину теломер у больных апластической анемией и врожденным дискератозом.
3. Изучить длину теломер мононуклеаров периферической крови у больных апластической анемией в зависимости от тяжести и длительности заболевания.
4. Оценить эффективность иммуносупрессивной терапии, вероятность достижения ответа и частоту клональных осложнений в зависимости от исходной длины теломер.
5. Исследовать относительную длину теломер у больных апластической анемией в процессе лечения в общей группе и в зависимости от исходных значений.
6. Оценить длину теломер у больных апластической анемией, ранее не ответивших на иммуносупрессивную терапию.

## **Научная новизна**

Разработан алгоритм пересчета относительной ДТ в абсолютные значения при помощи сопоставления двух методов: flow-FISH и ПЦР (полимеразная цепная реакция) в реальном времени.

Впервые у больных АА выполнено сравнение ДТ в разных диагностических материалах (периферическая кровь, костный мозг), разных клеточных популяциях (мононуклеары, лимфоциты, моноциты) с использованием методики flow-FISH.

В диссертационной работе впервые показано отсутствие изменения ДТ у больных АА за период наблюдения в процессе лечения. Также не были

обнаружены изменения данного параметра в динамике в группах больных с исходно более короткими и более длинными теломерами.

### **Практическая значимость**

В проведенном исследовании внедрена методика определения абсолютной ДТ для взрослых больных АА при помощи сопоставления flow-FISH и ПЦР в реальном времени. Была сформирована группа здоровых доноров различного возраста с целью получения референсных значений относительной и абсолютной ДТ.

Доказано, что предпочтительным материалом для определения ДТ у больных с костномозговой недостаточностью являются мононуклеары периферической крови.

Методика определения ДТ позволяет проводить точную дифференциальную диагностику между приобретенной АА и ВД у взрослых больных.

Практическая значимость проведенного исследования заключается в определении дополнительных факторов прогноза ответа на ИСТ у больных АА, в частности относительной и абсолютной ДТ, что позволяет выбрать оптимальную тактику лечения.

### **Методология и методы исследования**

Основу для методологии составили отечественные и зарубежные работы по изучению патогенеза АА. Применяли цитометрические, цитогенетические методы исследования (сочетание проточной цитометрии с флуоресцентной гибридизацией *in situ*). Особое внимание уделялось воспроизведению методики по определению относительной длины теломер методом flow-FISH, в том числе и изучению группы здоровых доноров для получения референсных значений, а также разработке метода пересчета относительной ДТ в абсолютную при помощи сопоставления результатов проточной цитометрии и ПЦР в реальном времени.



## **Положения, выносимые на защиту**

1. Относительная и абсолютная длина теломер, определенная методом flow-FISH, сопоставима у доноров и у больных апластической анемией до начала лечения. Оптимальным материалом для исследования длины теломер у больных с костномозговой недостаточностью являются мононуклеары периферической крови ввиду отсутствия различий с клетками костного мозга и отдельно выделенными популяциями лимфоцитов и моноцитов.

2. Длина теломер, наряду с другими факторами прогноза (тяжесть заболевания, выявленные хромосомные aberrации и другие), может рассматриваться как предиктор достижения ремиссии апластической анемии. Исходно низкое значение длины теломер в дебюте заболевания является фактором неблагоприятного прогноза ответа на иммуносупрессивную терапию.

3. Достоверные изменения длины теломер у больных апластической анемией за время наблюдения отсутствовали, при этом у больных, рефрактерных к иммуносупрессивной терапии, были обнаружены более короткие теломеры, что может быть связано с длительным периодом дефектного кроветворения в условиях аплазии костного мозга. Уменьшение длины теломер при повторных исследованиях может сопровождать появление новых хромосомных aberrаций.

## **Степень достоверности и апробации результатов**

Достоверность полученных результатов основана на изучении достаточного объема научной литературы и примененной методологии исследования, многоступенчатого статистического анализа данных.

Апробация работы состоялась 15 мая 2023 года на заседании проблемной комиссии ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России «Фундаментальные и клинические исследования в гематологии; проблемы клинической и производственной трансфузиологии» (протокол №4).

Анализ промежуточных результатов представлен в виде устного доклада «Длина теломер у больных апластической анемией как маркер эффективности иммуносупрессивной терапии и возможного развития клональных осложнений» на «VI конгрессе гематологов России и III конгрессе трансфузиологов России», прошедшем в Москве 21-23.04.2022. Эти данные были опубликованы в материалах «VI Конгресса гематологов России и III Конгресса трансфузиологов России» в журнале «Гематология и трансфузиология», 2022;67(2):34-35. Также результаты будут опубликованы в журнале «Онкогематология» («Длина теломер различных клеток крови и костного мозга больных апластической анемией», 2023 год, 3-й выпуск, принята в печать).

Результаты методологической части работы были опубликованы в виде статьи «Сопоставление методов полимеразной цепной реакции и проточной цитометрии для измерения длины теломер лейкоцитов человека» («Клиническая лабораторная диагностика». 2021; 66(3)) [9] и патента на изобретение № 2763935 «Способ определения абсолютной длины теломер лейкоцитов с помощью метода проточной цитометрии».

По теме диссертации опубликовано 7 работ в журналах, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ, 15 тезисных сообщений, в том числе 7 – в англоязычных сборниках конференций.

### **Объем и структура диссертации**

Диссертационная работа изложена на 110 страницах машинописного текста и включает разделы «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждение», «Практические рекомендации», «Заключение» и «Список литературы». Работа иллюстрирована 22 рисунками, содержит 18 таблиц. Список литературы включает 98 литературный источник: 10 отечественных и 88 зарубежных.

## Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Структура и функции теломерных районов ДНК как важного компонента клеточной защиты

Поддержание необходимой длины теломер (ДТ) является одним из ключевых механизмов сохранения стабильности генетического материала клетки. Ее патологические изменения приводят к нарушению нормального функционирования систем органов и развитию различных заболеваний.

В ходе эволюции эукариот усложнение процесса клеточного деления привело к развитию новых механизмов повреждения ДНК. Одним из таких механизмов является феномен концевой недорепликации – важный процесс биологического старения клетки. В S-фазе клеточного цикла ДНК-полимераза неспособна синтезировать терминальную копию нити ДНК в отсутствие специального РНК-праймера на «пустом месте» 3'-конца. Поэтому 3'-концевые участки ДНК остаются одотяжевыми, а 5'-концевые участки — недореплицированными. Так, с каждым клеточным циклом концевые участки ДНК теряют до 200 нуклеотидов [40].

Теломеры являются концевыми участками хромосом, состоящими из гексаповторов «TTAGGG», не несущих наследственной информации, ключевая задача которых - сохранение целостности генетического материала в процессе митоза. При достижении лимита Хейфлика (приблизительно 50-52 циклов репликации) и критического укорочения теломер в соматических клетках человека, хромосомы становятся подвержены возникновению транслокаций, делеций и других aberrаций, вследствие чего за счет индукции ингибиторов клеточного цикла p21 и p16 останавливается клеточная пролиферация с последующим переходом в апоптоз [45; 77]. Этот механизм обеспечивает своевременную утилизацию клеток с выраженным истощением теломер, то есть клеток, накопивших большое количество мутаций. Это направлено на сохранение

стабильности генома. Функциональные нарушения экспрессии проапоптотических белков-супрессоров, таких как p53, p21 и Rb, могут приводить к отсутствию своевременной утилизации таких клеток, имеющих множественные хромосомные дефекты, формируя обходной путь в развитии неопластических процессов [25].

Другой функцией теломер является способность к формированию молекулярных центров и образование защитного нуклеопротеидного комплекса, препятствующих слиянию хромосом. Без теломер концы хромосом могут быть распознаны как фрагментированный или вирусный ДНК-материал. Помимо этого, линейные концы хромосом без дополнительных защитных механизмов могут сливаться между собой, что неизбежно ведет к нестабильности генетического материала. Такие участки могут быть распознаны системами репарации как разрывы нити ДНК с дальнейшим переходом клетки в апоптоз [61]. Появляются данные, указывающие на участие теломерных районов ДНК в регуляции экспрессии различных генов, находящихся в других областях хромосом [32; 85].

Также теломеры участвуют в структурировании и взаимодействии с другими компонентами ядра за счет прикрепления к элементам матрикса и внутренней мембране. Особенную роль придают связи с ядерной ламиной. Так, ламинины определяют топологию теломер в ядре. Особенно это важно в интерфазе, во время сборки ядра, когда их участие необходимо в реорганизации хроматина дочерних клеток [20].

Ключевую роль в поддержании ДТ в лимфоцитах, кроветворных клетках-предшественниках, половых клетках и некоторых других играет теломеразный комплекс (теломеразы), состоящий из матричной РНК (*TERC*), обратной транскриптазы (*TERT*) и комплекса дополнительных белков (дискерин и прочие) (Рисунок 1). Именно уровень экспрессии *TERC* определяет активность теломеразы, а благодаря механизмам ее регуляции возможно поддержание оптимальной ДТ [72]. Дискерин – белок, кодируемый геном *DKC1* – обеспечивает нормальное связывание и работу комплекса «TERT-TERC», а также участвует в биосинтезе рибосом. В 30% случаев именно мутации *DKC1* выявляют при

развитии врожденного дискератоza (ВД) [37]. Другим важным белком, входящим в теломеразный комплекс, является ТСАВ1, который необходим для рекрутирования теломеразы в тельца Кахаля (Cajal body) в S-фазе клеточного цикла и доставки ее к теломерам [76]. Белки NHP2 и NOP10 выполняют вспомогательные функции. Теломераза синтезирует новые последовательности «TTAGGG» на 3'-конце, потерянные в процессе предшествующей репликации. Ее максимальная активность определяется в эмбриональных, гемопоэтических стволовых клетках, активированных Т-лимфоцитах, опухолях. Соматические клетки в основном лишены теломеразной активности. Без работы теломеразы репликация ДНК привела бы к эрозии генетического материала при каждом делении клетки [61].

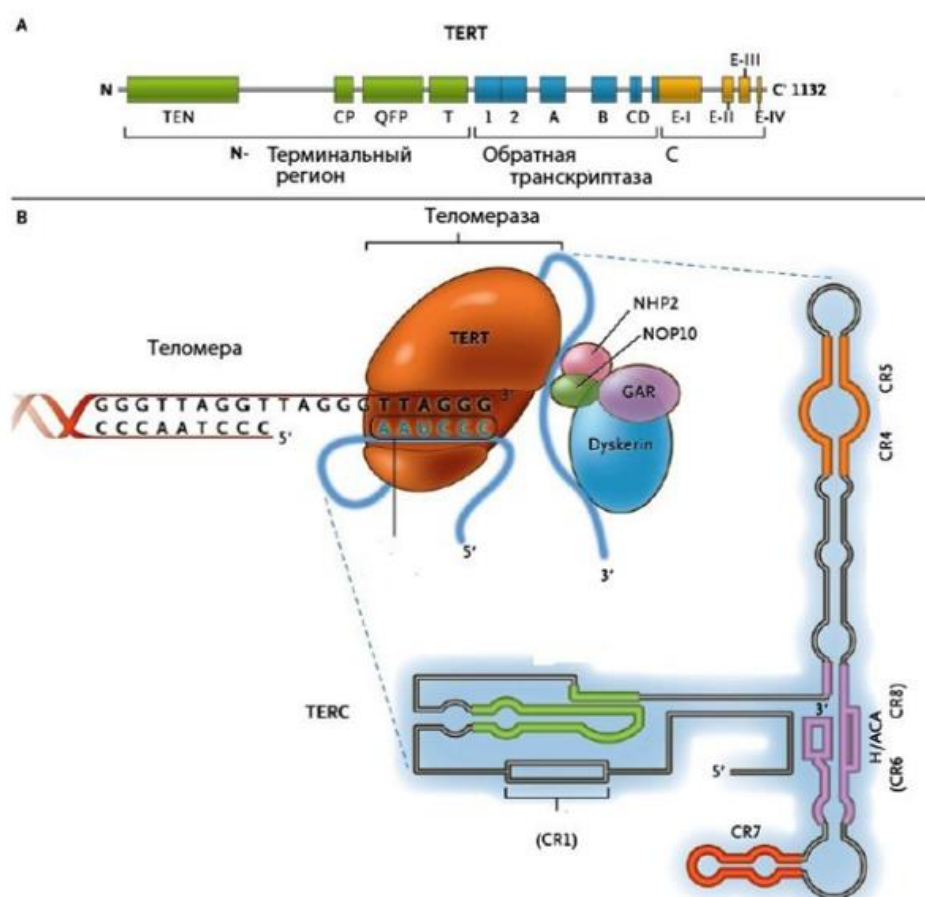


Рисунок 1 - Структура теломеразного комплекса (Rodrigo T.Calado, 2009) [69]

В полноценной работе теломеразы, а также в поддержании структуры теломер (формирование трехмерной структуры, Т-петлей и пр.) участвуют и другие белковые комплексы: шелтериновый комплекс, CST-комплекс, белок RTEL1 [61].

Шелтериновый комплекс является главным регулятором активности теломеразы, а, следовательно, и ДТ.

Компоненты шелтеринового комплекса:

1) Факторы связывания теломерных повторов 1 и 2 (TRF1/ TERF1 и TRF2). Связываются с двухцепочечным участком теломерной ДНК с одной стороны и с TIN2 и RAP1 с другой [31].

2) TRTF1-взаимодействующий ядерный фактор 2 (TIN2) – связывает TRF 1, TRF 2, TPP1 между собой и с G-выступом (крайний однонитевой 3' участок теломер состоящий из 3-300 нуклеотидов). Является основным медиатором для активации этих белков [95].

3) Белок защиты теломер 1 (POT1). Взаимодействует с одноцепочечной теломерной ДНК через две олигонуклеотидные/олигосахаридные складки. Кроме того, POT1 может ингибировать синтез теломерных повторов в присутствии своего партнера по связыванию TPP1, но способствует процессивности теломеразы *in vitro* в его отсутствии [21].

4) TIN2 взаимодействующий фактор 1 (TPP1, TINT1, PToP, PIP1). Связывается с POT1, являясь его регулятором. Помимо этого TPP1 регулирует перенос теломеразы из телец Кахаля на теломеры [59].

5) Белок репрессор/активатор 1 (RAP1). Прикрепляется к теломерной ДНК через домен Myb и связывает TRF2 (в меньшей степени TRF1) посредством белковых взаимодействий внутри домена *RCT*, тем самым ингибируя удлинение теломер [28].

В целом шелтериновый комплекс является негативным регулятором ДТ. Соответственно, дефицит одного или нескольких компонентов комплекса приводят к неконтролируемому удлинению теломер, что было показано на многих лабораторных моделях [21; 28; 37; 59].

Помимо защиты теломер, шелтериновый комплекс обладает и рядом других функций. Например, белок RAP1 является модулятором ядерного транскрипционного фактора NF- $\kappa$ B, участвует в регуляции клеточного метаболизма (гликолиз, глюконеогенез, митохондриальное дыхание) и в воспалительном ответе (синтез провоспалительных медиаторов и молекул адгезии) [28].

CST-комплекс также является отрицательным регулятором длины теломер. Комплекс состоит из трех субъединиц: Cdc13 (главная субъединица, состоящая из 5 компонентов – OB 1, 2, 3, 4 и RD) и белковой связки Stn1-Ten1 [61]. Связывание комплексом концов хромосом изолирует теломерный выступ («telomere capping»), тем самым предотвращая доступ теломеразы к 3' концу ДНК. В процессе кэпирования участвуют все 3 компонента CST. Потеря любой из субъединиц комплекса ведет к неконтролируемому удлинению теломер [23]. В то же время комплекс способствует удлинению теломер путем доставки к ним теломеразы, что обеспечивается с помощью Cdc13RD и его взаимодействия с белком Est1. Также CST способен влиять на комплекс шелтерина (образование связи Pot1-TPP1). Другой функцией CST является связывания с pol- $\alpha$ -примазой (инициация репликации ДНК), регулируя синтез С-цепи во время работы теломеразы [61]. На переключение между состояниями кэппинга и удлинения теломер в значительной степени влияет фосфорилирование Cdc13 RD и Cdc13 OB4. Всего идентифицировано более 20 сайтов фосфорилирования Cdc13 [53].

Из других факторов, регулирующих ДТ, следует отметить белковые структуры - геликазы. Наиболее изучена геликаза, кодируемая геном RTEL1. Регуляторная роль белка заключается в разматывании Т-петель (T-loop), которые обеспечивают закливание линейной теломерной ДНК, формируя третичную структуру и отличая крайние последовательности «TTAGGG» от концевых разрывов, что необходимо для удлинения теломер [64]. Другие геликазы (SLX4, BLM, WRN, RecQL4) – также участвуют в сохранении стабильности теломер [37]. Активно обсуждается роль различных нуклеаз, 3'-5'-экзонуклеаз, Snm1B/Apollo (участие в репарации межцепочечных сшивок) и других белковых структур в

поддержании ДТ. Помимо упомянутых ранее Т-петель, в поддержание третичной структуры теломер вносят вклад G-квадраты: G-(гуаниновые) триплеты на концах «TTAGGG» формируют между собой прочные водородные связи. Для нормальной работы теломеразы и полноценного деления клетки должен произойти разрыв этих связей [61]. Схематичное изображение комплексов, влияющих на поддержание стабильности теломер представлено на Рисунке 2.

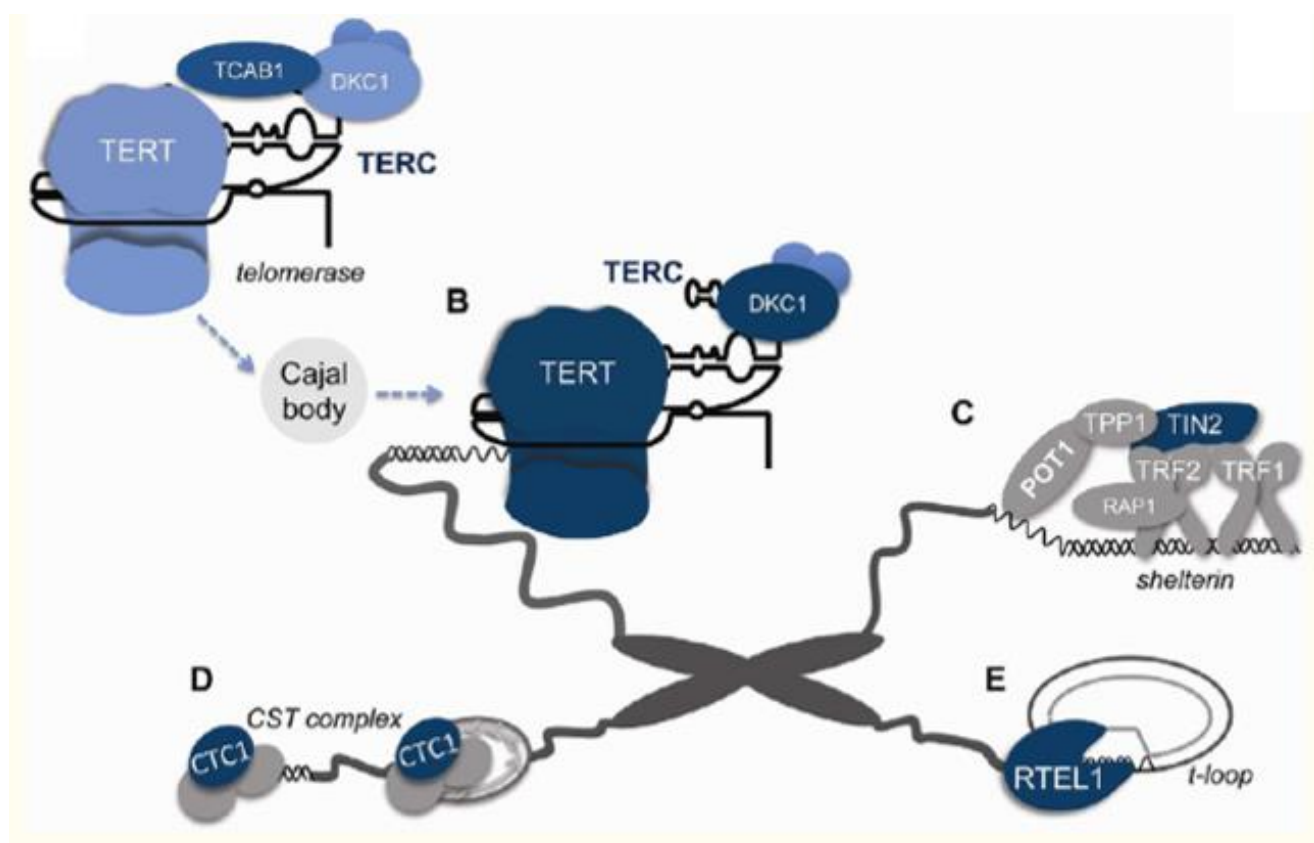


Рисунок 2 - Факторы, влияющие на поддержание длины теломер и связанные с нарушением их биологии (Gramatges M.M; 2013) [37]

## 1.2. Причины укорочения и удлинения теломер

В течение последних лет проводится все больше исследований, посвященных влиянию как укорочения, так и удлинения теломер на развитие



патологических процессов, таких как канцерогенез, костномозговая недостаточность и иммунодефицит.

Физиологически ДТ уменьшается с возрастом. При этом отмечается два пика: в течение первых лет жизни (период интенсивного развития организма, сопровождающийся повышением активности всех биологических процессов) и в возрасте старше 60 лет (накопление мутаций, ведущих к нарушению процессов восстановления теломер). Дополнительно на длину теломер влияют образ жизни и воздействие окружающей среды, а именно стресс, курение, физическая активность, избыточный вес, инфицирование вирусами, хроническое воспаление, радиационное излучение [48; 70]. Такая чувствительность теломер, даже к небольшим изменениям в организме, связана с тем фактом, что концентрация теломеразы низкая и ее активность строго регулируется. Это создает сбалансированную систему, в которой не все теломеры удлиняются за один клеточный цикл в условиях базовой экспрессии теломеразы. Всего изучено три механизма ограничения активности теломеразы. Во-первых, это, как указано выше, относительно низкая экспрессия *TERT* и *TERC*, по сравнению с другими генами, отвечающими за клеточное жизнеобеспечение. Базовая выработка *TERT* настолько мала, что в 22% ее транскрипция оказывается ниже исследуемого порога. Во-вторых, это отрицательная регуляторная активность белков шелтеринового и CST-комплексов. В-третьих, это временное ограничение процесса добавления «TTAGGG»-повторов S-фазой клеточного цикла. Таким образом, ДТ уменьшается даже в клетках с высокой активностью теломеразы (гемопоэтические клетки, Т-лимфоциты и другие) [50; 75].

Активно изучается гипотеза, в которой основная роль в процессе старения и развития возраст-ассоциированных заболеваний отводится не столько собственно ДТ, сколько постоянной активации «реакции на повреждение ДНК», с последующим запуском SASP-опосредованного (senescence-associated secretory phenotype) воспаления, фиброза, нарушения свойств и дифференцировки стволовых клеток организма [77].

Механизмами чрезмерного (патологического) уменьшения ДТ могут выступать пролиферативный стресс или прямое повреждение ДНК при воздействии радиации, токсинов, медиаторов воспаления [29; 58; 90]. В случае пролиферативного или регенеративного стресса уменьшение ДТ возникает в следствие повышенной митотической активности в стволовых клетках и/или клетках-предшественниках. Этот процесс подробно описан при восстановлении гемопоэза после химиотерапии или трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) [96].

Наиболее же изученным является процесс возникновения соматических мутаций в генах, кодирующих белковые комплексы (теломеразный, шелтериновый, CST), которые обеспечивают поддержание ДТ. Соматические мутации в генах, кодирующих данные структуры, нарушают функции теломер и ведут к развитию конституциональных заболеваний – теломеропатий, наиболее изученным из которых является ВД [35; 62]. Болезнь проявляется прогрессирующей цитопенией, аплазией костного мозга, выраженным уменьшением ДТ, высоким риском развития вторичных злокачественных неоплазий и характерной клинической картиной (кожно-слизистые проявления: ретикулярная пигментация кожи, дистрофические изменения ногтевых пластин, лейкоплакия слизистой оболочки полости рта; некоторые аномалии развития) [35]. Предположить развитие ВД можно уже на этапе осмотра больного, однако для установления диагноза необходимо лабораторное подтверждение укорочения теломер и/или проведение генетического тестирования [65].

Другой хорошо изученной нозологией из группы теломеропатий является идиопатический легочный фиброз (ИЛФ). Дисфункция теломер в клетках альвеолярного эпителия приводит к нарушению регенерации, воспалению и фиброзу [77]. По крайней мере 50% больных ИЛФ имеют укороченные теломеры. В каждом третьем случае семейных вариантов болезни удастся выявить мутации, влияющие на нормальную функцию теломер [50]. Диагноз устанавливается на основании характерной рентгенологической картины (пятнистое, базальное и периферическое затемнение легочных полей по типу «матового стекла») и

функциональных тестов (функция внешнего дыхания и другие), что позволяет снизить количество биопсий легочной ткани. Помимо ИЛФ, укорочение теломер ассоциировано с развитием и других заболеваний легочной ткани: хроническая обструктивная болезнь легких, облитерирующий бронхит, хронический гиперчувствительный пневмонит, эмфизема [96].

Печень также поражается при патологии теломер. Стеатоз, цирроз, портальная гипертензия, особенно у молодых больных, могут навести на мысль о развитии такого генетически детерминированного состояния. Основным методом для уточнения причины поражения печени остается выполнение биопсии [96].

Теломеропатии связаны с развитием таких патологий, как стеноз пищевода, энтероколит, иммунодефицит, остеопороз [96]. Изменение ДТ коррелирует с возрастающей частотой развития инфаркта миокарда, атеросклероза, гипертонической болезни, инсульта, бронхиальной астмы, является маркером риска развития осложнений при ишемической болезни сердца [2–4; 8; 77] (Рисунок 3).

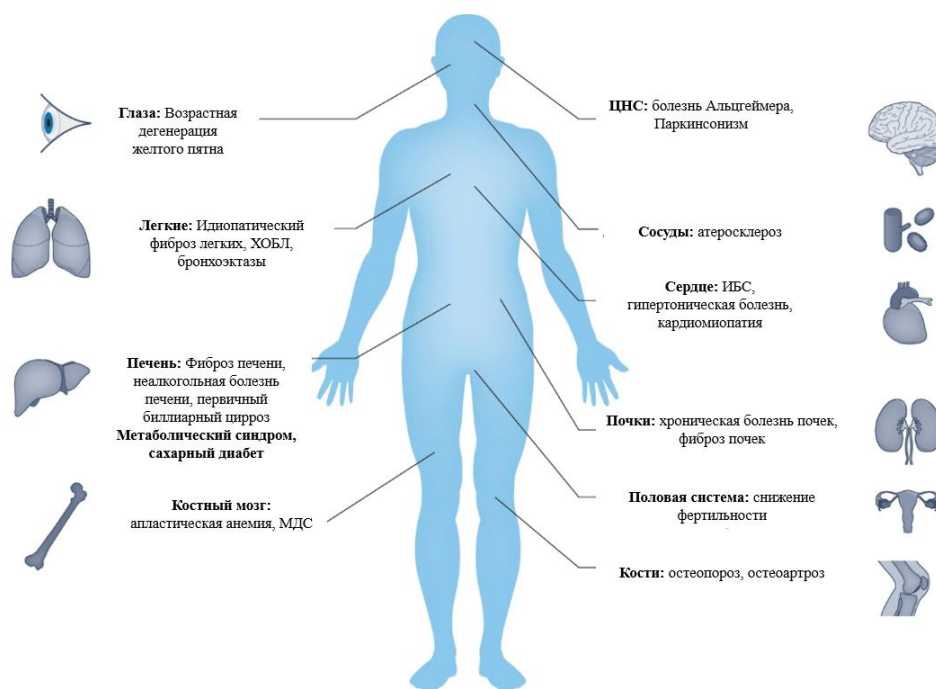


Рисунок 3 - Заболевания, связанные с дисфункцией теломер (Rossiello F.; 2022) [37]

Развитие солидных злокачественных опухолей – частое событие при теломеропатиях (около 15%), но оно встречается реже по сравнению с другими наследственными синдромами предрасположенности к раку (до 90%). Наиболее же часто выявляется патология стволовых кроветворных клеток, что приводит к развитию синдрома недостаточности костного мозга и гематологических опухолей [50].

При хроническом лимфолейкозе укорочение теломер ассоциировано с агрессивным течением болезни, что значительно влияет на общую выживаемость больных. Однако, уменьшение ДТ не влияет на вероятность выявления сложных цитогенетических aberrаций [86]. Аналогичная картина наблюдается и у больных с неходжкинскими лимфомами. Больные с агрессивными лимфомами (диффузная В-крупноклеточная лимфома) имеют более короткие теломеры по сравнению с группой больных фолликулярной лимфомой [14]. При лимфоме Ходжкина теломеры обычно несколько короче, чем у здоровых добровольцев [87]. Короткие теломеры также являются предиктором частого развития вторичных неоплазий после химиотерапии, проводимой по поводу лечения лимфопролиферативных заболеваний [57].

По данным G. Keller и соавторов, при хроническом миелолейкозе ДТ коррелировала со стадией заболевания и продолжительностью хронической фазы. Укорочение теломер по мере прогрессирования болезни было связано с высокой пролиферативной активностью *BCR::ABL*-позитивных клеток [89].

У больных миелодиспластическим синдромом (МДС) теломеры были короче по сравнению с группой здоровых доноров, однако, прогностическая ценность теста в определении стратегии лечения на данный момент не определена [88].

При остром миелоидном лейкозе (ОМЛ) больные с более длинными теломерами имели лучшую общую выживаемость, менее длительный период послекурсового агранулоцитоза. У них реже выявлялись неблагоприятные аномалии кариотипа [12].

В 2003 году в первом исследовании по изучению теломер в плазматических клетках у больных множественной миеломой было показано уменьшение ДТ по сравнению с здоровым контролем. При этом ДТ в плазматических клетках была ниже по сравнению с гранулоцитами и лимфоцитами у самих больных. Что интересно, в дальнейших исследованиях показано отсутствие различий в ДТ у больных множественной миеломой и моноклональной гаммапатией неопределенного значения [6].

Повышенный риск развития злокачественных новообразований может быть связан с патологическим удлинением теломер в клеточных культурах. Повышенную активность теломеразы, можно обнаружить при меланоме, аденокарциноме легких, колоректальном раке, глиоме, семейных случаях хронического лимфолейкоза и синдроме Ли-Фраумени [50]. В процессе канцерогенеза опухолевые клетки, приобретают механизмы дополнительного поддержания ДТ, что обеспечивает их преимущество в выживании. Это противодействует p53-опосредованному апоптозу и создает эффект «ускользания» опухолевого клона. Вероятно, в отсутствие адекватного контроля за такими клетками увеличение ДТ приводит к избыточной пролиферации и накоплению множественных дополнительных мутаций, что рассматривается механизмом развития неопластического процесса [11; 78]. Так мутации в генах *TERT*, *TPP1*, *POT1*, *RAP1* (отвечающие за отрицательную регуляцию длины теломер) ассоциированы с развитием некоторых форм семейного рака [50]. Большое значение придается и влиянию однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) в генах, поддерживающих стабильность теломер. Так, в популяционном исследовании Rode L. на группе из более чем 95000 человек показано, что удлинение теломер и выявление однонуклеотидных полиморфизмов rs7726159 (*TERT*), rs1317082 (*TERC*), rs2487999 (*OBFC1*) являются факторами, увеличивающими частоту развития различных злокачественных опухолевых заболеваний [62]. Отдельным механизмом альтернативного удлинения теломер является накопление деактивирующих мутаций в гене регулятора транскрипции *ATRX*. На примере нейроэндокринных опухолей поджелудочной железы и глиомы

выявлена четкая корреляция ДТ с вышеуказанными мутациями [75]. Помимо этого, обсуждается и теория о первоначальном удлинении теломер вследствие дефекта эмбриогенеза [13; 84].

### **1.3. Современные представления о патогенезе апластической анемии**

Основным механизмом развития апластической анемии (АА) является иммунная агрессия, направленная против ГСК. Подавление клеток-предшественников кроветворения возникает за счет олигоклональной экспансии цитотоксических Т-клеток с неконтролируемой продукцией цитокинов, таких как интерферон- $\gamma$  (ИНФ- $\gamma$ ), фактор некроза опухоли- $\alpha$  (ФНО- $\alpha$ ), а также медиаторов пролиферации Т-клеток и апоптоза (интерлейкин-2 (ИЛ-2) и другие) [5]. Так, ИНФ- $\gamma$ , производимый Т-хелперами 1-го типа (CD4+), активирует цитотоксические Т-лимфоциты (CD8+), усиливая фагоцитарные и цитотоксические реакции в костном мозге, а также напрямую нарушает пролиферацию миелоидных предшественников. ФНО- $\alpha$  запускает Fas-опосредованный апоптоз гемопоэтических стволовых клеток, а повышенная экспрессия апоптозного антигена (Fas-рецептора) определяется на CD34+ клетках у больных АА [44]. Важную роль в иммунном ответе играет секреция Т-хелперами других медиаторов (ИЛ-6, ИЛ-10), что также стимулирует пролиферацию цитотоксических Т-лимфоцитов, усиливая аутоиммунную агрессию по отношению к ГСК. Эти механизмы инициируют нарушение регуляции клеточного цикла: снижение колониобразующей способности, подавление пролиферации и индукцию апоптоза. Пусковой фактор активации иммунной системы неизвестен [5; 7]. В физиологических условиях избыточная активация Т-лимфоцитов предотвращается несколькими ингибиторными путями. В основе одного из таких путей лежит молекула PD-1 (Programmed cell death-1). Являясь рецептором к лигандам PD-L1/PD-L2, она ингибирует сигнальный путь, вовлеченный в активацию Т-клеток [7]. Дендритные и НК-клетки также могут

участвовать в патогенезе заболевания. Так, доля НК-клеток значительно снижена до начала иммуносупрессивной терапии (ИСТ) и возрастает после начала лечения [44].

Существует связь развития некоторых случаев болезни с прямым воздействием на клетки костного мозга токсинов, химических веществ, лекарственных препаратов, радиации, вирусов. В процессе хронического воспаления неизменно участвуют провоспалительные медиаторы ФНО- $\alpha$ , ИЛ-6 и другие. Неизбежная активация молекулярных фрагментов, ассоциированных с повреждениями (DAMP), приводит к обильному высвобождению интерлейкинов (ИЛ-1, ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-18). Данный процесс имеет отражение во всех тканях организма, включая костный мозг. Это, с одной стороны, может являться триггерным фактором для развития аутоагрессии Т-лимфоцитов с последующей их олигоклональной экспансией, как было описано выше. С другой стороны, окислительный стресс, как одно из звеньев любого воспалительного процесса, может играть роль в развитии теломерной дисфункции через прямое повреждение/изнашивание концевых фрагментов ДНК. Наконец, процесс воспаления сопровождается высвобождением большого количества клеточных микровезикул и экзосом. Этот механизм влечет за собой нарушение метаболизма и пролиферации клеток. Более того, появляются данные о блокировании остеогенной дифференцировки ГСК и подавлении функции *TET2* при сверхэкспрессии микро-РНК (*miR-144-3p*) [51].

Продолжается изучение изменений стромального микроокружения, как фактора, влияющего на развитие и течение АА. Показано, что нарушение дифференцировки ранних предшественников стромального микроокружения у больных АА (замедление скорости дифференцировки в фибробласты, остеобласты, адипоциты), по сравнению со здоровыми донорами, ограничивает пролиферативный потенциал ГСК. Также отмечается снижение эндостальных, сосудистых и периваскулярных клеточных элементов. Имеются отличия в скорости роста и дифференцировки мультипотентных мезенхимальных

стромальных клеток у больных с нетяжелой (НАА) и тяжелой апластической анемией (ТАА) [44; 71].

Генетическая нестабильность, вероятно, играет одну из основных ролей в патогенезе АА и может быть связана с развитием хромосомных aberrаций, появлением клонального кроветворения. Центральной проблемой при долгосрочном наблюдении за больными АА является «клональная эволюция», развивающаяся в 15% случаев, с последующим переходом в МДС, ОМЛ или пароксизмальную ночную гемоглобинурию (ПНГ). Следует отметить, что клональное кроветворение в ряде случаев не может быть обнаружено в дебюте болезни в связи с гипоклеточностью костного мозга. Часто клональная эволюция ассоциирована с появлением новых цитогенетических aberrаций, таких как моносомия 7, трисомия 8 и других, но не всегда констатируется прогрессирование в МДС/ОМЛ, т.к. возможно сосуществование клонального кроветворения со здоровыми клетками костного мозга в процессе течения АА [19].

В случае с ПНГ, клональное кроветворение зачастую можно выявить уже в дебюте болезни (детекция ПНГ-клона среди эритроцитов, моноцитов, гранулоцитов) [19]. В процессе ответа на лечение и восстановления кроветворения нередко можно наблюдать развитие ПНГ-синдрома (увеличение ПНГ-клона, клинико-лабораторная картина гемолиза), а в 17-19% случаев может быть диагностирована классическая ПНГ [1].

Одиночные или множественные соматические мутации могут влиять на функционирование остаточного гемопоэза при АА. Разработка новых методик для изучения генома человека, таких как определение однонуклеотидных полиморфизмов (SNP-As), секвенирование нового поколения (NGS), полноэкзомное секвенирование (WES), позволяет выявлять и анализировать влияние соматических мутаций у больных АА на течение болезни (тяжесть, ответ при проведении ИСТ, вероятность клональной трансформации в МДС/ОМЛ/ПНГ). Kulasekararaj и соавторы продемонстрировали связь выявленных соматических мутаций (частота обнаружения 19%; преобладали *ASXL1*, *DNMT3A*, *BCOR*) с высокой частотой трансформации в МДС (40%) [74]. В



исследовании Tetsuichi Yoshizato и соавторов соматические мутации, связанные с клональным кроветворением, были выявлены у каждого третьего больного АА. Динамика размеров клонов была различная для разных мутаций. Клоны с мутациями *DNMT3A* и *ASXL1* имели тенденцию к увеличению в динамике и были связаны с плохим ответом на ИСТ, в то время как отсутствовала прогрессия клонов с мутациями *BCOR/BCORL1* и *PIGA*, что было связано с хорошим ответом на лечение [73].

В целом соматические мутации, сопряженные с клональным гемопоэзом, можно разделить на две группы. Первая группа представлена мутациями (*DNMT3A*, *ASXL1*, *JAK3*, *RUNX1*, *TP53*, *CSMD1* и другие), сопряженными с клональным гемопоэзом с неопределенным потенциалом (clonal hematopoiesis of indeterminate potential - CHIP), клональными цитопениями неясного значения (clonal cytopenia of undetermined significance – CCUS) и развитием различных миелопролиферативных новообразований [97]. Результаты основных исследований в этой области подтверждают, что вовлечение именно этих генов может служить предиктором плохого ответа на лечение и развития вторичного МДС/ОМЛ. Однако, данные мутации выявляются не так часто у больных АА. Так, в исследовании Babushok и соавторов сообщалось о выявлении данных мутаций только в 9% случаев [34].

Ко второй группе относят мутации, ответственные за клональный гемопоэз, сопряженный с развитием приобретенной аплазии костного мозга. Наиболее изученная мутация в гене *PIGA* обуславливает дефектный биосинтез гликозилфосфатидилинозитола и является этиологическим фактором появления ПНГ-клона [98]. Мутации *PIGA* и *BCORL1* обычно не обнаруживаются при других видах клонального гемопоэза, за исключением классической ПНГ, и уникальны для АА. Вероятно, они косвенно также влияют на развитие Т-клеточной агрессии при развитии заболевания [19].

Отдельного внимания заслуживает связанный с возрастом клональный гемопоэз (Age-related clonal hematopoiesis - ARCH). Клоны ARCH, вероятно, вносят существенный вклад в предраковое состояние у возрастных больных, что

может объяснить возрастающую частоту трансформации в МДС из АА в старшей группе больных. Проведение секвенирования (NGS) не входит в список необходимых методов обследования у больных в дебюте АА, т.к. его прогностическая роль пока еще до конца не определена, а исследование трудоемкое [5]. Данное исследование является обязательным для проведения дифференциальной диагностики с конституциональными аплазиями костного мозга (анемия Фанкони (АФ), ВД, анемия Даймонда-Блекфана, синдром Швахмана-Даймонда) и с заболеваниями, ассоциированными с мутациями в зародышевой линии (*GATA2*, *MDM4*, *DAD2* и др.) [66].

Количественно нейтральная потеря гетерозиготности короткого плеча 6 хромосомы (6p CN-LOH), которое является областью локализации главного комплекса гистосовместимости (МНС), может приводить к иммунному «бегству» гемопоэтических клеток и вносить вклад в патогенез АА, т.к. отсутствие мишеней для атаки клеточного клона с 6p CN-LOH дает преимущество в выживании [10]. Выявление 6p CN-LOH является высокоспецифичным тестом, позволяющим выделить больных с иммуноопосредованной АА, и достоверно исключить больных с врожденной костномозговой недостаточностью. Важно отметить, что отсутствие ПНГ-клона и 6p CN-LOH не исключают иммунный генез аплазии костного мозга [92].

Полиморфизмы в генах HLA I-класса могут вызывать клональную экспансию Т-лимфоцитов и сопряжены с высоким риском прогрессии АА. Идентифицированные мутации в генах HLA I-класса (HLA-A \* 33.03, HLA-A \* 68.01, HLA-B \* 14: 02 и HLA-B \* 40: 02) могут объяснить связь наследственных аномалий в кроветворных клетках и клональной эволюции в естественном течении заболевания. Также к развитию аутоагрессии против ГСК могут приводить и точечные мутации в генах HLA II-класса [19].

Помимо клонального кроветворения и наличия соматических мутаций, причиной появления внутренних дефектов клеток предшественников гемопоэза, которые могут вносить значительный вклад в развитие АА, рассматривается укорочение теломерных районов ДНК, которое можно обнаружить у 5-25%

больных [15; 24; 72; 96]. Ядродержащие клетки крови имеют самые короткие теломеры среди тканей человека. Неудивительно, что нарушение поддержания ДТ наиболее часто вызывает нарушение нормального гемопоэза.

Причин возможного укорочения теломер у больных АА несколько. Во-первых, это прямое повреждение ДНК активными формами кислорода в процессе воспаления, радиацией, токсинами. За счет сложных процессов репарации теломерной ДНК она сверхчувствительна к окислительному стрессу, который также вызывает ингибирование теломеразы и других, связанных с ней, комплексов. Воздействие окислительного стресса на изменение ДТ показано в скелетных мышцах на лабораторных моделях [77; 91]. Также выявлена зависимость содержания окислительно-модифицированных липопротеидов низкой плотности от изменения ДТ [2].

Во-вторых, в условиях сниженного пула клеток предшественников гемопоэза, оставшиеся CD34+ клетки увеличивают свою митотическую активность, что приводит к более быстрому истощению теломер в единицу времени [37]. Этот процесс носит название «пролиферативного стресса». По этой же причине короткая ДТ может определяться при различных синдромах конституциональной недостаточности костного мозга (АФ, анемия Даймонда-Блекфана, синдром Швахмана-Даймонда). Характерными примерами данного процесса является снижение ДТ в течении года после выполнения аллогенной и аутологичной трансплантации ГСК (алло-ТГСК / ауто-ТГСК), а также после проведения высокодозной химиотерапии [96].

Третьей причиной снижения ДТ у больных АА могут являться мутации в генах теломеразного и прочих комплексов (шелтеринового, CST). Так, мутации в *TERT* можно обнаружить у 10% больных. В тоже время в отличие от ВД, при идиопатической апластической анемии (ИАА) ген *DKC1* вовлечен крайне редко [96]. Помимо классических мутаций, выявляемых при теломеропатиях, у больных АА в части случаев возникают поломки в генах, кодирующих белки, которые участвуют в репарации ДНК, таких как *ATM*, *ATR*, *BRCA1*, *BRCA2*. Ассоциация данных поломок с другими мутациями теломеразного, шелтеринового и CST-

комплексов усугубляет костномозговую недостаточность у больных, как ВД, так и АА [36].

Схематичное изображение патогенеза АА представлено на Рисунке 4.

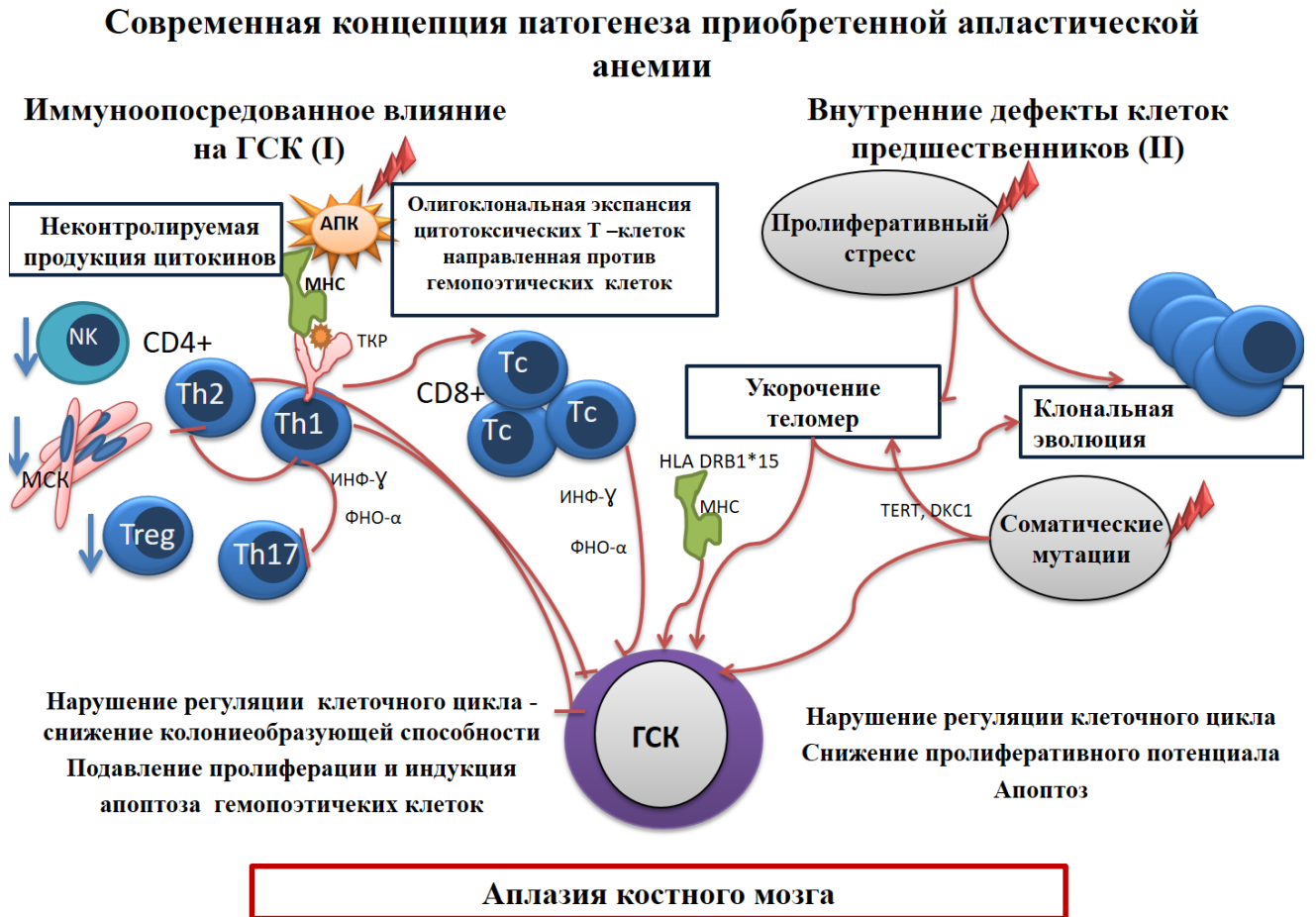


Рисунок 4 - патогенез приобретенной апластической анемии

У всех больных АА или гипопластическим МДС следует рассматривать возможность развития теломеропатии. Тестирование также следует проводить у больных не соответствующим критериям диагноза АА, но имеющих длительную, необъяснимую другими причинами, цитопению (нетипичное течение идиопатической тромбоцитопенической пурпуры, макроцитарной анемии) или гипоцеллюлярный костной мозг [96].

#### 1.4. Подходы к лечению апластической анемии

Исходя из патогенеза болезни, двумя основными методами терапии больных АА являются: проведение комбинированной ИСТ (сочетание антитимоцитарного глобулина (АТГ) и циклоспорина-А (ЦС)), направленной на подавление аутоагрессии по отношению к собственным ГСК; выполнение алло-ТГСК с целью «смены» неэффективного кроветворения реципиента. Действие АТГ, являющегося поликлональным иммуноглобулином G (IgG), заключается в подавлении как Т-лимфоцитов (действие против мембранных антигенов CD2, CD3, CD4, CD5, CD8, CD11, CD11a, CD18, CD25, CD2, CD45, HLA-DR), так и В-лимфоцитов, NK-клеток и моноцитов. Помимо прямого цитотоксического действия, направленного против Т-лимфоцитов, антитимоцитарный глобулин регулирует выброс ростовых факторов, продукцию ИЛ-1, 2 и 6, некоторых других цитокинов, стимулирует клетки-предшественники гемопоэза и индуцирует апоптоз Т-лимфоцитов, активированных ИЛ-2. ЦС является циклическим декапептидом, грибковым дериватом, выделенным из *Tolyocladium inflatum*. Он способен блокировать секрецию ИЛ-2 через подавление кальциневрина, чем мешает активации и клональной экспансии Т-лимфоцитов [38; 39].

Добавление к стандартной ИСТ колониестимулирующих факторов, глюкокортикостероидов, препаратов эритропоэтина не увеличило частоту общего ответа у больных АА, а их назначение было сопряжено с широким спектром осложнений, в связи с чем назначение этих групп лекарственных средств неоправданно [17]. Добавление других иммуносупрессантов, таких как циклофосфамид или сиролимус, было сопряжено с тяжелой токсичностью, что также не позволило повысить эффективность при проведении терапии [66]. Спленэктомия остается возможным подходом к лечению, но практически не применяется на сегодняшний день в связи с малой эффективностью и необходимостью проведения оперативного вмешательства в условиях панцитопении. В основном, спленэктомия используется для проведения

дифференциальной диагностики в сложных клинических ситуациях (в первую очередь для исключения лимфопролиферативных заболеваний) [5; 66].

Применение агониста рецепторов тромбопоэтина (ТПО) элтромбопага изначально рассматривалось как «терапия спасения» для больных АА, рефрактерных к лечению. Позже было показано, что добавление элтромбопага в первую линию ИСТ (АТГ + ЦС) позволяет повысить вероятность общего ответа до 94% [27]. Действие элтромбопага заключается во взаимодействии с трансмембранным доменом рецептора ТПО. Он способен активировать сигнальные пути даже в присутствии  $INF-\gamma$  (ключевого провоспалительного цитокина, участвующего в подавлении пролиферации нормальных ГСК), не связываясь с ним. Рецепторы ТПО имеются на стволовых клетках костного мозга, в связи с чем их активация способствует стимуляции всех линий гемопоэза [41]. Настороженность вызывает возможная стимуляция клонального кроветворения при применении агонистов ТПО, в связи с чем необходим тщательный мониторинг цитогенетического статуса при использовании препарата и получение долгосрочных результатов проводимых исследований [27].

Выполнение алло-ТГСК в первой линии терапии рассматривается у детей и у взрослых в возрасте до 40 лет с тяжелой формой болезни, неотягощенным соматическим статусом и наличием полностью совместимого родственного донора [5]. С увеличением возраста больных, данный агрессивный подход не оправдан в связи с отсутствием преимуществ в общей выживаемости больных АА при явной высокой токсичности процедуры [17]. Текущие протоколы кондиционирования (пониженной интенсивности) и разработка новых подходов к сопроводительной терапии позволяют рассматривать выполнение алло-ТГСК от неродственного или гаплоидентичного донора в последующих линиях терапии, например, при рефрактерности к ИСТ [17; 66].

### **1.5. Влияние изменения длины теломер на эффективность лечения апластической анемии**

На сегодняшний день комбинированная ИСТ позволяет достичь 90% длительную выживаемость больных АА. Однако остается группа рефрактерных больных к стандартной ИСТ (около 20-30%), что определяет необходимость дальнейшего изучения патофизиологических механизмов развития рефрактерности при АА, разработки новых методов терапии [5; 68].

За последнее десятилетие в нескольких крупных исследованиях показан ряд факторов, влияющих на достижение ответа на лечение (возраст, интервал «установление диагноза – начало терапии», абсолютное количество нейтрофильных форм лейкоцитов и ретикулоцитов, наличие ПНГ-клона и некоторых хромосомных aberrаций и другие). В то же время, накопленных данных недостаточно для достоверного прогнозирования результатов лечения, что требует выделения новых маркеров рефрактерности к ИСТ с целью выбора альтернативных методов лечения [10; 52].

ДТ может рассматриваться как независимый фактор прогноза ответа на ИСТ. Это было продемонстрировано в нескольких крупных исследованиях [15; 55; 72; 80]. В одном из первых исследований в этой области группой ученых под руководством Phillip Scheinberg в 2010 году было показано, что укорочение ДТ лимфоцитов больных ТАА (ДТ была меньше, чем у 50% испытуемых в выборке) было связано со снижением общей выживаемости, высокой частотой развития рецидива и появлением новых патологических клонов, в том числе и с моносомией 7 [15].

Японские ученые во главе с Atsushi Narita выделяют отсутствие клона ПНГ и укорочение теломер как два основных фактора прогноза плохого ответа на лечение у больных АА [54]. Аналогичные данные получены и в исследованиях российской группы под руководством Д.А. Кулагина. В группе больных АА с меньшей ДТ гранулоцитов отмечалось снижение общей выживаемости и

повышение частоты трансформации в МДС/ОМЛ. В группе больных с большей ДТ не было зафиксировано ни одного случая развития МДС/ОМЛ. Частота развития ПНГ и рецидивов АА не были связаны с ДТ [47].

ДТ является фактором, влияющим на общую выживаемость не только при проведении ИСТ, но и при выполнении алло-ТГСК у больных ТАА. При этом ДТ именно лейкоцитов донора, а не реципиента коррелировала с выживаемостью [90]. Основными причинами повышенной смертности в первый год после алло-ТГСК являются несостоятельность трансплантата, острая реакция трансплантат против хозяина (ОРТПХ), инфекционные осложнения. В долгосрочной перспективе у больных с короткими теломерами возрастает риск развития вторичного рака и органной недостаточности [56].

Рецидив АА развивается в 20-40% случаев после проведенной ИСТ [44]. Помимо влияния на эффективность ИСТ и общую выживаемость, укорочение ДТ может увеличивать вероятность развития рецидива. Это было продемонстрировано в более ранних исследованиях [15].

Активно изучается ассоциация уменьшение ДТ с развитием различных клональных осложнений. При анализе 200 больных с ТАА, проходивших лечение на базе национального института здоровья США, получены данные о 5-6 кратном увеличении частоты развития клональной эволюции в целом, и развитии моносомии 7 в частности, при исходном укорочении теломер [15]. Аналогичные выводы были сделаны и в крупном исследовании Calado R.T. при анализе 183 больных АА, которым была проведена ИСТ. При ПЦР (полимеразная цепная реакция) анализе лейкоцитов крови ДТ была сопоставима с группой здорового контроля (n=175). Укорочение теломер было выявлено у больных, у которых в последующем чаще констатировался клональный гемопоэз (были выявлены хромосомные aberrации, в том числе моносомия 7 и комплексные нарушения кариотипа; развитие МДС и ОМЛ). При дополнительно проведенном спектральном кариотипировании (SKY) отмечено, что больные с короткими теломерами имеют выраженную хромосомную нестабильность. Что интересно, в этой же работе у 30 доноров с выявленными мутациями в генах теломеразы, при



культивировании лейкоцитов в колониестимулирующей среде, было отмечено увеличение доли анеуплоидных клеток и хромосомных aberrаций (моносомия 7, трисомия 8) [72]. В более свежих исследованиях также прослеживается четкая связь между короткими теломерами и высокой частотой развития клональной эволюции на фоне ИСТ [15; 54; 80].

Как отмечено выше, в общей группе больных АА длина теломер может быть сопоставима со здоровым контролем и ее снижение наблюдается в 5-25% случаев [15; 24; 72]. По данным крупного исследования S. Miwata, в котором проанализировано 107 больных с идиопатической АА, укорочение теломер (стандартное отклонение  $<-1,71$ ), по сравнению со здоровым контролем соответствующего возраста, наблюдалось у 23% больных. Однако, при таком снижении степень укорочения теломер, как правило, не достигает значений, которые определяются у больных с наследственными синдромами костномозговой недостаточности, а ультракороткие теломеры (ДТ меньше первого перцентиля нормы), определялись только в 6% случаев [24].

Маловероятно, что ДТ является самостоятельным достоверным маркером, позволяющим диагностировать поздние неблагоприятные события, такие как рецидив и клональная эволюция, но уже само по себе укорочение теломер ведет к нестабильности генома и, тем самым, вносит вклад в появление новых патологических клонов [67].

Стоит отметить, что появляются данные, указывающие на неравномерное уменьшение ДТ в различных клеточных популяциях у больных АА. В исследовании Wang показано, что ДТ в CD8+ супрессорных Т-лимфоцитах значительно меньше по сравнению со здоровым контролем, в то время как значительного укорочения теломер в CD4+ клетках не выявлено. Также, ожидаемо увеличивалась экспрессия костимулирующих сигналов CD28+, CD158+ на CD8+лимфоцитах больных АА, что указывает на их повышенную активность. Данная диспропорция свидетельствует о ведущей роли клеточного иммунитета в развитии ТАА, а именно гиперфункции аутоиммунных Т-клеток [93]. Данный феномен также отражает избыточную пролиферацию Т-супрессоров с

уменьшением в них ДТ при развитии таких аутоиммунных заболеваний, как системный склероз, системная красная волчанка, ревматоидный артрит. Также на группе из 22 больных системной красной волчанкой было показано, что ДТ в моноцитах (CD14+) в наибольшей степени отличалась от таковой у здоровых доноров, в то время как изменения ДТ в различных популяциях лимфоцитов (CD4+, CD8+, CD19+) были незначительными [79].

Продолжается изучение эффективности использования различных препаратов при лечении больных с теломеропатиями (ВД и другие) и приобретенной АА, ассоциированной с укорочением теломер. Имеющиеся данные указывают на неудачу при использовании элтромбопага у больных с теломеропатиями и конституциональными АА, что подразумевает отсутствие его влияния на ДТ [33].

С середины прошлого века был получен опыт успешного применения андрогенов у небольшой подгруппы больных АА. Однако, оставалось неясным избирательное действие препаратов у разных больных, сопоставимых по остальным критериям. С начала XXI века началось активное изучение влияния мужских половых гормонов на изменение ДТ. В 2009 году в рамках исследования на базе национального института здоровья США *in vitro*, используя лимфоциты периферической крови здоровых людей, было показано воздействие андрогенов на увеличение экспрессии *TERT* и, как следствие, на активность теломеразы и удлинение теломер. В лабораторных условиях было продемонстрировано повышение ферментативной активности теломеразы не только в крови, но и в CD34+ клетках костного мозга. Помимо этого, было доказано, что применение андрогенов эффективно в клетках с гетерозиготными мутациями в генах теломеразного комплекса (в первую очередь в *TERT*) [69]. Успешное применение андрогенов в терапии ВД было продемонстрировано в нескольких исследованиях на группах взрослых и молодых больных и остается единственной эффективной нетрансплантационной опцией [26; 60]. Посредством замедления скорости истощения теломер, андрогены могут улучшить не только кроветворение, но и функцию других органов [96]. Механизм действия даназола на увеличение

активности теломеразы изучен недостаточно. Предполагается, что обратная связь между концентрацией эстрадиола и ДТ, а также вызываемая даназолом гипоэстрогения, являются одним из возможных механизмов воздействия андрогенов на теломеры [16].

Низкомолекулярный активатор теломеразы ТА-65, полученный из корня астрагала перепончатого, увеличивал среднюю длину теломер, изменяя содержание и способ доставки *mTERT*, что было продемонстрировано на мышинных моделях. Однако, клиническая значимость для применения данной молекулы у больных с заболеваниями крови и раком весьма ограничена. Наиболее перспективным направлением является применение методов генной терапии, направленных на увеличение экспрессии *TERT*. Следует помнить, что необходим тщательный и осторожный подход к планируемым разработкам, с обязательным учетом возможного достижения нецелевых эффектов, в первую очередь стимуляции канцерогенеза [49; 94].

На данный момент отсутствуют крупные исследования по эффективности включения элтромбопага и других агентов в схему ИСТ у больных АА с короткими теломерами. Также необходимо исследование изменения ДТ в динамике.

Актуальность данной работы определяет необходимость дальнейшего изучения влияния ДТ на тяжесть и характер течения АА, что может позволить оптимизировать алгоритмы лечения.

## **1.6. Методы измерения длины теломер.**

На сегодняшний день существует несколько методик определения ДТ. Flow-FISH (сочетание проточной цитометрии и флуоресцентной гибридизации *in situ*) наиболее точный метод измерения. Его чувствительность достигает 100%, а специфичность 93%. В его основе лежит связывание теломерной последовательности «TTAGGG» с пептидной нуклеиновой кислотой (PNA; peptid

nucleic acid), флуоресцентно меченной «СССТАА», с дальнейшим цитофлуоретрическим исследованием и анализом полученных данных. Этот тип анализа позволяет установить точное значение ДТ, а не проводить относительное сравнение «более длинных» и «более коротких» дескрипторов. Определение ДТ ниже первого перцентиля по сравнению с контрольной группой соответствующего возраста является диагностически значимым при установке диагноза ВД и других теломеропатий. Методика flow-FISH позволяет проводить анализ в различных популяциях без предварительного сортирования. Как показали предыдущие исследования, анализ лимфоцитов более точен, по сравнению с анализом гранулоцитов [96]. Более того, количество гранулоцитов резко снижено у больных АА и клеточность в исследуемых образцах зачастую недостаточная для проведения исследования.

Методика ПЦР в реальном времени основана на использовании праймеров к С- и G-обогащенным участкам теломер, что позволяет провести количественную оценку ДТ. Достоинствами методики являются возможность исследования образца с низким количеством ДНК и высокая пропускная способность. Однако, не существует стандартизованных протоколов для выполнения методики, что ограничивает в сопоставлении полученных данных с результатами других исследований. Также возникают трудности при анализе ультракоротких теломер [30].

С целью точного перевода относительной длины теломер (ОДТ) в абсолютную длину теломер (АДТ) необходимо сопоставление двух методов (например flow-FISH и ПЦР) [4; 81].

Анализ терминальных рестрикционных фрагментов (TERF) долгое время являлся золотым стандартом и единственной возможностью измерения абсолютной ДТ. Использование блот-гибридизации по Саузерну является трудоемкой методикой, а ее воспроизводимость – низкой. Сравнение результатов из разных лабораторий затруднено, так как изначально не стандартизированы пары ферментов рестрикции и исходное количество анализируемого материала ДНК. Также проведение исследования сопряжено с использованием

радиоактивных меток. На сегодняшний день его используют в основном с целью методических разработок и контроля в других тестах [4; 9].

Анализ длины одиночной теломеры (Single Telomere Length Analysis - STELA) основан на использовании специального линкера в сочетании с праймером к гуаниновым триплетам («GGG») с формированием индивидуального ампликона для каждой отдельной теломеры в процессе ПЦР. Однако не все хромосомные концы имеют подходящую последовательность для создания уникальных праймеров. Методика трудоемка и сложна в исполнении [18].

Quantitative fluorescence (Q-FISH) – определение ДТ в метафазных хромосомах при помощи FISH и количественного измерения флуоресценции. Используется PNA, которая специфически гибридизуется с денатурированной ДНК теломер. Флуоресцентный сигнал может быть измерен по отношению к стандартам известной ДТ при помощи программного обеспечения. Основным недостатком этого метода – невозможность измерения теломер в терминально-стареющих, аберрантных и неделящихся клетках, а также клетках с низким митотическим индексом. Возможно одновременное проведение кариотипирования [42].

Таким образом, более детальное изучение механизмов влияния внутренних дефектов ГСК на патогенез АА, а именно изменение ДТ с использованием метода flow-FISH, позволит выделить новые факторы прогноза ответа на лечение и оптимизировать протоколы терапии.

## **Глава 2. Материалы и методы.**

### **2.1. Характеристика больных**

С октября 2019 года по июль 2022 года в исследование было включено 45 больных с впервые установленным диагнозом ИАА. Больные проходили обследование и лечение в следующих подразделениях Федерального Государственного Бюджетного Учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства Здравоохранения Российской Федерации:

1. Отделение химиотерапии гемобластозов и депрессий кроветворения с блоком трансплантации костного мозга и гемопоэтических стволовых клеток (заведующая отделением - к.м.н. Фидарова З.Т.).

2. Дневной стационар онкологии и химиотерапии гемобластозов и депрессий кроветворения (заведующая отделением - к.м.н. Лукьянова И.А.).

3. Отделение редких болезней (заведующая отделением - д.м.н. Лукина Е.А.).

4. Отделение гематологии и химиотерапии острых лейкозов и лимфом (заведующая отделением - к.м.н. Алешина О.А.).

Исследование было выполнено на базе лабораторий:

1. Основная часть исследования была выполнена в лаборатории иммунофенотипирования клеток крови и костного мозга (заведующая лабораторией – д.м.н. Гальцева И.В.).

2. Работа с контрольными клеточными культурами проводилась в лаборатории физиологии кроветворения (заведующая лабораторией - д.б.н. Дризе Н.И.).

3. Определение абсолютной длины теломер методом ПЦР проводилось в лаборатории фармакогеномики ФГБУН «Институт химической биологии и

фундаментальной медицины Сибирского отделения РАН» г. Новосибирска (заведующий лабораторией - д.б.н. Филипенко М.Л.).

4. Освоение методики определения относительной длины теломер методом flow-FISH и работа с контрольными клеточными культурами проводились в лаборатории клеточной иммунологии и иммуногенеза «НМИЦ ДГОИ им. Д. Рогачева» Министерства Здравоохранения Российской Федерации (заведующий лабораторией – к.м.н. Попов А.М.).

Лабораторные исследования, необходимые для верификации диагноза, были выполнены на базе следующих подразделений ФГБУ «НМИЦ гематологии» Министерства Здравоохранения Российской Федерации:

1. Лаборатория кариологии (заведующая лабораторией - к.м.н. Обухова Т.Н.).

2. Централизованная клиничко-диагностическая лаборатория (заведующая лабораторией - к.м.н. Двирнык В.Н.).

3. Патологоанатомическое отделение (заведующая лабораторией - д.б.н. Ковригина А.М.).

4. Статистическая обработка данных выполнена в информационно-аналитическом отделе (руководитель отдела, к.т.н. Куликов С.М.).

Критерии установления диагноза АА соответствовали национальным клиническим рекомендациям по диагностике и лечению апластической анемии (2019 год) [5].

Критерии диагноза АА:

1) Цитопенический синдром (трехростковая цитопения): гемоглобин <110 г/л, нейтрофилы <2,0 x 10<sup>9</sup>/л, тромбоциты <100 x 10<sup>9</sup>/л);

2) Уменьшение клеточности костного мозга <25 % (по отношению к возрастной норме) или клеточность от 25 до 50% при содержании миелоидных элементов (т.е. исключая лимфоциты, плазматические клетки) <30% и отсутствие мегакариоцитов по данным пунктата костного мозга (миелограммы);

3) Аплазия костного мозга (преобладанием жирового костного мозга) в биоптате подвздошной кости (билатеральная трепанобиопсия).

Степень тяжести АА определяли на основании критериев:

- 1) Нетяжелая АА (НАА): гранулоцитопения  $>0,5 \times 10^9/\text{л}$ ;
- 2) Тяжелая АА (ТАА): гранулоцитопения  $<0,5 \times 10^9/\text{л}$ ;
- 3) Сверхтяжелая АА (СТАА): гранулоцитопения  $<0,2 \times 10^9/\text{л}$ ;

При определении степени тяжести АА выполнялось не менее трех анализов периферической крови до начала ИСТ.

Дифференциальная диагностика проводилась согласно национальным клиническим рекомендациям по диагностике и лечению апластической анемии (2019 год) [5].

При ИАА, как правило, отсутствуют хромосомные аномалии, характерные для других заболеваний (транслокация (9;22), транслокация (15;17), инверсия 16, транслокация (8;21), делеция 5q, моносомия/делеция 7, вовлечение гена EVI и другие). При цитогенетическом исследовании, проведенном до начала ИСТ, у 5 больных были обнаружены хромосомные aberrации, такие как трисомия 8 и делеция длинного плеча 13 хромосомы. В одном случае также ретроспективно была выявлена моносомия 7 по данным FISH-исследования, но уже после проведенного курса ИСТ. Во всех случаях не было выявлено признаков миелодисплазии по данным миелограммы и гистологической картины трепанобиоптата костного мозга.

У всех больных, включенных в исследование, ранее не проводилась комбинированная ИСТ с использованием АТГ. До включения в исследование циклоsporин получали 14 больных (медиана длительности приема 4 месяца), однако, ни у кого не был достигнут ответ на лечение. Агонисты тромбопоэтиновых рецепторов – элтромбопаг – до начала лечения получали 6 больных, максимальная длительность приема - 6 месяцев. Эффекта от терапии не было. Препарат был отменен до проведения курса комбинированной ИСТ. У всех больных было получено согласие на включение в исследование. Исследование было одобрено локальным этическим комитетом Федерального Государственного Бюджетного Учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства Здравоохранения Российской Федерации.



Первичная характеристика больных отображена в Таблице 1.

Таблица 1 - Клинико-лабораторная характеристика больных апластической анемией, включенных в проспективное исследование.

Клинико-лабораторная характеристика больных АА в дебюте (n=45)		
Клинико-лабораторные параметры	Значения у больных АА	Референсные значения
Пол – n (%)		
Мужчины	24 (54%)	
Женщины	21 (46%)	
Возраст на момент установки диагноза – лет		
Медиана (диапазон)	29 (17-64)	
17-30 (%)	25 (56%)	
31-45 (%)	11 (24%)	
>45 (%)	9 (20%)	
Время между началом заболевания и установлением диагноза – мес.		
Медиана (диапазон)	3 (1-37)	
Тяжесть АА - n (%)		
НАА	23 (51%)	
ТАА	13 (29%)	
СТАА	9 (20%)	
ПНГ-клон - n (%)		
Выявлен	35 (78%)	
Не выявлен	10 (22%)	
Размер ПНГ-клона среди гранулоцитов крови – n (%)	n=35	
<1%	16 (46%)	
1-10%	9 (26%)	
11-50%	7 (20%)	
>50%	3 (8%)	
CD34+ клетки в костном мозге <sup>1</sup> (%)	n=34	
Медиана (диапазон)	0,16 (0-0,88)	<2%
Хромосомные aberrации, выявленные до ИСТ – n (%)		
Не выявлены (нормальный кариотип)	37 (82,5%)	
Неклональные нарушения кариотипа <sup>2</sup>	3 (7%)	
Моносомия 7 <sup>3</sup>	1 (2,5%)	
Трисомия 8	2 (4%)	
Делеция 13q	2 (4%)	

Маркеры вирусных гепатитов – n (%)		
Не выявлены	36 (80%)	
Anti-HBc	4 (9%)	
Anti-HCV	3 (7%)	
Anti-HAV IgG/M	2 (4%)	
Гемоглобин, г/л		
Медиана (диапазон)	72 (52-100)	
Мужчины	71,5 (61-100)	130-160
Женщины	74 (52-93)	120-140
Тромбоциты, $\times 10^9/\text{л}$		
Медиана (диапазон)	15 (3-37)	180-360
Нейтрофилы, $\times 10^9/\text{л}$		
Медиана (диапазон)	0,65 (0,03-2,56)	2-5,5
Ретикулоциты, $\times 10^9/\text{л}$ ;		
Медиана (диапазон)	27,95 (4,3-95,9)	20-100
Ферритин сыворотки, нг/мл		
Медиана (диапазон)	779,7 (8,4-2052)	23,9-336,2
ЛДГ, Ед/л		
Медиана (диапазон)	308 (102-704)	208-378

<sup>1</sup> – подсчет CD34+ клеток в костном мозге проводился методом проточной цитометрии и определялся как процент CD34+ миелобластов от всех CD45+ клеток.

<sup>2</sup> – неклональные нарушения кариотипа: выявленные хромосомные aberrации в 1 или 2 из 20 митозов при стандартном цитогенетическом исследовании (СЦИ) и не подтвержденные FISH-исследованием.

<sup>3</sup> – у одного больного исходно было проведено СЦИ, по данным которого хромосомные aberrации обнаружены не были. Однако, при ретроспективном FISH-исследовании, которое было выполнено после проведения курса ИСТ, была выявлена моносомия 7.

Больные получали лечение по стандартному протоколу ИСТ, включающему применение лошадиного АТГ (20 и 40 мг/кг/сут в течение 5 и 4 дней соответственно) и ЦС (5-10 мг/кг в сутки с 14 дня после АТГ в течение 2 лет с подбором индивидуальной дозировки в зависимости от концентрации препарата в сыворотке крови) [5]. Доза АТГ 20 мг/кг/сут была применена у 34 (76%) больных, у 9 (20%) - 40 мг/кг/сут. Двое больных (4%) были сняты со стандартного протокола ИСТ (1 больная – анафилактическая реакция на введение АТГ, 1 больная – гематологическое улучшение (ГУ) на фоне монотерапии ЦС на момент госпитализации перед курсом терапии АТГ). У 8 больных (18%) с первого дня

курса был добавлен элтромбопаг в дозе 150 мг/сут в непрерывном режиме в течение не менее 6 месяцев. Согласно протоколу лечения АА, больным, у которых было достигнуто ГУ с независимостью от трансфузий компонентов крови к 3-6 месяцу, был продолжен прием циклоспорина в течение двух лет. В случае отсутствия ответа к 3-6 месяцу проводился второй курс комбинированной ИСТ (АТГ+ЦС) (n=9). Трём больным второй курс АТГ был проведен с включением в схему терапии элтромбопага, а двум больным элтромбопаг был добавлен к терапии ЦС без проведения второго курса. Всем больным при развитии клональных осложнений на фоне лечения, таких как МДС, выявление новых хромосомных aberrаций, терапия элтромбопагом была прекращена. В дебюте заболевания хелаторная терапия не проводилась ни у одного наблюдаемого.

Конечными точками исследования считались характеристики наступления следующих событий: достижение ответа на лечение (гематологическое улучшение (ГУ), частичная ремиссия (ЧР), полная ремиссия (ПР)), рецидив АА, трансформация в МДС, смерть больного (Таблица 2). Последний контакт, смена протокола терапии (аллогенная ТГСК) рассматривались как цензурирующие события. Начало отсчета временных интервалов проводилось от даты начала терапии.

Таблица 2 – Варианты ответа на ИСТ

Показатели гемограммы	Клинико-гематологический ответ (гематологическое улучшение)	Частичная ремиссия	Полная ремиссия
Гемоглобин	$\geq 80,0$ г/л	$\geq 100$ г/л	$\geq 120$ г/л
Гранулоциты	$\geq 1,0 \times 10^9$ /л для нетяжелой формы АА $> 0,5 \times 10^9$ /л для тяжелой и сверхтяжелой форм АА	$\geq 1,5 \times 10^9$ /л	$\geq 2 \times 10^9$ /л
Тромбоциты	$\geq 20 \times 10^9$ /л	$\geq 80 \times 10^9$ /л	$\geq 150 \times 10^9$ /л

В качестве контрольной группы было отобрано 32 доноров крови (срок от последней донации не менее 6 месяцев) и здоровых добровольцев (далее тоже доноры крови) сопоставимые по возрасту и гендерному соотношению с больными АА. У всех однократно определялись ОДТ/АДТ в мононуклеарах периферической крови. У 10 здоровых добровольцев также проводилось динамическое исследование данных параметров: на 3-й, 6-й и 12-й месяцы от начала исследования. Помимо анализа ДТ клеток периферической крови, группу контроля составили 10 доноров костного мозга, которым не проводилась предшествующая стимуляция гранулоцитопоеза ростовыми факторами. Забор костномозговой взвеси проводился во время процедуры эксфузии костного мозга. При опросе все наблюдаемые отрицали острые и хронические заболевания.

Группу сравнения составили больные АА с длительным рефрактерным течением заболевания (n=9), которым было проведено как минимум 2 курса АТГ, а длительность приема циклоспорина составила не менее 1 года. Другой группой сравнения были выбраны больные с установленным диагнозом ВД во взрослом возрасте (n=5) до назначения патогенетического лечения (Таблица 3). При установлении диагноза ВД использовались международные критерии, включающие клинические проявления, определение ДТ и мутационного статуса [22; 35; 65].

Таблица 3 – Клинико-лабораторная характеристика больных и доноров в различных группах исследования.

Параметр	Больные АА (n=45)	Группы сравнения		Контрольные группы	
		Больные АА, рефрактерные к ИСТ (n=9)	Больные врожденным дискератозом (n=5)	Доноры крови (n=32)	Доноры костного мозга (n=10)
Пол (м/ж)	24 / 21	5 / 4	3 / 2	16 / 16	4 / 6
Возраст, лет Медиана (диапазон)	29 (17-64)	34 (19-44)	26 (24-51)	32 (19-62)	23 (15-40)
Длительность болезни, мес Медиана (диапазон)	3 (1-22)	24 (16-48)	26 (9-90)	-	-
<i>Показатели периферической крови</i>					
Гемоглобин, г/л Медиана (диапазон)	72 (52-100)	67 (65-95)	76 (65-118)	(130-160)	(130-160)
Нейтрофилы, $\times 10^9/\text{л}$ Медиана (диапазон)	0,65 (0,03-2,56)	0,5 (0,15-1,37)	0,89 (0,3-1,53)	(2-5,5)	(2-5,5)
Тромбоциты, $\times 10^9/\text{л}$ Медиана (диапазон)	15 (3-37)	9 (7-29)	33 (7-71)	(180-360)	(180-360)

Все исследуемые группы были сопоставимы по возрасту и гендерному соотношению – достоверных различий не выявлено ( $p > 0,05$ ).

ОДТ и АДТ определялась у всех больных на следующих контрольных точках: до начала лечения и на фоне проведения ИСТ (+3, +6, +12, +24 месяц от первого курса АТГ) в мононуклеарах крови. Также у 20 больных в динамике исследовались ОДТ и АДТ мононуклеаров костного мозга. Дизайн исследования схематично представлен на Рисунке 5.

## Дизайн исследования

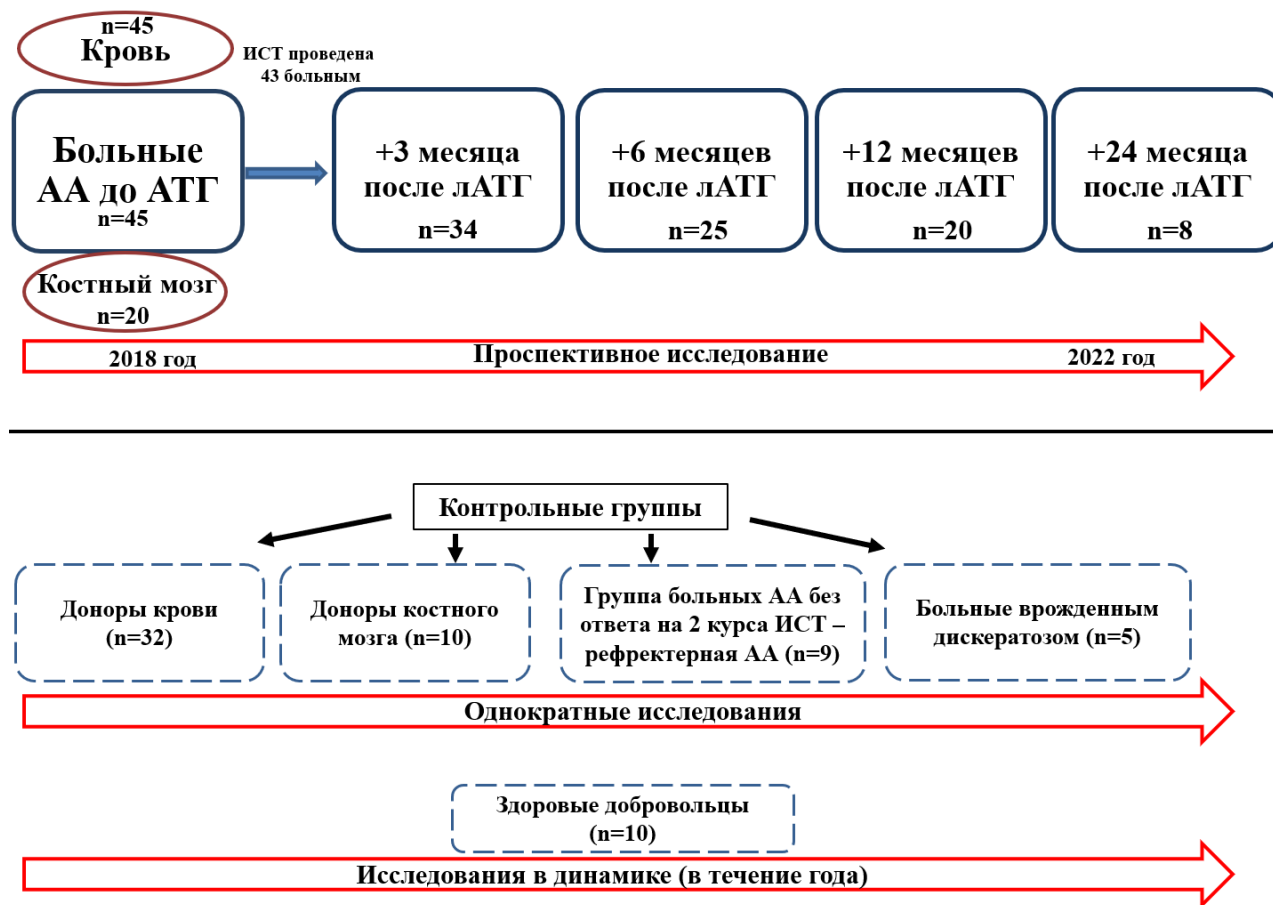


Рисунок 5 - Дизайн исследования с указанием числа больных, групп сравнения, временного регламента

### 2.2. Подготовка биоматериала для проведения исследования

Забор биологического материала осуществлялся двумя способами. Периферическая кровь больных и доноров (6 мл) набиралась в две пробирки с антикоагулянтом (гепарин). Костномозговая взвесь (2 мл) набиралась при выполнении аспирационной биопсии (стерильная пункция / пункция из подвздошной кости) в две пробирки с антикоагулянтом (гепарин).

После доставки в лабораторию, выполнялось выделение и замораживание мононуклеарной фракции:

1. В полипропиленовые пробирки объемом 15 мл добавлялось по 2 мл раствора фикола плотностью  $1,077 \text{ г/см}^3$  «Lympholyte-H» (Cedarlane, Канада).

Затем наслаивалось по 6 мл крови / костномозговой взвеси из перемешанных пробирок с гепарином.

2. Производилось центрифугирование полученных образцов ( $\times 450$  g 30 минут).

3. Полученное моноклеарное кольцо, переносили в другую пробирку объемом 15 мл. Объем до 10 мл доводился раствором CellWash (BD Biosciences, США).

4. После чего центрифугировали в течение 3,5 минут при ускорении  $\times 400$ g. Надосадочную жидкость удаляли. Клеточный осадок повторно доводили раствором CellWash до 10 мл, с последующим повторным центрифугированием (3,5 минуты при 400g).

5. Далее удаляли надосадочную жидкость. Полученный клеточный осадок переносили в пробирку типа эппендорф объемом 1,5 мл. Добавляли 200 мкл 10% раствора диметилсульфоксида и убирали образцы в морозильную камеру ( $-80^{\circ}\text{C}$ ).

При последующем исследовании проводилось одномоментное изучение всех образцов замороженных моноклеаров крови и костного мозга от одного больного или здорового добровольца.

### **2.3. Определение длины теломер методом проточной цитометрии (flow-FISH)**

Перед каждой серией измерений проводили калибровку цитометра CytoFLEX (Beckman Coulter, США) с целью поддержания требуемого выхода флуоресцентного сигнала с помощью набора FluoroSpheres 6-Peak, Sensitivity Particles (Dako, Дания).

Определение относительной и абсолютной ДТ осуществляли при помощи метода flow-FISH. Для этого использовался набор Telomere PNA Kit/FITC (Dako, Дания).

Набор содержит 4 вида растворов:

1. Раствор №1 представляет собой буфер для гибридизации и не содержит флуоресцентно-меченый зонд, что позволяет в дальнейшем анализе учитывать аутофлуоресценцию клеток;

2. Раствор №2 содержит пептидно-нуклеиновый зонд (PNA), специфичный к теломерной последовательности «TTAGGG», меченный флуоресцеина изотиоцианатом (fluorescein isothiocyanate, FITC), в буфере для гибридизации;

3. Раствор №3 представляет собой раствор для отмывки, который перед работой должен быть разведен дистиллированной водой в 10 раз;

4. Раствор №4 содержит пропидия йодид (ПЙ) и РНКазу А, который перед работой должен быть разведен дистиллированной водой в 10 раз.

В качестве контроля использовалась клеточная линия «1301» (Т-клеточный лимфобластный лейкоз) (АТСС, Великобритания) с известной и неизменяющейся длиной теломер. Клетки культивировали в суспензионной культуре в среде RPMI 1640 с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки при температуре +37 °С, 5% CO<sub>2</sub>. До использования клетки хранились при температуре -80°С в криопробирках.

Подготовка проб проводилась в течение 2-х дней.

День 1. После размораживания проб клеточные суспензии образцов испытуемых и контрольной клеточной культуры дважды отмывали с использованием раствора CellWash и центрифугирования (5 минут при 500g).

Далее производили подсчет клеточности полученных образцов на автоматическом анализаторе Abacus Junior 30 (Diatron, Венгрия). Отобрав по 1,5 млн отмытых клеток их переносили в полипропиленовые пробирки на 15 мл. Далее вносили по 1,5 млн контрольных клеток линии «1301». Доводили смесь контрольных и исследуемых клеток до 2 мл раствором CellWash.

Для дальнейшего исследования на каждый образец (смесь клеток испытуемого и контрольной линии) подготавливали по 4 пробирки типа эппендорф (А, В, С, D). В каждую пробирку вносили по 500 мкл подготовленной клеточной смеси. После чего центрифугировали в течение 5 минут при 500g с последующим удалением надосадочной жидкости.



В пробирки А и В вносили 300 мкл раствора №1. В пробирки С и D вносили 300 мкл раствора №2 из набора Telomere PNA Kit/FITC (Dako, Дания). Далее пробирки помещали в термостат «Гермит» (ДНК-технология, РФ) на 10 минут при температуре 82°C с целью денатурации ДНК. Затем перемешивали и убирали в темное место на 24 часа при комнатной температуре для гибридизации зонда и ДНК клеток.

День 2. Производилось разведение растворов №3 и №4 (Telomere PNA Kit/FITC) дистиллированной водой в соотношении 1:10.

В пробирки типа эппендорф с клетками, которые были использованы в первый день исследования, вносили по 1 мл рабочего раствора №3. Далее образцы, предварительно перемешав, перемещали в термостат на 10 минут при 40°C, с последующим центрифугированием при 500g в течение 5 минут. После удаления надосадочной жидкости, повторного добавления раствора №3 (1 мл) и перемешивания, пробирки вновь помещали в термостат на 10 минут при 40°C с последующим повторным центрифугированием в аналогичном режиме. Далее в каждую пробирку с клеточной суспензией, предварительно отобрав надосадочную жидкость, вносили по 0,5 мл рабочего раствора №4, перемешивали. Пробирки оставляли в темноте на 2-3 часа при температуре 2-8 °C. В течение этого времени содержащийся в растворе №4 пропидия йодид интеркалировал в двуцепочечную структуру ДНК клеток, в результате чего ядросодержащие клетки флуоресцировали с максимумом эмиссии 615–620 нм. РНКаза, содержащаяся в растворе, разрушала молекулы РНК, тем самым препятствуя связыванию с ними пропидия йодида.

Спустя 2-3 часа проводилось цитометрическое исследование. Анализ проводился с использованием проточного цитометра CytoFLEX (Beckman Coulter, США). Схема опыта по определению длины теломер представлена на Рисунке 6.



Рисунок 6 - Схема опыта по определению длины теломер методом flow-FISH

#### 2.4. Определение относительной длины теломер с помощью метода flow-FISH

Гейтирование (применение разных типов электронных фильтров при цитометрическом исследовании с целью анализа отдельных клеточных субпопуляций) выполняли с помощью программы Kaluza 2.1 (Beckman Coulter, США).

Определение исследуемых клеток и клеточного контроля (линия «1301») производили на точечном графике «теломерный зонд FITC» против «пропидия йодида» (Рисунок 7). Клетки линии «1301» тетраплоидны, в связи с чем их средняя интенсивность флуоресценции (СИФ) по пропидию йодиду в два раза превышала СИФ исследуемых клеток. Дополнительно пропидий йодид был

использован для выделения клеток, находящихся на момент анализа в  $G_0/G_1$ -фазе клеточного цикла.

В пробирках А и В, в которые был добавлен ранее раствор №1, не содержался теломерный зонд (PNA). Соответственно СИФ по каналу FITC низкая и отображает только собственную флуоресценцию клеточной линии «1301» и фракции клеток испытуемого (рисунок 7А). В пробирки С и D был добавлен раствор №2, содержащий комплементарный к теломерным гексаповторам ДНК-зонд (PNA). Поэтому в пробирках С и D СИФ по каналу FITC отображала не только базовую клеточную флуоресценцию, но и свечение зонда PNA, т.е. длину теломер фракции испытуемого и клеток линии «1301» (Рисунок 7Б). ДТ клеточной линии «1301» существенно превышает ДТ в клетках человека, но остается неизменной, что позволяет использовать ее в качестве контроля. По данным литературы ДТ в клетках «1301» составляет около 70 тысяч пар нуклеотидов (тыс. п.н.) [4].

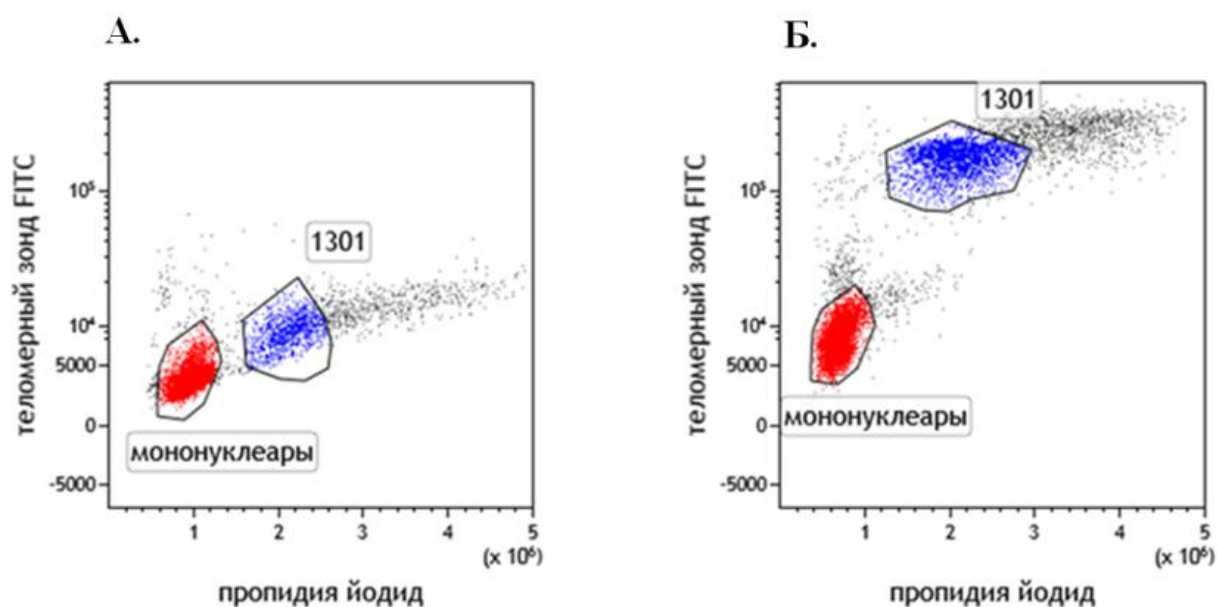


Рисунок 7 - Пример цитометрического анализа при проведении flow-FISH с целью определения

ОДТ: А. Показана флуоресценция клеток донора и контрольной клеточной культуры, инкубированных с раствором №1. Представлено базовое свечение клеток (пробирка А); Б.

Показана флуоресценция клеток исследуемого образца и контроля «1301», которые инкубировали с раствором №2 (с теломерным зондом, меченным FITC - PNA) (пробирка С)

Подсчитывали среднее значение СИФ в пробирках А и В отдельно для исследуемых клеток (получая СИФ FITC клеток без зонда) и клеток линии 1301 (получая СИФ FITC "1301" без зонда). Аналогично подсчитывали среднее значение СИФ в пробирках С и D отдельно для клеток испытуемого (получая СИФ FITC клеток с зондом) и клеток линии 1301 (получая СИФ FITC "1301" с зондом). Далее рассчитывали относительную длину теломер (ОДТ) мононуклеаров по формуле 1.

$$\text{ОДТ} = \frac{(\text{СИФ FITC клеток с зондом} - \text{СИФ FITC клеток без зонда}) \times 2 \times 100}{\text{СИФ FITC "1301" с зондом} - \text{СИФ FITC "1301" без зонда}} \quad (1)$$

Приведем пример расчета ОДТ в мононуклеарах. В результате проведенного исследования получили СИФ мононуклеаров и клеток контрольной культуры «1301», показанные в Таблице 4.

Таблица 4 – Средняя интенсивность флуоресценции (СИФ) мононуклеаров и клеток контрольной культуры «1301»

СИФ	Мононуклеары	Клетки «1301»
Пробирка А	3026	6540
Пробирка В	2931	6325
Пробирка С	9199	172892
Пробирка D	9950	181670

Тогда, СИФ FITC мононуклеаров без зонда =  $(3026 + 2931) \div 2 = 2978,5$ ; СИФ FITC клеток мононуклеаров с зондом =  $(9199 + 9950) \div 2 = 9574,5$ ; СИФ FITC клеток «1301» без зонда =  $(6540 + 6325) \div 2 = 6432,5$ ; СИФ FITC клеток «1301» с зондом =  $(172892 + 181670) \div 2 = 177281$ . По формуле 1 ОДТ составит =  $(9574,5 - 2978,5) \div (177281 - 6432,5) \times 2 \times 100 = 7,72$ . Полученное значение ОДТ означает, что ДТ мононуклеаров составляет 7,72% от длины теломер клеток контрольной линии «1301».

Учитывая, что ОДТ в лимфоцитах и моноцитах может быть разной, в рамках исследования было решено дополнительно сравнить ДТ в различных популяциях клеток – во всей совокупности мононуклеаров, а также в лимфоцитах и моноцитах по отдельности.

Выделение популяций лимфоцитов и моноцитов проводилось на графике показателей прямого и бокового светорассеяния (Рисунок 8А). В некоторых случаях определение популяций моноцитов и лимфоцитов было невозможно (Рисунок 8Б), тогда определение ДТ проводилось только в общей совокупности мононуклеаров.

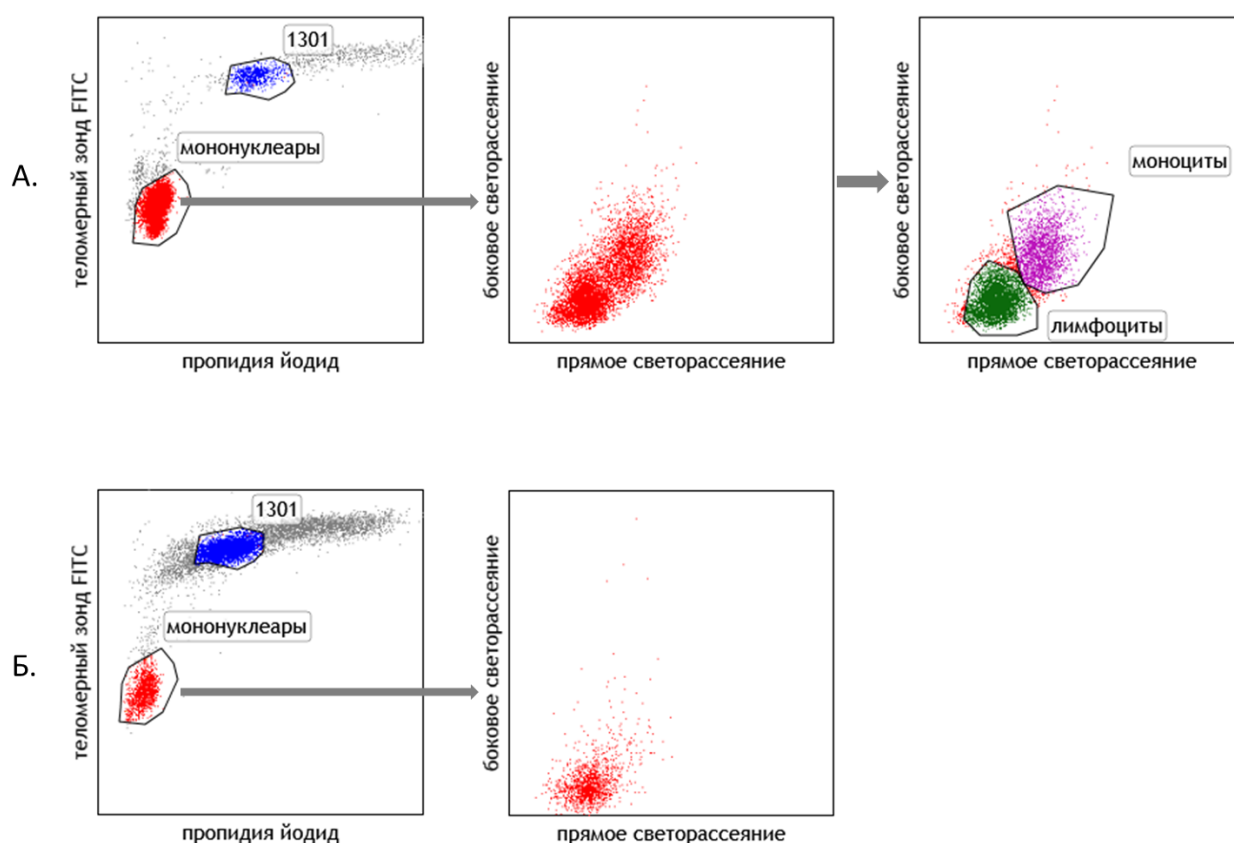


Рисунок 8 - Выделение популяций моноцитов и лимфоцитов на основании показателей бокового и прямого светорассеяния: А. Пример случая, когда популяции моноцитов и лимфоцитов можно выделить; Б. Пример случая, когда невозможно выделить популяции моноцитов и лимфоцитов

Вычисление ОДТ лимфоцитов и моноцитов также выполнялось по формуле 1.

## **2.5. Определение абсолютной длины теломер с помощью полимеразной цепной реакции**

С целью дальнейшей интерпретации и сопоставления результатов двух методик, было выполнено определение АДТ у 21 здорового донора, различных по полу и возрасту, методом ПЦР в реальном времени<sup>1</sup>.

Первый этап исследования заключался в получении стандартных плазмидных образцов с известным числом теломерных гексаповторов. Для этого смешивали олигонуклеотиды k-tl1 5'-TTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGG G-3' с k-tl2 5'-AACCCТААСССТААСССТААСССТААСССТ-3' в концентрации 3 мкМ, 10 mM Tris, pH 7.5, 50 mM NaCl и 2 mM ЭДТА общим объемом 40 мкл. Далее в течение 5 минут при температуре 95°C в термостате эту смесь подвергали денатурации и медленно охлаждали до комнатной температуры, формируя двухцепочечный олигонуклеотид с «липкими» концами. Полученную ДНК подвергали самолигированию в присутствии лигазы T4 и киназы T4 в течение 3 часов при температуре 8°C. С помощью добавления дезоксинуклеозидтрифосфата (dNTP) до 200 мкМ и 2,5 Ед. акт. ДНК-полимеразы T4 в течение 20 мин при температуре 37°C репарировали концевые участки ДНК. Далее в течение 15 минут нагревали полученную смесь до 65°C. Для получения конечного объема 100 мкл образец доводили дистиллированной водой и добавляли ресуспендированные магнитные частицы Agcount (Beckman) 100 мкл к полученному раствору, перемешивали. После инкубирования в течение 5 минут частицы собирали на магните. Далее убирали супернатант и два раза промывали частицы в 400 мкл 75% спирта (10 mM TrisHCl pH8). Высушивали полученные частицы при 37 °C с доступом воздуха в течение 10 мин. В 30 мкл воды

---

<sup>1</sup> Данный раздел подробно описан в статье Гальцевой И.В. и др. «Сопоставление методов полимеразной цепной реакции и проточной цитометрии для измерения длины теломер лейкоцитов человека» // Клиническая лабораторная диагностика. 2021. № 3. С. 156.

элюировали ДНК. Далее лигировали полученные конкатомеры ДНК с плазмидой pBluscriptII SK(+), лианеризованной эндонуклеазой рестрикции EcoRV и трансформировали с помощью лигазной смеси компетентных клеток E.coli XL-blue I. Секвенировали отобранные рекомбинантные плазмиды по Сенгеру на автоматическом секвенаторе ABI 3130XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США), используя набор Big dye 3.1 (Центр коллективного пользования «Геномика», ИХБФМ СО РАН, Российская Федерация), для оценки количества клонированных теломерных повторов. Плазмидные ДНК pTL17 (17 повторов) и pTL17 (28 повторов) выделяли из 100 мл ночной культуры в среде LB с помощью QIAGEN Plasmid Midi Kit (QIAGEN) согласно инструкции фирмы производителя.

Вторым этапом исследования было получение калибраторов. Концентрацию стандартных плазмидных ДНК, полученных на первом этапе, определяли с помощью флуорометрии (набор Qubit™ BR, Invitrogen). Протокол флуорометрии: с целью линеаризации, ДНК (2 мкг) подвергали гидролизу эндонуклеазой рестрикции EcoRI. Полученные в ходе этого линейные стандарты были разведены в стерильном буфере до концентрации в 10<sup>7</sup>-10<sup>1</sup> копий плазмидной ДНК на мкл, содержащем 10 mM TrisHCl pH7,6 и ДНК фага лямбда 5 нг на мкл. Полученную в стандартах концентрацию ДНК определяли с использованием цифровой ПЦР фрагмента гена бета-лактамазы на платформе QX100™ Droplet Digital™ PCR System (Bio-Rad, США) согласно инструкциям фирмы-производителя. 70 мкл масла для генерации капель и 20 мкл ПЦР-смеси помещали в лунки картриджа DG8. В 96-луночную ПЦР плашку переносили 40 мкл полученных микрокапель, запечатывали фольгой и помещали в амплификатор. Для амплификации применялась следующая программа: 96°C – 10 минут. После этого проводилось 50 циклов нагрева до 96°C по 15 секунд и 58°C по 40 секунд, с финальным прогревом в течение 10 минут при 98°C. Далее с помощью прибора Droplet Reader микрокапли подвергали считыванию. Для обработки полученных данных использовали программное обеспечение QuantaSoft (Bio-Rad, США).

При количественном анализе теломерных повторов проводили две количественные ПЦР: первую реакцию – для количественного определения теломерных повторов, вторую – для геном-эквивалентов ДНК. Первый раствор для ПЦР содержал 300 нМ telg 5'-АСАСТААGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTAGTGT-3', telc 5'-TGTTAGGTATCCСТАТСССТАТСССТАТСССТАТСССТААСА-3', буфер для Таq-полимеразы (65 мМ Tris-HCl (pH 8,9); 15 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub>; 0,05% Tween 20; 3 мМ MgCl<sub>2</sub>), 0,2 мМ дНТФ, 1xSybrGreenI, 1 Ед. акт. Таq-полимеразы («Биосинтек», Российская Федерация) и 5-50 нг геномной ДНК человека (общий объем раствора 20 мкл). Реакцию амплификации проводили в амплификаторе CFX96 (Bio-Rad, США). Программа для амплификатора следующая: начальная денатурация 15 минут при 95°C для активации фермента в течение 2 циклов (10 секунд при 95°C, 20 секунд при 49°C), далее в течение 38 циклов с другим температурным режимом (10 секунд при 95°C, 30 секунд при 60°C), съем флуоресцентного сигнала на каналах FAM, 10 секунд при 72°C. Второй раствор для ПЦР содержал 450 нМ RPP-U 5'-GATTTGGACCTGCGAGCG-3', RPP-R 5'-GCGGCTGTCTCCACAAGT-3', ALB-U 5'-GACTTGCCAAGACATATGAAACC-3', ALB-R 5'-ТССААСААТАААССТАССАСТТТG-3' и 100 нМ зонды ALB-FAM 5'-FAM-TGCTGTGCCGCTGCAGATCC-BHQ1-3' и RPN-H 5'-HEXTCTGACCTGAAGGCTCTGCGCG-BHQ1-3', буфер для Таq-полимеразы (65 мМ Tris-HCl (pH 8,9); 20 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub>; 0,05% Tween 20; 3,5 мМ MgCl<sub>2</sub>), 0,2 мМ дНТФ, 1 Ед. акт. Таq-полимеразы («Биосинтек», Российская Федерация) и 5-50 нг геномной ДНК человека (общий объем раствора 20 мкл). Реакцию амплификации проводили в амплификаторе CFX96 (Bio-Rad, США). Программа для амплификатора следующая: 15 минут при 95 °С начальной денатурации для активации фермента (39 циклов: 10 секунд при 95 °С, 30 секунд при 60 °С), съем флуоресцентного сигнала на каналах FAM/HEX (10 секунд при 72 °С). Для каждого образца проводили трехкратный повтор анализа. Построение калибровочной кривой было выполнено с использованием стандартных образцов 109, 108, 107 копий на мкл для ПЦР-1 и 105, 104, 103 копий на мкл для ПЦР-2. С



помощью программного обеспечения соответствующего прибора рассчитывали количество копий анализируемых ДНК-мишеней по формуле, выведенной из графика калибровочной кривой. Абсолютные значения числа копий теломер нормализовали при делении на количество геном-эквивалентов, рассчитанных как среднее арифметическое абсолютных значений двух однокопийных локусов: гена альбумина и рибонуклеазы Р.

## **2.6. Определение абсолютной длины теломер с помощью метода flow-FISH**

В первую очередь методика flow-FISH направлена на вычисление ОДТ, так как в ее основе лежит определение разницы СИФ между исследуемыми и контрольными клетками. Зная АДТ контрольных клеток, возможно построение математической модели с целью перевода ОДТ в АДТ. Такая методика была разработана в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Министерства Здравоохранения Российской Федерации [4].

В рамках диссертационной работы нами была разработана и запатентована методика сопоставления ПЦР в реальном времени и flow-FISH с целью достоверного определения АДТ [9]. Был опубликован патент «Способ определения абсолютной длины теломер лейкоцитов с помощью метода проточной цитометрии» (Гальцева Ирина Владимировна и соавторы; 2021). Принцип исследования заключался в сопоставлении данных по определению ДТ у 21 донора одновременно методами ПЦР, позволяющим вычислить АДТ, выраженную в тысячах пар нуклеотидов, и flow-FISH, определяющим СИФ.

Анализ мононуклеаров методом проточной цитометрии и ПЦР выполняли согласно методике, описанной выше. Измеряли СИФ из двух проб, инкубированных с гибридизационным буфером без зонда в пробирках А и В, и

СИФ от проб, инкубированных с зондом в пробирках С и D. Затем подсчитывали среднее значение СИФ в образцах из пробирок С и D, среднее значение СИФ в образцах из пробирок А и В, а далее определяли разницу полученных средних значений. Полученную разницу СИФ переводили в молекулярный эквивалент флуоресценции (МЭФ), с помощью предварительно построенных калибровочных кривых (использовался набор «FluoroSpheres 6-Peak, Sensitivity Particles»). Подробное описание перехода от СИФ к МЭФ представлено в исследованиях Дёминой И.А. с соавторами (2018) и Rufer N. с соавторами (1998) [4; 81]. Переход от СИФ к МЭФ необходимо было осуществлять по причине того, что СИФ может существенно изменяться под действием факторов окружающей среды – влажности, температуры, особенностей работы цитометра и т.д., в то время как МЭФ – более стабильная величина.

Далее получали уравнение регрессии между выявленной АДТ, полученной с помощью ПЦР, и МЭФ:  $АДТ = 0,0043 * МЭФ$ , которое затем возможно было использовать для перевода значений МЭФ в АДТ для клеток всех исследуемых образцов (Рисунок 9).

Таким образом, была построена модель перевода СИФ, полученной при определении АДТ, в МЭФ, что в свою очередь позволяет вычислить АДТ, выраженную в тысячах пар нуклеотидов.

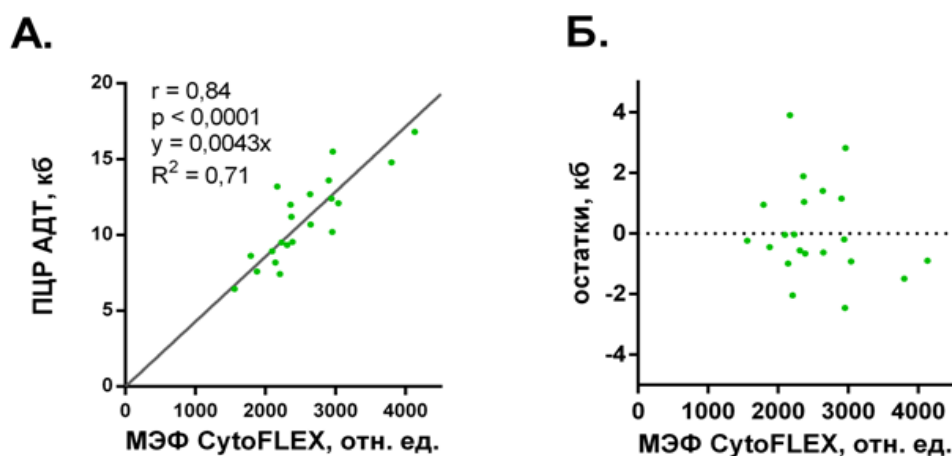


Рисунок 9 - Взаимосвязь измерения длины теломер методами ПЦР (АДТ) и flow-FISH (МЭФ)

## **2.7. Разделение больных на группы в зависимости от исходной длины теломер**

По данным литературы не существует строгих критериев и общепринятого порога для выделения группы больных АА с «укороченными» теломерами. Основываясь на данных Andrea Vacigolupo и Sharon A. Savage [65], «ультракороткие теломеры» обычно определяются как теломеры с длиной короче, чем у 99% здорового контроля (1-й перцентиль) соответствующего возраста. Такое укорочение характерно для больных с наследственным дефектом генов теломеразного комплекса – ВД. Для этой группы больных можно выделить и понятие «коротких теломер» - ДТ короче, чем у 90% здорового контроля (10-й перцентиль) соответствующего возраста. Однако, не существует стандартизированного подхода к разделению больных АА на группы с «более короткими» и «более длинными» теломерами. В некоторых исследованиях применялось следующее разделение: группа с ДТ, соответствующей I-II квартилям здорового контроля или общей группе больных АА (ДТ меньше, чем у 50% доноров или больных) и группа с ДТ, соответствующей III-IV квартилям здорового контроля или общей группе больных АА (ДТ больше, чем у 50% доноров или больных). В Таблице 5 приведены примеры разделения больных АА на группы в зависимости от исходной ДТ по данным опубликованных исследований.

В нашем исследовании под термином «ультракороткие теломеры» принималась ДТ, соответствующая первому перцентилю здорового контроля (ДТ меньше, чем у 1% доноров). С целью разделения всей выборки больных АА в зависимости от исходной ДТ, было выделено две группы: группа с ДТ, соответствующей I-II квартилям здорового контроля («короткие теломеры») и группа с ДТ, соответствующей III-IV квартилям здорового контроля («длинные теломеры»).

Таблица 5 – примеры разделения больных АА и ВД на группы в зависимости от исходной ДТ по данным различных исследований.

Автор, год	Критерии короткой длины теломер	Диагноз	% больных с короткой ДТ	Метод	Группа здорового контроля, n
Savage, 2009 [65]	1-й процентиль 10-й процентиль (+ семейный анамнез)	ВД	-	flow-FISH	-
Scheinberg, 2010 [15]	I, II квартили	АА	50	ПЦР	-
Hirotochi Sakaguchi, 2014 [55]	I квартиль	АА	-	flow-FISH	71
Кулагин А.Д., 2014 [47]	<99% доверительного интервала	АА	45	flow-FISH	76
Atsushi Narita, 2015 [54]	Дельта отклонение (delta relative TL)	АА	46	flow-FISH	-
Hee S. Park, 2017 [80]	10-й процентиль	АА	57	Q-FISH	147
Miwata, 2021 [24]	Стандартное отклонение <-1,71 1-й процентиль	АА / ВД / ФА	23 6	flow-FISH	71

## 2.8. Статистическая обработка данных

Для статистической обработки данных применяли программное обеспечение “SAS 9.4” (Sas institute inc., Cary, NC, США). Для анализа результатов использовали классические методы описательной статистики, частотный и регрессионный анализы.

Распределение основных целевых переменных (ДТ) не отличалось существенно от нормального, поэтому параметры их распределений представлялись в виде средних и стандартных отклонений, а для анализа использовались линейные методы.

Для анализа динамики ДТ использовались многопараметрические регрессионные модели на повторных наблюдениях (процедура MIXED SAS). Для анализа ассоциации конечных точек с исследуемыми параметрами ДТ и риск-факторами применялись методы событийного анализа, реализованные в процедурах SAS – LIFETEST, PHREG. Для отбора значимых связей использовались сценарии пошаговой селекции факторов.

## Глава 3. Результаты

### 3.1. Определение относительной и абсолютной длины теломер мононуклеаров крови и костного мозга у больных апластической анемией до начала комбинированной иммуносупрессивной терапии

В исследование до начала ИСТ было включено 45 больных АА. Клинико-лабораторная характеристика данной группы больных представлена в таблице 1 главы «Материалы и методы». ДТ в мононуклеарах периферической крови была измерена у всех больных. Средняя ОДТ составила 6,97 (диапазон 5,9-16,4), а АДТ – 11,6 (7,3-20,1) тысяч пар нуклеотидов (тыс. п.н.).

У 20 больных АА до проведения ИСТ были также исследованы мононуклеары костного мозга. Средняя ОДТ составила 6,82 (5,3-10,9). АДТ составила 11,0 тыс.п.н. (6,7-20,9).

При сравнении ОДТ и АДТ мононуклеаров крови с мононуклеарами костного мозга не получено достоверных отличий в ДТ клеток различных биологических материалов (Таблица 6). Поэтому на последующих этапах материалом для исследования была выбрана периферическая кровь, ввиду простоты и безопасности манипуляций для ее получения.

Таблица 6 - Относительная и абсолютная ДТ мононуклеаров крови и костного мозга у больных АА до начала лечения.

Параметр	Мононуклеары крови	Мононуклеары костного мозга	p
ОДТ, среднее (диапазон)	6,97 (5,9-16,4)	6,82 (5,3-10,9)	0,2
АДТ, среднее (диапазон) тыс.п.н.	11,6 (7,3-20,1)	11,0 (6,7-20,9)	0,23

### 3.2. Сравнение относительной и абсолютной длины теломер больных апластической анемией и доноров

Для определения референсных значений и дальнейшего сравнения исследована относительная и абсолютная ДТ мононуклеаров периферической крови доноров ( $n=32$ ), которые были представлены взрослыми испытуемыми различных возрастных групп. Среднее значение ОДТ в этой выборке составило 7,39 (диапазон 4,67-10,14), а АДТ – 11,03 тыс.п.н (диапазон 5,05-16,45). Помимо этого, была исследована ДТ у 10 доноров костного мозга: среднее значение ОДТ составило 7,1 (диапазон 6,4-8), а АДТ - 10,1 тыс.п.н. (диапазон 8,2-13,7).

Как и в других крупных исследованиях [46; 70], была подтверждена значимая обратная корреляция между длиной теломер и возрастом здорового контроля (Рисунок 10).

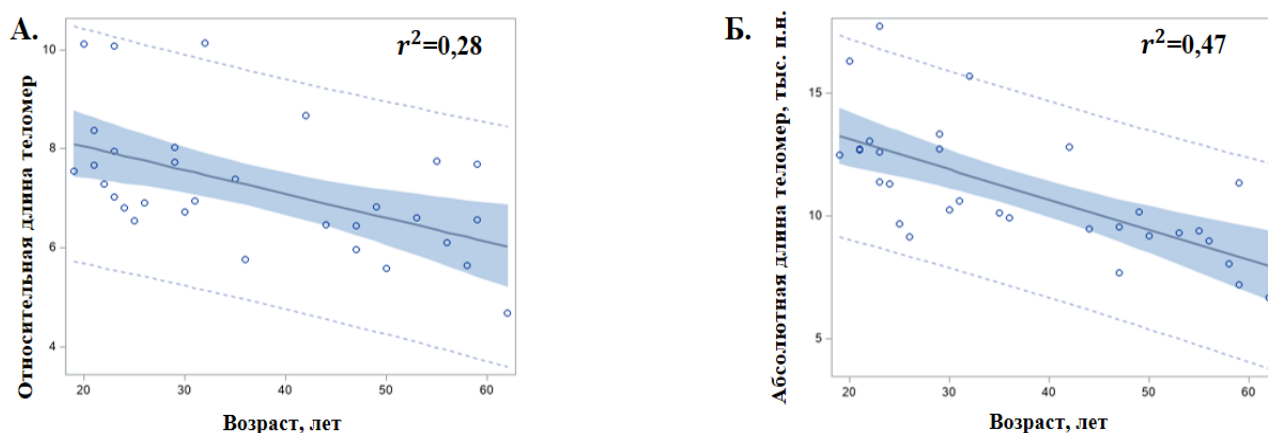
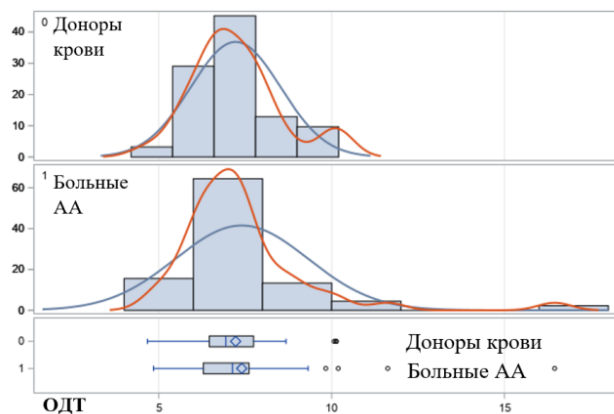


Рисунок 10 - Распределение относительной (А) и абсолютной (Б) ДТ мононуклеаров периферической крови в группе доноров крови в зависимости от возраста

Было проведено сравнение относительной и абсолютной ДТ в группах больных АА и доноров крови. ОДТ мононуклеаров периферической крови между группами больных АА до начала лечения (среднее 7,22; диапазон 4,9-16,4) и донорами крови (среднее 7,39; диапазон 4,67-10,14) достоверно не различалась ( $p = 0,64$ ) (Рисунок 11).

Также не обнаружено достоверно значимых различий в АДТ мононуклеаров периферической крови между группами больных АА в дебюте болезни (среднее 11,03 тыс.п.н.; диапазон 3,5-20,1) и донорами крови (10,7 тыс.п.н.; диапазон 5,05-16,45) ( $p = 0,65$ ) (Рисунок 11).

А.



Б.

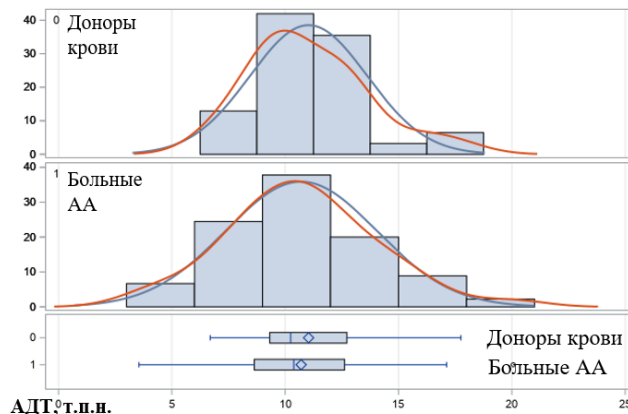


Рисунок 11 - Распределение и сравнение относительной (А) и абсолютной (Б) ДТ мононуклеаров периферической крови в группах здоровых доноров (0) и больных АА до начала лечения (1)

При исследовании мононуклеаров костного мозга средняя ОДТ в группе больных АА составила 6,82 (5,3-10,9), а в группе доноров 7,1 (6,4-8). Средняя АДТ составила 11,7 (6,7-20,9) и 10,1 (8,2-13,7) тыс. п.н. соответственно (Таблица 7).

Таблица 7 - Относительная и абсолютная ДТ мононуклеаров костного мозга у больных АА до начала лечения и у доноров костного мозга.

Параметры	Больные АА (n=20)	Здоровый контроль (n=10)	p
ОДТ, среднее (диапазон)	6,82 (5,3-10,9)	7,1 (6,4-8)	0,97
АДТ, среднее (диапазон) тыс. п.н.	11,7 (6,7-20,9)	10,1 (8,2-13,7)	0,2



Таким образом, ДТ мононуклеаров крови и костного мозга у больных АА и у доноров была сопоставима как в мононуклеарах периферической крови, так и в мононуклеарах костного мозга.

### 3.3. Сравнение относительной и абсолютной длины теломер в мононуклеарах, лимфоцитах, моноцитах периферической крови и костного мозга

Была исследована ДТ в различных клеточных популяциях периферической крови и костного мозга у доноров. ОДТ и АДТ моноцитов, лимфоцитов и мононуклеаров коррелировала в этой группе как в периферической крови, так и в костном мозге (Таблица 8).

Таблица 8 – Относительная и абсолютная ДТ в различных клетках периферической крови и костного мозга доноров.

Исследуемый материал	Клеточная популяция	ОДТ, среднее (диапазон)	АДТ, тыс. п.н. среднее (диапазон)
Кровь	Мононуклеары (n=27)	7,2 (4,7-10,1)	11,18 (6,7-16,3)
	Моноциты (n=27)	7,92(5,5-10,9)	12,4 (8,3-18,5)
	Лимфоциты (n=27)	6,91(4,6-10,1)	9,92 (6,4-16,8)
Костный мозг	Мононуклеары (n=8)	7,15 (6,4-8,0)	9,94 (8,2-13,7)
	Моноциты (n=8)	7,87 (4,4-8,6)	11,6 (8,8-13,8)
	Лимфоциты (n=8)	6,86 (6,2-8,0)	9,38 (7,7-10,0)

Следующим этапом была выполнена оценка ДТ в различных клетках периферической крови и костного мозга у больных АА до начала лечения. Результаты сравнения представлены в Таблице 9. Была выявлена сильная

корреляция между ОДТ и АДТ моноцитов, лимфоцитов, мононуклеаров периферической крови и костного мозга.

Таблица 9 – Относительная и абсолютная ДТ в различных клетках периферической крови и костного мозга больных АА.

Исследуемый материал	Клеточная популяция:	ОДТ, среднее (диапазон)	АДТ, тыс. п.н. среднее (диапазон)
Кровь	Мононуклеары (n=18)	7,16 (5,9-9,8)	10,4 (3,6-20,1)
	Моноциты (n=18)	6,89 (4,9-9,3)	10,3 (3,3-20,1)
	Лимфоциты (n=18)	7,14 (5,7-9,9)	10,0 (3,6-18,7)
Костный мозг	Мононуклеары (n=11)	7,14 (5,2-10,9)	11,7 (6,7-20,9)
	Моноциты (n=11)	7,29 (4,9-10,3)	11,83 (7,4-19,6)
	Лимфоциты (n=11)	7,86 (5,1-10,9)	11,4 (6,6-20,8)

Таким образом, у больных АА и у доноров не получено существенных различий между характеристиками ДТ мононуклеаров, моноцитов и лимфоцитов. Исследование мононуклеаров периферической крови является целесообразным у больных АА.

### **3.4. Сравнение относительной и абсолютной длины теломер в группах больных апластической анемией и врожденным дискератозом**

Стоял также вопрос, что ДТ может различаться в группах больных с разными нозологиями.

Была определена относительная и абсолютная ДТ в группе больных ВД (n=5). Средняя ОДТ составила 3,57 (3,0-3,97), а АДТ 4,47 тыс.п.н. (3,7-5,26), что значительно меньше, чем у больных АА до начала лечения и у доноров (Таблица 10).

Ни у одного больного АА относительная длина теломер не соответствовала диапазону колебаний значений у больных ВД.

Таблица 10 - Относительная и абсолютная ДТ мононуклеаров крови у больных АА до начала лечения и у больных ВД.

Параметр	Дебют АА (n=45)	Больные ВД (n=5)	p
ОДТ, среднее (диапазон)	7,2 (4,9-16,4)	3,57 (3,0-3,97)	0,006
АДТ, среднее (диапазон), тыс. п.н.	10,7 (3,5-20,1)	4,47 (3,7-5,26)	0,005

### **3.5. Относительная и абсолютная длина теломер мононуклеаров крови у больных апластической анемией в зависимости от тяжести и длительности заболевания**

Следующим шагом было выполнено сравнение ОДТ и АДТ в группах больных с различной тяжестью заболевания. Показано, что в группе больных с НАА средняя ОДТ составила 7,38 (4,9-11,6), что достоверно не отличалось от больных с ТАА (7,23 (5,1-10,2)) и СТАА (7,67 (5,3-16,5)).

Также не получено достоверных различий между АДТ в группах НАА и ТАА/СТАА. Так, среднее значение в группе больных с нетяжелой формой составило 10,81 тыс. п.н., а в группах с тяжелой и сверхтяжелой формами 11,04 и 9,95 тыс. п.н. соответственно. Сравнение приведено в Таблице 11.

Таблица 11 - Относительная и абсолютная ДТ мононуклеаров крови у больных АА в зависимости от тяжести заболевания.

Параметр	НАА (n=23)	ТАА (n=13)	СТАА (n=9)	p
ОДТ, среднее (диапазон)	7,38 (4,9-11,6)	7,23 (5,1-10,2)	7,67 (5,3-16,5)	0,87
АДТ, среднее (диапазон) тыс. п.н.	10,81 (4,6-20,1)	11,04 (4,9-15,7)	9,95 (3,6-17,1)	0,75

Было выявлено, что среднее время от появления первых симптомов болезни до начала лечения при НАА и ТАА/СТАА различное (7 и 4 месяца соответственно). Показано, что при длительности заболевания более 6 месяцев до начала ИСТ средние значения ДТ были значимо меньше (среднее 6,72; диапазон 4,8-9,3), чем при более коротком сроке наблюдения (среднее 7,97; диапазон 5,7-16,4) ( $p = 0,032$ ) (Таблица 12).

Таблица 12 - ОДТ мононуклеаров периферической крови у больных АА в зависимости от длительности заболевания до начала лечения.

Параметр	Длительность болезни <6 месяцев	Длительность болезни >6 месяцев	p
Количество больных	20	23	
ОДТ, среднее (диапазон)	7,97 (5,7-16,4)	6,71 (4,8-9,3)	0,032

Таким образом, ДТ сопоставима при разной степени тяжести АА (НАА/ТАА), но обнаружено, что уменьшение ОДТ может быть связано с длительностью заболевания более 6 месяцев до начала лечения.

### **3.6.1. Оценка вероятности ответа и развития рецидива в зависимости от исходной относительной длины теломер**

С целью оценки влияния ДТ на вероятность достижения ответа на лечение и развитие неблагоприятных событий (рецидив, клональная эволюция) были выделены группы больных с различными исходными показателями ОДТ.

Было показано, что «ультракороткие теломеры» (ОДТ в интервале, соответствующем первому процентилю распределения в группе здорового контроля) не определялись ни у одного больного АА. В тоже время у всех больных с ВД были выявлены «ультракороткие теломеры» на момент диагностики.

Снижение ОДТ до значений, соответствующих 10-му процентилю здорового контроля, было выявлено у трех больных АА. Отмечено, что у двух из трех этих больных не получен ответ на лечение, а у третьего – достигнуто гематологическое улучшение, но не ремиссия заболевания.

В дальнейшем выполнено разделение больных АА на две группы в зависимости от исходной ОДТ: с короткими теломерами (ДТ соответствует I-II квартилям здорового контроля, n=20) и длинными теломерами (ДТ соответствует III-IV квартилям здорового контроля, n=23). Подробное описание разделения на группы описано в разделе «Материалы и методы».

К 3 месяцу ИСТ гематологическое улучшение было достигнуто у 5 из 20 (25%) больных с короткими теломерами и у 10 из 23 (43%) больных с длинными теломерами, к 6 месяцу - у 11 из 19 (58%) и у 16 из 22 (73%) соответственно. Несмотря на большую частоту достижения ответа в группе с длинными теломерами, статистически значимой разницы получено не было ( $p = 0,2$  /  $p = 0,32$ ).

При анализе кумулятивной частоты ответов на ИСТ отмечена тенденция к увеличению вероятности достижения ГУ в группе больных с длинными теломерами до 80%, по сравнению с группой, у которых определялись короткие

теломеры (53%), но разница не была статистически значимой ( $p = 0,059$ ). Однако, в группе больных с большей ДТ достоверно была выше частота достижения частичной и полной ремиссии АА (Таблица 13, Рисунок 12). Так, больные с ДТ, соответствующей I-II квартилям здорового контроля, имели 62% вероятность достижения ЧР (против 37% в группе с ДТ, соответствующей III-IV квартилям). Полная ремиссия была достигнута в 23% случаев в группе больных АА с длинными теломерами, и только в 5% (1 случай) – с короткими теломерами.

Таблица 13 – Частота достижения ответа на ИСТ в зависимости от исходной ОДТ за время наблюдения.

Группа больных	Число больных	ГУ, %	ЧР, %	ПР, %
Все больные АА	43	65 %	49 %	23 %
Больные АА с короткими теломерами	20	53 %	37 %	5 %
Больные АА с длинными теломерами	23	80 %	62 %	41%
Достоверность, «р»		0,059	0,028	0,003

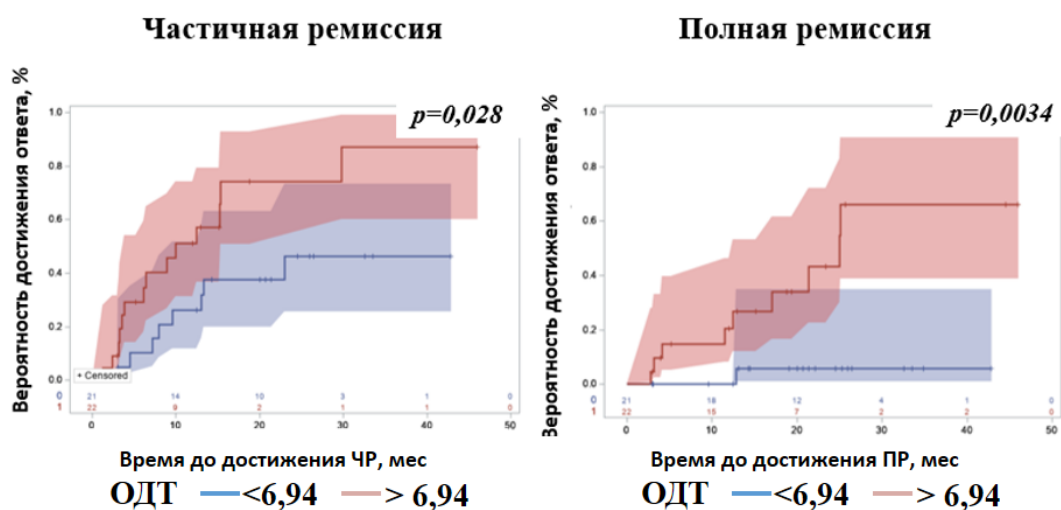


Рисунок 12 – Частота достижения частичной и полной ремиссии у больных АА в процессе ИСТ в зависимости от исходной ОДТ

За период наблюдения зафиксировано 3 рецидива АА. У одного больного исходно определялись короткие теломеры, а у двух других – длинные. Влияние ДТ на частоту развития рецидивов необходимо оценить в более долгосрочных наблюдениях.

Таким образом, отмечена тенденция к увеличению частоты общего ответа на ИСТ в группе больных АА с исходно более длинными теломерами. Относительная и абсолютная ДТ, определенные до начала лечения, достоверно влияли на частоту достижения ремиссии ( $p < 0,05$ ).

### **3.6.2. Оценка частоты клональных осложнений в зависимости от исходной длины теломер**

В общей группе больных АА ( $n=43$ ) частота развития клональных осложнений (появление новых цитогенетических aberrаций, трансформация в МДС, развитие ПНГ) составила 24% ( $n=10$ ). Так, ПНГ развилась у 5 из 43 больных. Еще у 5 больных отмечено появление новых цитогенетических aberrаций в процессе лечения (3 случая – моносомия 7, по 1 случаю – трисомия 8 и тетраплоидия). В одном из этих случаев была констатирована трансформация в МДС, а в четырех других не было признаков миелодисплазии по данным цитологического и гистологического исследования костного мозга. За период наблюдения не было зарегистрировано трансформации АА в ОМЛ.

У больных с более короткими и более длинными теломерами в дебюте заболевания частота развития ПНГ была сопоставима (3 из 20 больных – 15% и 2 из 23 больных - 9% соответственно;  $p = 0,52$ ).

В группе больных АА с короткими теломерами в 4 случаях (20%) выявлены новые цитогенетические поломки, в то время как в группе больных с длинными теломерами зафиксирована только одна (5%), однако, ввиду малой выборки, достоверных различий не получено ( $p = 0,11$ ).

На Рисунке 13 отображена частота развития клональных осложнений у больных, участвовавших в проспективном исследовании.

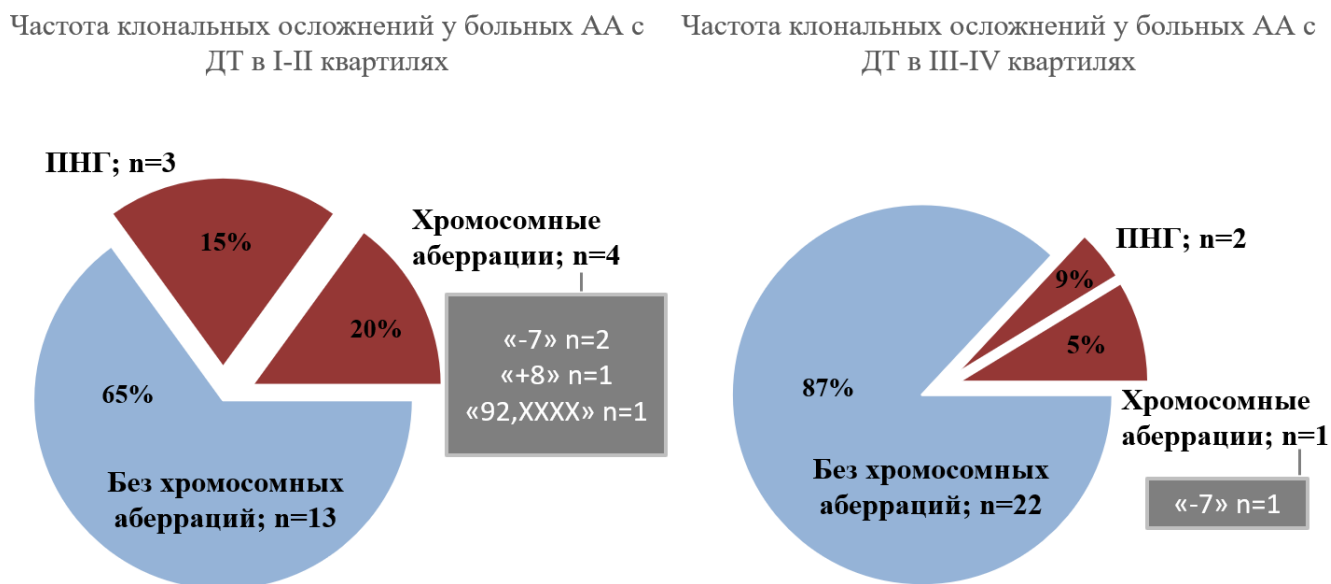


Рисунок 13 – Частота развития клональных осложнений у больных АА в зависимости от исходной ОДТ

Таким образом, не получено достоверных различий в частоте развития клональных осложнений в зависимости от исходной ДТ. Выявлена тенденция к увеличению частоты появления новых хромосомных aberrаций у больных с более короткими теломерами.

### 3.7. Оценка эффективности иммуносупрессивной терапии и вероятности ответа в зависимости от клинико-лабораторных показателей

У 43 из 45 больных АА была выполнена основная программа ИСТ (курс АТГ и ЦС). Критерии ответа на лечение охарактеризованы в разделе «Материалы и методы». Частота достижения гематологического улучшения составила 65% (29 из 43), частичной ремиссии - 49% (22 из 43), полной ремиссии – 23% (10 из 43).



Характер ответа на лечение к третьему и шестому месяцам ИСТ отображен на Рисунке 14.

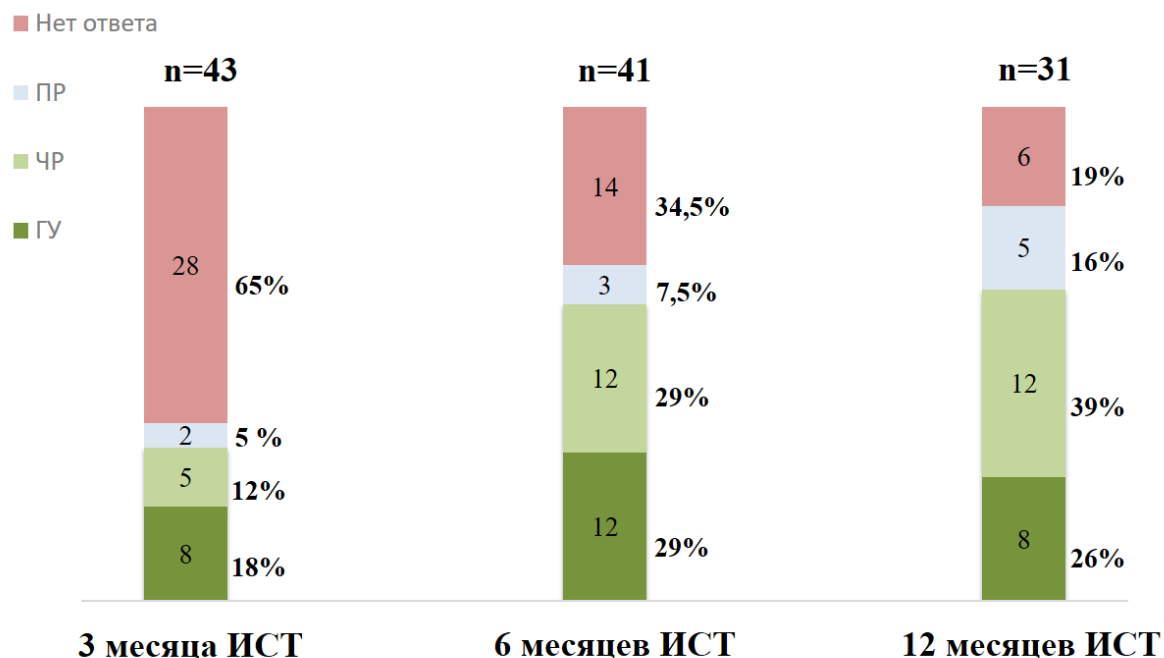


Рисунок 14 – Достижение ГУ, ЧР и ПР у больных АА на 3, 6 и 12 месяцы от начала ИСТ

Число потенциальных факторов риска, влияющих на конечные точки исследования велико. Чтобы сократить их число для более детального анализа и визуализации был проведен пошаговый многофакторный анализ, основанный на регрессионной модели пропорциональных рисков Кокса (см. второй раздел диссертации).

В пошаговый анализ для отбора наиболее значимых факторов были включены следующие признаки: пол; возраст; время от появления первых симптомов до начала терапии, время от установления диагноза до начала терапии; количество предшествующих госпитализаций; форма АА; концентрация гемоглобина, ЛДГ, ферритина, железа сыворотки, билирубина (общего, фракций), активность печеночных трансаминаз (АЛТ, АСТ), количество

тромбоцитов, лейкоцитов, лимфоцитов, нейтрофилов, ретикулоцитов (относительное и абсолютное); ПНГ-клон на гранулоцитах, моноцитах, эритроцитах; процент CD34+ клеток, бластных клеток, зрелых гранулоцитов, незрелых гранулоцитов, мегакариоцитов, сидеробластов (в том числе кольцевых), признаки дисмиелопоэза в костном мозге; выявленные изменения кариотипа; серологические маркеры вирусных гепатитов А, В, С; относительная и абсолютная ДТ; перегрузка железом печени и селезенки по данным МРТ; наличие лимфаденопатии по данным УЗИ; диагностированный или перенесенный вирусный гепатит А, В, С; предшествующая терапия ЦС, элтромбопагом (и длительность этой терапии); наличие инфекционных осложнений; доза АТГ, применение элтромбопага в протоколе лечения.

На достижение ГУ положительно влияли следующие факторы: длительность заболевания менее 8 месяцев, исходное количество тромбоцитов более  $20 \times 10^9/\text{л}$ , абсолютное число нейтрофилов более  $0,5 \times 10^9/\text{л}$ , общее количество лейкоцитов более  $2,8 \times 10^9/\text{л}$ , наличие маркеров вирусных гепатитов А, В, С (Таблица 14). Выявление маркеров вирусных гепатитов может свидетельствовать о перенесенной инфекции и косвенно отражать иммуноопосредованный механизм развития АА.

Таблица 14 – Результаты пошагового анализа факторов риска, влияющих на достижение ГУ.

Признак	Отношение рисков	Pr > ChiSq
Длительность заболевания менее 8 месяцев	0.101	<.0001
Тромбоциты (более $20 \times 10^9/\text{л}$ )	2.974	0.0483
Нейтрофилы (более $0,5 \times 10^9/\text{л}$ )	3.162	0.0154
Маркеры вирусных гепатитов А, В, С	9.874	0.0014

На достижение ЧР оказывали положительное влияние следующие факторы: инициальная концентрация гемоглобина более 75 г/л, количество тромбоцитов более  $20 \times 10^9/\text{л}$ , АДТ более 12 тыс.п.н., количество CD34+ клеток в костном мозге (от всех CD45+ клеток) более 0,3% (Таблица 15).

Таблица 15 – Результаты пошагового анализа факторов риска, влияющих на достижение ЧР.

Признак	Отношение рисков	Pr > ChiSq
Гемоглобин (> 75 г/л)	3.789	0.0046
Количество CD34+ клеток в костном мозге (более 0.3%)	3.939	0.0195
АДТ мононуклеаров крови (> 12 тыс.п.н.)	4.630	0.0017
Тромбоциты (более $20 \times 10^9/\text{л}$ )	-	0.0879

На достижение ПР положительно влияли следующие факторы: время от начала болезни до установления диагноза менее 6 месяцев, ОДТ более 7, количество CD34+ клеток в костном мозге (от всех CD45+ клеток) более 0,3%, количество зрелых гранулоцитов в костном мозге более 26,3 % (Таблица 16).

Таблица 16 – Результаты пошагового анализа факторов риска, влияющих на достижение достижения ПР.

Признак	Отношение рисков	Pr > ChiSq
Время от начала болезни до установки диагноза < 6 месяцев	6.155	0.0495
Количество CD34+ клеток в костном мозге более 0,3%	29.716	0.0062
ОДТ мононуклеаров крови более 7	36.413	0.0032
Зрелые гранулоциты в костном мозге более 26,3%	-	0.0446

На появление новых хромосомных aberrаций в процессе лечения влияла исходно высокая концентрация сывороточного железа, что отображает степень перегрузки железом и может быть связано с длительностью заболевания, а также наличие выраженных признаков дизэритропоэза (более 10% в костном мозге). На развитие классической ПНГ влиял исходный размер ПНГ-клона на гранулоцитах (>10%), а также количество ретикулоцитов, превышающее  $20 \times 10^9/\text{л}$ , что может отражать изначальное наличие лабораторных признаков гемолиза у больных АА, протекающей с ПНГ-клоном.

В Таблице 17 приведены данные пошагового анализа факторов риска, влияющих на развитие клональных осложнений.

Таблица 17 – Результаты пошагового анализа факторов риска, влияющих на развитие клональных осложнений.

Признак	Отношение рисков	Pr > ChiSq
Ретикулоциты > 2%	442.639	0.0085
Сывороточное железо более 45 мкмоль/л	2050.505	0.0027
ПНГ клон по гранулоцитам > 5%	43.037	0.0123
Наличие признаков дизэритропоэза в костном мозге >10%	-	0.0479

Многофакторный пошаговый анализ бессобытийной выживаемости не дал значимых результатов. По-видимому, это является следствием малого числа целевых событий, в число которых входили следующие неблагоприятные события: рецидив, прогрессирование заболевания, а также смерть больного.

Далее с целью графической иллюстрации и интерпретации результатов, для отобранных признаков был проведен однофакторный анализ, в ходе которого были получены оценки вероятности целевых событий в зависимости от обнаруженных информативных признаков.

Было показано, что длительность заболевания менее 8 месяцев, нетяжелая форма АА (нейтрофилы более  $0,5 \times 10^9/\text{л}$ , лимфоциты более  $1,2 \times 10^9/\text{л}$ , инициальный гемоглобин более 75 г/л) достоверно влияли на частоту достижения ГУ ( $p < 0,05$ ). Относительная и абсолютная ДТ также влияла на достижение ГУ, однако, достоверных различий получено не было ( $p > 0,05$ ) (Рисунок 15). А такие факторы, как пол, возраст, выявленные маркеры вирусных гепатитов, наличие ПНГ-клона, количество мегакариоцитов, незрелых гранулоцитов и CD34+ клеток в костном мозге, не влияли на достижение ГУ.

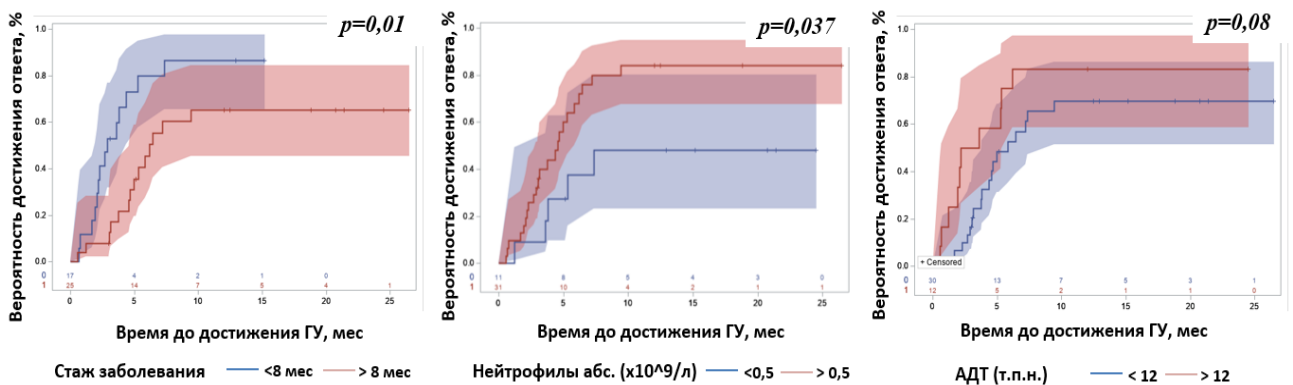


Рисунок 15 – Вероятность достижения гематологического улучшения у больных АА в зависимости от длительности заболевания, исходного количества нейтрофилов и абсолютной длины теломер

На достижение ремиссии апластической анемии (частичной и полной), достоверно влияло исходное количество CD34+ клеток в костном мозге более 0,3% и ОДТ более 6,94, а также АДТ, превышающая 12 тыс.п.н. (Рисунок 16). Остальные факторы достоверно не влияли на достижение данных конечных точек.

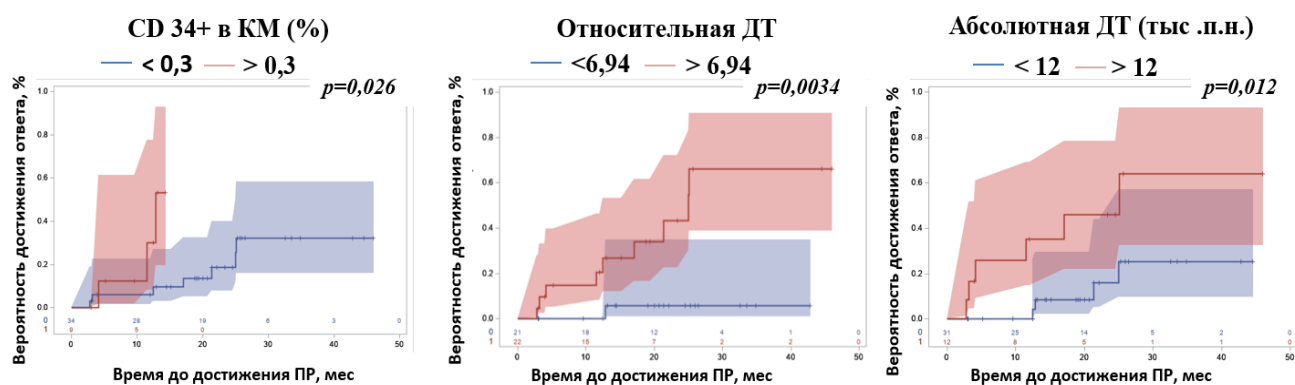


Рисунок 16 – Вероятность достижения полной ремиссии АА в зависимости от исходного количества CD34+ клеток в костном мозге и АДТ

При проведении дальнейшего однофакторного анализа не получено достоверных данных, указывающих на влияние исходной ОДТ и АДТ на частоту развития клональных осложнений и неблагоприятных событий, хотя имелась тенденция к увеличению вероятности развития поздних (на сроке более 40 месяцев наблюдения) неблагоприятных событий в группе больных с АДТ менее 12 тыс.п.н. (Рисунок 17).



Рисунок 17 – Вероятность частоты развития клонального кроветворения и неблагоприятных событий в зависимости от исходной длины теломер (ОДТ и АДТ)

Таким образом, были определены факторы, влияющие на достижение общего ответа и ремиссии у больных АА, такие как тяжесть и длительность болезни, количество CD34+ клеток в костном мозге до лечения, а также инициальные значения относительной и абсолютной ДТ. На вероятность развития хромосомных aberrаций на фоне лечения влияли высокая степень перегрузки железом и наличие выраженных признаков дизэритропоэза, а на частоту развития ПНГ – исходный размер ПНГ-клона и количество ретикулоцитов.

### 3.8. Анализ динамики длины теломер у больных апластической анемией в процессе терапии

У 43 больных апластической анемией было проведено изучение ДТ в динамике. Исследование проводилось до лечения и на +3, +6, +12 и +24 месяцев от начала курса АТГ. Также в динамике была исследована ДТ у 10 здоровых добровольцев в течении 1 года на четырех точках исследования: начальная, через 3, 6, 12 месяцев от начала ИСТ.

Для исследования динамики изучаемых признаков были использованы регрессионные модели на повторных наблюдениях. В этом анализе строятся усредненные регрессионные зависимости целевого признака от времени в группах больных. При этом в зависимости от задачи могут рассчитываться параметры модели, такие как среднее (начальное) значение в группе, средний клиренс (наклон), кривизна (для квадратичных моделей) и проверяются гипотезы об отличиях этих параметров от нуля и о равенстве этих параметров в группах.

Не было выявлено достоверных различий в изменении ОДТ мононуклеаров крови больных АА в течении 24 месяцев ( $p = 0,77$ ), хотя имелась тенденция к укорочению теломер к +12 и +24 месяцам терапии. Не было обнаружено достоверных различий ( $p = 0,59$ ) и в изменении АДТ мононуклеаров крови на разных сроках исследования.

У здоровых добровольцев также не отмечено достоверно значимых ( $p=0,58$ ) изменений ОДТ мононуклеаров крови в течении года. Не было выявлено достоверно значимых изменений ( $p = 0,76$ ) и АДТ. Динамика изменения ОДТ и АДТ у больных АА и доноров отображена на Рисунке 18.

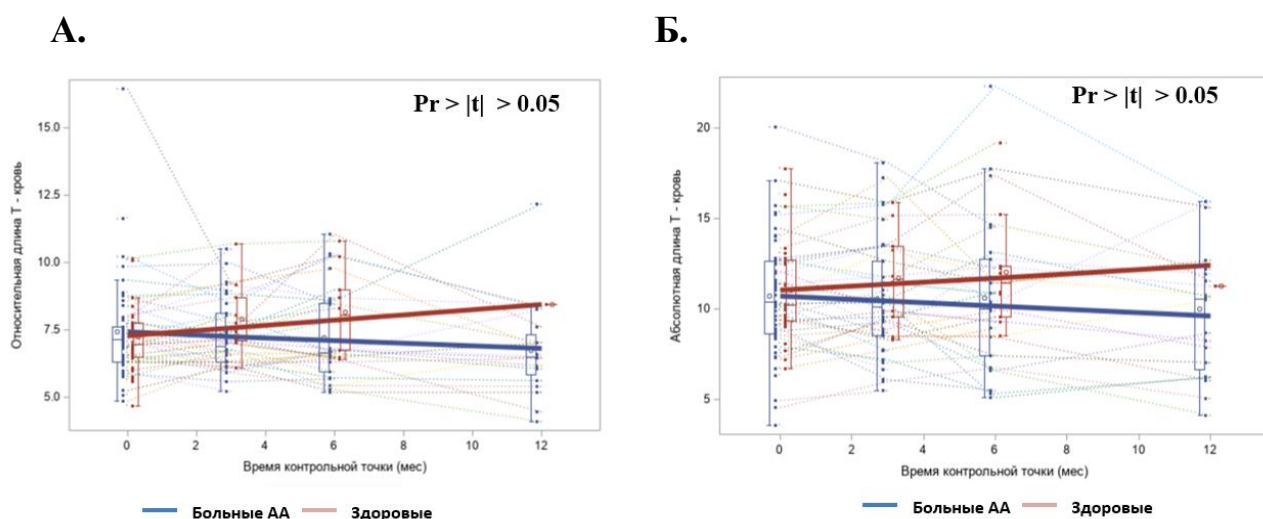


Рисунок 18 – Изменения относительной (А) и абсолютной (Б) ДТ мононуклеаров крови больных АА в процессе лечения и здоровых добровольцев в процессе динамического наблюдения



При исследовании относительной и абсолютной ДТ в мононуклеарах костного мозга в динамике у больных АА достоверных изменений не получено (Рисунок 19).

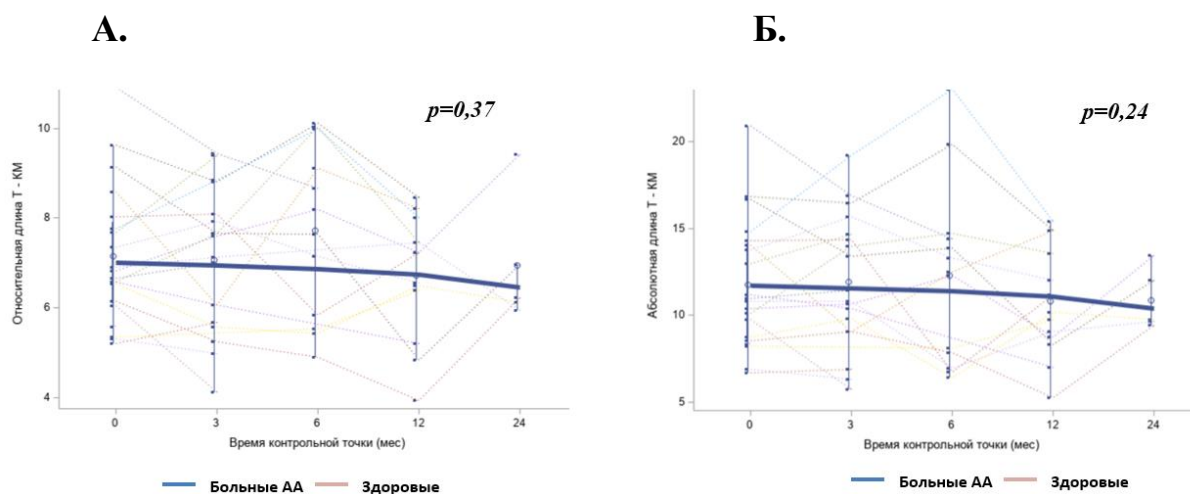


Рисунок 19 – Изменения относительной (А) и абсолютной (Б) ДТ мононуклеаров костного мозга больных АА в процессе лечения

Следующим этапом исследования была выполнена оценка ОДТ в динамике в группах больных АА с исходно меньшей и большей ОДТ. Было показано, что в обеих группах в процессе терапии не происходит достоверно значимых изменений ДТ и она остается стабильной на протяжении 12 месяцев (Рисунок 20).

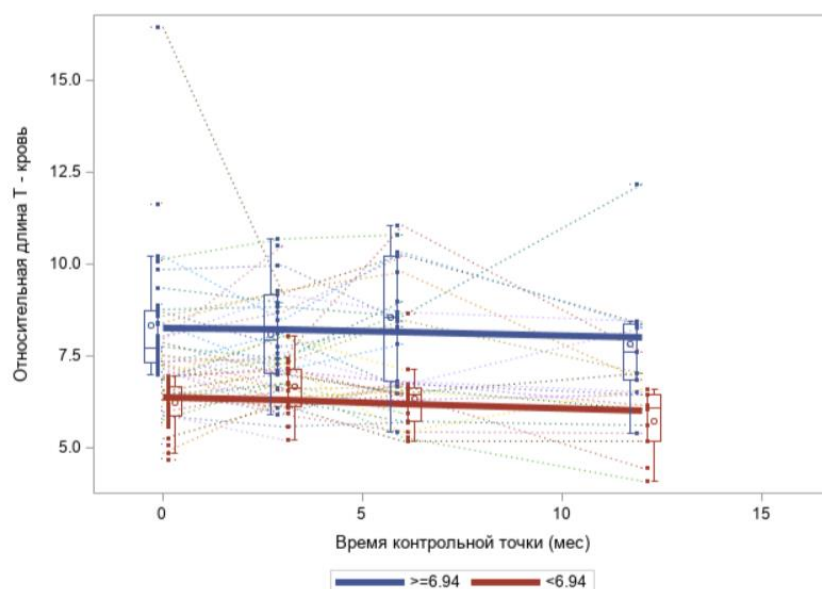


Рисунок 20 – Динамическое изменение ОДТ мононуклеаров крови в процессе лечения в группе больных АА с исходно более короткими (ОДТ<6,94) и более длинными (ОДТ>6,94) теломерами

Как было указано выше, исходная ОДТ не влияла на частоту клональной эволюции у больных АА, что, возможно, связано с небольшой выборкой больных и малым сроком наблюдения в данном исследовании. Однако, при анализе изменений ДТ в динамике был выявлен феномен укорочения теломер по мере появления новых патологических клонов, то есть развития клональной эволюции. У всех больных, кроме одного (№3), выявлено снижение показателя ОДТ на 10-35% от исходного. При этом, у больной №2 уже до начала лечения был выявлен клон с трисомией 8, а по мере проведения ИСТ и достижения ГУ - второй клон с моносомией 7, детектированный при помощи СЦИ и FISH исследований (Таблица 18).

Таблица 18 – Изменение ОДТ у больных АА по мере появления новых патологических клонов на фоне ИСТ.

Больной, возраст	ОДТ до лечения	ОДТ при выявлении хромосомных аббераций	% от исходной ДТ	Выявленная хромосомная абберация	Срок развития хромосомных аббераций от начала ИСТ (мес)
1. 24 года	9,83	8,42 ↓	85 %	Моносомия 7	6
2*. 20 лет	6,86	8,65 ↑	126 %	Моносомия 7	12
3. 23 года	6,29	5,02 ↓	80 %	Моносомия 7	3
4. 36 лет	6,56	5,94 ↓	90 %	Трисомия 8	3
5. 30 лет	6,34	4,07 ↓	65 %	46,XX[20] / 92,XXXX[10]	12

\*у больного №2 на момент диагностики был выявлен клон с трисомией 8, а на фоне терапии отмечено появление второго патологического клона с моносомией 7 и признаков миелодисплазии в костном мозге.

Отдельного внимания заслуживает больной №3. По мере выявления клона с моносомией 7 (СЦИ, FISH) и достижения ГУ, отмечалось снижение ОДТ с 6,29 до 5,02. При наблюдении за больным в течении последующего года была отмечена стойкая элиминация клона с моносомией 7 (нормальный кариотип по данным СЦИ, отсутствие аномалий хромосомы 7 по данным FISH-исследования), сохранялся ответ на лечение. При этом было отмечено восстановление ОДТ до нормальных значений (7,68). Значения изменения ДТ на фоне терапии у больных АА изображены на рисунке 21.

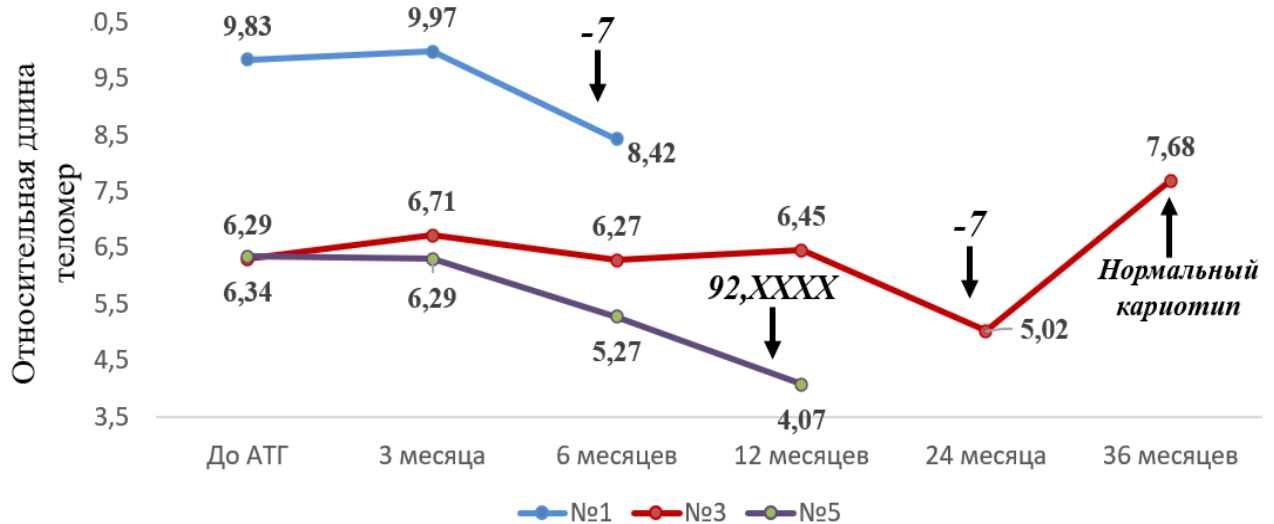


Рисунок 21 – Значения изменения ОДТ мононуклеаров крови у больных №1, 3, 6 в процессе лечения и при появлении новых патологических клонов

Таким образом, не выявлено статистически достоверных различий изменений ДТ мононуклеаров крови и костного мозга у больных АА в динамике (медиана наблюдения 22 месяца (3-46)). По мере выявления новых хромосомных aberrаций отмечалось дополнительное уменьшение ДТ. У одного больного зафиксировано восстановление ДТ после спонтанной элиминации патологического клона с моносомией 7 и достижения ремиссии.

### 3.9. Сравнение относительной и абсолютной длины теломер между группами больных апластической анемией в дебюте заболевания и больных с длительным анамнезом рефрактерности к лечению

Следующим этапом исследования была изучена ДТ у больных АА, рефрактерных к ИСТ (далее рефрактерная апластическая анемия (РАА)), то есть с неэффективностью проведенных двух курсов АТГ в сочетании с ЦС. Средняя величина ОДТ в этой группе составила 5,8 (4,5-6,9), что достоверно меньше, чем в группе больных АА до лечения ( $p = 0,004$ ). Среднее значение АДТ у больных РАА составило 6,55 тыс. п.н. (4,08-9,44), что также было значимо меньше по

сравнению с группой АА до начала лечения ( $p = 0,038$ ). ОДТ у больных АА на 12 месяце ИСТ, которые достигли ГУ или ремиссию заболевания (16 из 20 больных; средняя ОДТ 7,82; диапазон 6,2-16,5) была достоверно больше по сравнению с больными РАА ( $p = 0,01$ ).

Графики сравнения ДТ у больных АА до начала лечения и у больных РАА представлены на Рисунке 22.

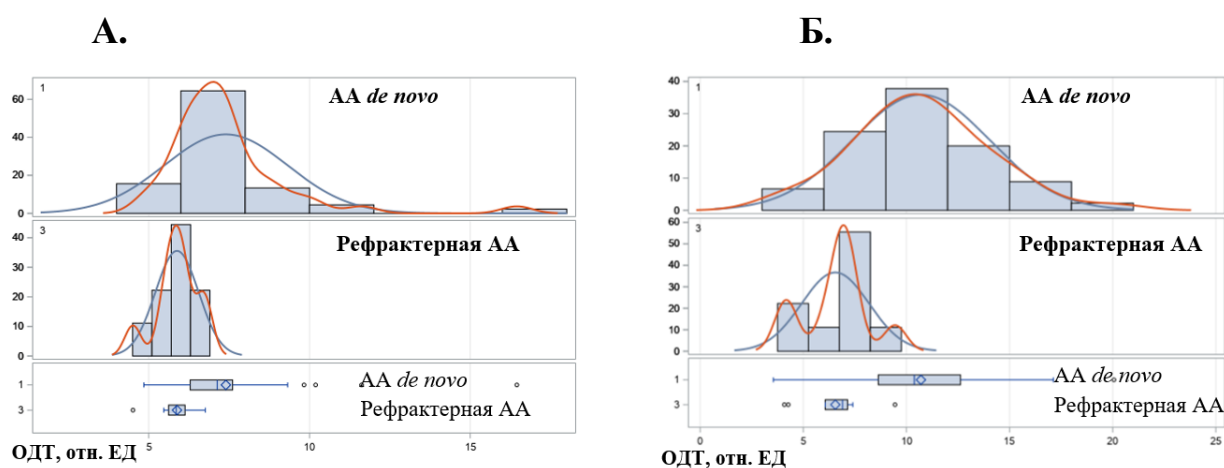


Рисунок 22 - Распределение и сравнение относительной (А) и абсолютной (Б) длины теломер мононуклеаров периферической крови в группах больных апластической анемией до лечения (1) и при развитии рефрактерности к ИСТ (3)

При сравнении средней ОДТ и АДТ между больными РАА и ВД было показано, что ДТ достоверно меньше у больных ВД ( $p < 0,05$ ).

Сделан вывод о том, что относительная и абсолютная ДТ у больных АА, рефрактерных к ИСТ достоверно меньше по сравнению с больными АА в проспективном исследовании до начала лечения, но больше чем у больных ВД.

Таким образом, диссертационная работа посвящена изучению ОДТ и АДТ у больных АА и у доноров, при сравнении которых были получены сопоставимые результаты. Проведена оценка ДТ в разных диагностических материалах и клеточных популяциях, а также в зависимости от тяжести и длительности болезни. При анализе ДТ больных АА до начала лечения и в группах сравнения было обнаружено значимое уменьшение ДТ у больных ВД и РАА. По данным

многофакторного и однофакторного анализа определены факторы риска, связанные с частотой достижения ГУ (тяжесть и длительность заболевания) и ремиссии заболевания (количество CD34+ клеток в костном мозге, исходная относительная и абсолютная ДТ). Не было выявлено изменений ДТ у больных АА в процессе ИСТ по сравнению с исходными данными.

## Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ

Основными звеньями патогенеза АА являются иммунные механизмы подавления нормальной функции ГСК за счет прямой или косвенной Т-клеточной аутоиммунной агрессии. Помимо этого, активно изучаются и внутренние дефекты клеток предшественников гемопоэза, которые могут вносить значительный вклад в развитие АА. Одним из основных механизмов в этом направлении рассматривается патологическое укорочение теломерных районов ДНК. Помимо конституциональных аплазий костного мозга, при которых мутации в генах теломеразного комплекса приводят к снижению пролиферации ГСК, уменьшение ДТ может выявляться у 5-25% больных с приобретенной АА [15; 24; 72; 96]. Прогностическое значение исходной ДТ и ее изменений в процессе терапии изучено недостаточно. Предполагается, что короткие теломеры ассоциированы с плохим ответом на лечение, высокой частотой рецидивов и клональных осложнений.

Существует несколько методик определения ДТ, многие из которых плохо воспроизводимы в клинической практике и имеют ряд ограничений. Flow-FISH является высокоспецифичным тестом, позволяющим быстро (срок выполнения исследования двое суток) определить ОДТ. Недостатком методики является отсутствие возможности для определения абсолютных значений ДТ [4; 96]. Изучения АДТ позволяет проводить точное сравнение как между разными группами внутри одной лаборатории, так и сопоставлять полученные данные с результатами других исследований. В рамках диссертационной работы был разработан алгоритм пересчета ОДТ в абсолютные значения при помощи сопоставления двух методов: flow-FISH и ПЦР для возможности выполнения поставленных задач.

Основной целью работы было определение относительной и абсолютной ДТ у больных АА методом flow-FISH, как до начала ИСТ, так и в процессе лечения, в том числе по мере развития клинического улучшения или рефрактерности.

Нет опубликованных данных о сравнении ДТ в клетках периферической крови и костного мозга у больных АА. В коротком отчете Jennette A. Sakoff и соавторов, исследовавших 19 взрослых онкологических больных, было показано, что нет достоверных различий между ДТ мононуклеаров крови и костного мозга. Более того, ДТ выделенных CD34+ клетках костного мозга была также эквивалентна ДТ мононуклеаров периферической крови [82]. В нашем исследовании было отобрано 20 образцов мононуклеаров периферической крови и аспирата костного мозга больных АА до начала лечения. Получены данные, которые свидетельствуют о том, что ДТ в этих биологических материалах сопоставима. Так средняя ОДТ мононуклеаров крови составила 6,97, а костного мозга – 6,82. АДТ составила 11,6 и 11,0 тыс. п.н. соответственно. Таким образом, исследование мононуклеаров крови позволяет определить степень истощения теломер и остаточный пролиферативный потенциал в клетках костного мозга, в том числе и стволовых. Можно сделать вывод о предпочтительном использовании клеток периферической крови ввиду простоты и безопасности методики ее забора.

По результатам ранее опубликованных исследований и в нашей работе относительная и абсолютная ДТ мононуклеаров больных АА была сопоставима с этими показателями в сформированной группе здоровых доноров [72]. Известен факт, что теломеры укорачиваются с возрастом [48; 70]. То же было продемонстрировано и в нашем исследовании как для группы здорового контроля, так и для группы больных АА. Этот феномен объясняется накоплением в течение жизни соматических мутаций, что приводит к снижению активности теломеразного комплекса.

В работе Helene Roelofs [43], оценивающей изменения ДТ в различных клеточных популяциях у больных со злокачественными новообразованиями после проведения алло-ТГСК, было показано, что гранулоциты, моноциты и В-лимфоциты крови имели схожие темпы укорочения теломер вследствие пролиферативного стресса трансплантированных стволовых клеток донора с последующим восстановлением до исходных значений в течение года. Несколько другая картина была выявлена по отношению к Т-клеткам памяти, ДТ которых в



течение первого года была значительно больше по сравнению с остальными популяциями, так как именно они имели происхождение от стволовых клеток реципиента и не были подвержены воздействию стрессовой пролиферации. В ранних исследованиях для определения ДТ у больных АА использовались лимфоциты и мононуклеары [15]. В последующем также изучались гранулоциты [47; 54]. Существует ряд ограничений для исследования ДТ в клеточных популяциях крови больных АА. Большой проблемой является изучение гранулоцитов ввиду глубокой нейтропении при ТАА и невозможности выделения достаточного количества исследуемых клеток. Так, для методики flow-FISH необходимо около двух миллионов клеток исследуемого образца и контрольной культуры. Другой проблемой являются трудности для замораживания и хранения гранулоцитов с целью одномоментного определения ДТ в материале, заготовленном на различных сроках лечения одного больного. Что немаловажно, при проведении цитометрического исследования могут возникнуть трудности при разделении мононуклеаров на моноциты и лимфоциты из-за низкой клеточности получаемых проб, добавления флуоресцирующего РНА-зонда и схожих показателей бокового светорассеяния. Более того, фракция мононуклеаров у больных АА в основном представлена лимфоцитами. В рамках данной диссертационной работы было выполнено сравнение ДТ в мононуклеарах, моноцитах и лимфоцитах у здоровых доноров и больных АА. Выявлено, что данный показатель был сопоставим между различными популяциями клеток периферической крови и костного мозга. Таким образом, был сделан вывод о том, что оптимальным материалом для исследования ДТ у больных АА являются мононуклеары периферической крови ввиду простоты выделения их фракции, заморозки, хранения и отсутствия необходимости дополнительного деления на клеточные популяции при использовании метода.

Как описано ранее (глава «Обзор литературы»), определение ДТ является важным диагностическим критерием для постановки диагноза ВД. В детском и взрослом возрасте зачастую сложно дифференцировать конституциональный характер аплазии костного мозга от приобретенной АА. При этом клиническая

манифестация ВД часто возникает в возрасте старше 16 лет (медиана может достигать 26 лет) [22]. Несмотря на то, что короткие теломеры можно выявить в 5-25% случаев приобретенной АА, это укорочение, как правило, выражено не в такой степени, как при врожденных синдромах костно-мозговой недостаточности, в первую очередь, как при ВД [24]. В нашем исследовании относительная и абсолютная ДТ была определена у 5 взрослых больных ВД, не получавших ранее лечение андрогенами, такими как даназол. Средняя ОДТ составила 3,57 (диапазон 3,0-3,97), что достоверно меньше ( $p = 0,006$ ), чем в основной группе больных АА. Более того, «ультракороткие теломеры» (ОДТ <1-го перцентиля здорового контроля) определялись у всех больных ВД и не были выявлены ни у одного больного с приобретенной АА. Таким образом, определение ДТ остается одним из основных показателей, используемых при проведении дифференциальной диагностики между приобретенной АА и врожденными синдромами костномозговой недостаточности, наряду с фенотипическими особенностями и молекулярными методиками. Преимуществом метода является его воспроизводимость и короткие сроки выполнения исследования.

Предполагалось, что ДТ может быть различна в зависимости от тяжести АА. В исследовании Tim H. Brummendorf была показана прямая корреляция ДТ в гранулоцитах и лимфоцитах больных АА с показателями периферической крови (лейкоциты, нейтрофилы, тромбоциты, гемоглобин) [83]. Это может объясняться тем, что при ТАА пул стволовых клеток предшественников значительно редуцирован. В таком случае увеличиваются темпы пролиферации остаточных функциональных ГСК, что ведет к более быстрому истощению теломер. Однако, в нашем исследовании не получены данные, указывающие на корреляцию относительной и абсолютной ДТ с тяжестью болезни. Средняя ОДТ при нетяжелой форме АА составила 7,83 (диапазон 4,9-11,6), а при тяжелой – 7,23 (диапазон 5,1-10,2). АДТ составила 10,8 (диапазон 4,6-20,1) и 11,04 (диапазон 4,9-15,7) тыс.п.н. соответственно. Даже у больных с исходным количеством гранулоцитов менее  $0,2 \times 10^9/\text{л}$  (СТАА) относительная (7,67; диапазон 5,3-16,5) и абсолютная (9,95; диапазон 3,6-17,1 тыс.п.н.) ДТ была сопоставима с группой

больных нетяжелой формой. При этом медиана времени от появления симптомов болезни до начала лечения для НАА и СТАА была разной (7 и 4 месяца соответственно). Возможно, именно временной фактор определяет степень истощения теломер в условиях пролиферативного стресса и нивелирует количественное и качественное подавление ГСК. Показано, что при длительности заболевания более 6 месяцев ОДТ была значительно короче (среднее 6,72), чем при более коротком сроке наблюдения (среднее 7,97) ( $p = 0,032$ ).

По данным проведенного пошагового многофакторного анализа с последующим однофакторным анализом наиболее информативных факторов риска показано, что на достижение гематологического улучшения АА влияла длительность и тяжесть заболевания (исходное количество нейтрофилов, лимфоцитов и концентрация гемоглобина), а на достижение ремиссии – количество CD34+ клеток в костном мозге до начала лечения, а также относительная и абсолютная ДТ ( $p < 0,05$ ). Эти параметры косвенно указывают на остаточный пролиферативный потенциал ГСК, что в совокупности с временным фактором и определяет прогноз заболевания.

Последнее десятилетие ДТ рассматривается как предиктор ответа на лечение у больных АА, наряду с традиционно устоявшимися факторами, такими как тяжесть заболевания, наличие ПНГ-клона, цитогенетических aberrаций [15; 47; 54; 80]. Однако накопленных данных недостаточно, чтобы сделать однозначный вывод о влиянии исходной ДТ на частоту достижения общего ответа и ремиссии заболевания. В данном исследовании укорочение ОДТ <10 перцентилей здорового контроля было выявлено всего у 3 больных: у двух из них не получен ответ на лечение, а у третьего – достигнуто улучшение, но не ремиссия заболевания. Для дальнейшего изучения было выделено две группы с более короткими и более длинными теломерами. В группе больных АА с ДТ, соответствующей I-II квартилям здорового контроля, частота достижения ГУ была ниже (53%), по сравнению с группой с ДТ, соответствующей III-IV квартилям (80%), хотя разница не была статистически значимой ( $p = 0,059$ ). Более короткие теломеры были предиктором низкой частоты достижения частичной (37

против 62%) и полной (5 против 41%) ремиссии АА ( $p = 0,028$  и  $0,003$  соответственно).

Помимо влияния на достижение ГУ и ремиссии АА, все больше данных указывают на корреляцию между укорочением ДТ и развитием хромосомных нарушений, трансформации в МДС и ОМЛ [15; 80]. В диссертационной работе было изучено влияние исходной ДТ на частоту клональных осложнений. Так, у больных с более короткими теломерами чаще отмечалось появление новых хромосомных aberrаций (20%), по сравнению с остальными (5%), однако, различия были достоверно не значимы ( $p = 0,11$ ), вероятно, ввиду малого количества событий. При анализе 5 больных с доказанным появлением хромосомных aberrаций выявлен феномен укорочения ОДТ как минимум на 10% при развитии новых патологических клонов. Само по себе укорочение теломер и их дисфункция приводит к нестабильности генома, и, как следствие, к высокой частоте развития гематологических, в том числе МДС, и солидных опухолей [65; 70]. С другой стороны, развитие миелопролиферативных заболеваний ведет к избыточной пролиферации мутированных ГСК. Таким образом, имеющееся в ряде случаев АА клональное кроветворение, также может ускорять изнашивание теломер, тем самым вызывая появление новых мутаций и хромосомных поломок.

Как было описано ранее, укорочение теломер не коррелирует с частотой развития гемолитической ПНГ у больных АА [15; 47]. По нашим данным, частота развития ПНГ была также сопоставима (15% для группы с более короткими теломерами и 9% - с более длинными;  $p = 0,52$ ). При проведении многофакторного и однофакторного анализа было выявлено, что на частоту развития ПНГ влияли размер ПНГ-клона на гранулоцитах более 10% и концентрация ретикулоцитов более  $20 \times 10^9/\text{л}$ . Это может свидетельствовать о том, что уже на момент диагностики имеется активное клональное кроветворение со склонностью к развитию хронического внутрисосудистого гемолиза.

Впервые было проведено проспективное исследование ДТ у больных АА в динамике. Получены данные, свидетельствующие о том, что средняя ДТ мононуклеаров крови на фоне ИСТ не изменялась в течении двух лет наблюдения

(+3, +6, +12, +24 месяца от начала лечения). К году и двум годам терапии выявлена тенденция к снижению относительной и абсолютной ДТ у больных АА, хотя достоверных различий не получено ( $p > 0,05$ ). Возможно, это является проявлением возрастающих темпов пролиферации ГСК в ответ на ИСТ. При этом в группе здоровых добровольцев, мононуклеары крови которых исследовались в течение года, значимых колебаний ДТ не отмечено. Похожие результаты получены и при изучении мононуклеаров костного мозга больных АА. Также было показано, что ДТ остается стабильной в процессе терапии, вне зависимости от исходной ОДТ до лечения.

У больных АА в дебюте заболевания по сравнению с группой больных РАА (длительный анамнез рефрактерности к ИСТ) ДТ была достоверно больше. Вероятно, продолжительный период дефектного кроветворения без ответа на лечение ведет к критическому изнашиванию теломер и увеличивающейся частоте клональных осложнений, что коррелирует с длительностью болезни. Ранее уже было показано, что вероятность клональной эволюции увеличивается с длительностью наблюдения вне ремиссии [17]. С другой стороны, именно больные с исходно короткими теломерами могли с большей долей вероятности в последующем не достичь ответа на лечение.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диагностика и лечение апластической анемии по-прежнему являются актуальными задачами в современной гематологии. Аномальный иммунный ответ и внутренние дефекты гемопоэтических стволовых кроветворных клеток остаются основными направлениями изучения патогенеза заболевания. Патологическое укорочение теломер может влиять на достижение гематологического улучшения и ремиссии апластической анемии, а также ассоциировано с развитием клональных нарушений, таких как появление новых хромосомных aberrаций и трансформация в миелодиспластический синдром.

С помощью методики flow-FISH возможно определение как относительной, так и абсолютной длины теломер. Это позволяет выделить группы больных с исходного короткими и длинными теломерами, а также проводить точную дифференциальную диагностику между конституциональными аплазиями костного мозга, в том числе врожденным дискератозом и приобретенной апластической анемией.

Дальнейшее изучение изменений длины теломер в процессе терапии позволит более детально оценить пролиферативную активность гемопоэтических стволовых клеток на разных этапах лечения, в том числе при достижении ответа или развитии рефрактерности. Представляют интерес и наблюдения за колебаниями длины теломер по мере появления и персистенции новых патологических клонов.

## ВЫВОДЫ

1. Относительная и абсолютная длина теломер у больных апластической анемией и у доноров, определенная методом flow-FISH, была сопоставима в мононуклеарах, лимфоцитах, моноцитах периферической крови и костного мозга.

2. Установлено, что у больных приобретенной апластической анемией длина теломер значительно больше по сравнению с больными врожденным дискератозом ( $p=0,006$ ), что может быть использовано для проведения дифференциальной диагностики, наряду с фенотипическими особенностями и молекулярными методами исследования.

3. Отмечено, что относительная и абсолютная длина теломер достоверно не различалась при разных формах апластической анемии (нетяжелая и тяжелая), но зависела от длительности заболевания до начала иммуносупрессивной терапии: при сроке более 6 месяцев среднее значение ОДТ составило 6,72 (4,8-7,5), а при менее 6 месяцев - 7,97 (5,7-16,4) ( $p=0,032$ ).

4. Определение исходно более коротких теломер (соответствующих I-II квартилям здорового контроля) у больных апластической анемией может служить дополнительным фактором неблагоприятного прогноза ответа на иммуносупрессивную терапию.

5. При изучении длины теломер мононуклеаров крови и костного мозга у больных апластической анемией в течение двух лет терапии не обнаружено статистически достоверных изменений по сравнению с исходными данными.

6. Относительная длина теломер у больных апластической анемией до начала лечения (среднее 7,2; диапазон 4,9-16,4), а также у больных, достигнувших гематологическое улучшение (среднее 7,82; диапазон 6,2-16,5), была значительно больше по сравнению с этим показателем у больных, не ответивших ранее на иммуносупрессивную терапию (среднее 5,8; диапазон 4,5-6,9).

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Определение относительной и абсолютной ДТ рекомендовано на этапах дифференциальной диагностики между приобретенной АА и ВД у взрослых больных, в совокупности с фенотипическими особенностями и молекулярными методиками. Методика flow-FISH воспроизводима, обладает высокой специфичностью и может быть использована в клинической практике, а исследование возможно выполнить в короткие сроки. Исследование ДТ у взрослых больных с костномозговой недостаточностью целесообразно проводить в мононуклеарах периферической крови.

2. Проведение исследования по измерению ДТ у больных АА до начала ИСТ рекомендовано с целью обнаружения возможного исходного укорочения теломер, что, в совокупности с другими традиционными факторами риска (возраст, тяжесть заболевания, наличие ПНГ-клона, некоторых хромосомных aberrаций), позволяет прогнозировать ответ на лечение и выбрать наиболее подходящую тактику терапии (ИСТ, алло-ТГСК).



**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ**

- АА – апластическая анемия
- АДТ – абсолютная длина теломер
- Алло-ТГСК – трансплантация аллогенных гемопоэтических стволовых клеток
- АТГ – антиtimoцитарный глобулин
- АФ – анемия Фанкони
- ВД – врожденный дискератоз
- ГСК – гемопоэтические стволовые клетки
- ГУ – гематологическое улучшение
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
- ДТ – длина теломер
- ИСТ – иммуносупрессивная терапия
- ИНФ- $\gamma$  - интерферон- $\gamma$
- ИЛ - интерлейкин
- ИЛФ – идиопатический легочный фиброз
- КГУ – клиничко-гематологическое улучшение
- МДС – миелодиспластический синдром
- НАА – нетяжелая апластическая анемия
- ОДТ – относительная длина теломер
- ОМЛ – острый миелоидный лейкоз
- Отн. Ед. – относительные единицы
- ПНГ – пароксизмальная ночная гемоглобинурия
- ПР – полная ремиссия
- ПЦР – полимеразная цепная реакция
- РАА – рефрактерная апластическая анемия
- РНК – рибонуклеиновая кислота
- РТПХ – реакция трансплантат против хозяина
- СТАА - сверттяжелая апластическая анемия

СЦИ – стандартное цитогенетическое исследование

ТАА – тяжелая апластическая анемия

ТПО – тромбопоэтин

Тыс. п.н. – тысяч пар нуклеотидов

ФНО- $\alpha$  - фактор некроза опухоли- $\alpha$

ХЛЛ – хронический лимфолейкоз

ЦС – циклоспорин

ЧР – частичная ремиссия

CD (англ. Cluster of differentiation) – кластер дифференцировки

CN-LOH (англ. copy-number neutral loss of heterozygosity on chromosome) – потеря гетерозиготности количественно нейтральная

FISH – флуоресцентная гибридизация *in situ*

HLA (англ. human leukocyte antigen) – человеческий лейкоцитарный антиген

Ig (англ. Immunoglobulin) - иммуноглобулин

NGS (англ. next-generation sequencing) – секвенирование нового поколения

NK (англ. natural killer) – естественные киллеры

PD-1 (англ. Programmed Death-1) – белок запрограммированной клеточной гибели

PNA (англ. peptid nucleic acid) – пептид-нуклеиновая кислота

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Динамика ПНГ-клона у больных у больных апластической анемией в процессе иммуносупрессивной терапии / З. Т. Фидарова, Е. А. Михайлова, С. А. Луговская [и др.] // Клиническая лабораторная диагностика. – 2016. – Т. 2016. – № 8. – С. 490-494. DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-8-490-494.
2. Длина теломеров как биомаркер риска сердечно-сосудистых осложнений у больных ишемической болезнью сердца / Н. А. Дорошук, В. З. Ланкин, А. К. Тихазе [и др.] // Терапевтический архив. – 2021. – Т. 93. – № 1. – С. 20-24. DOI: 10.26442/00403660.2021.01.200588.
3. Драпкина О. М. Современные представления о роли теломер и теломеразы в патогенезе гипертонической болезни / О. М. Драпкина, Р. Н. Шепель // Артериальная гипертензия. – 2013. – Т. 19. – № 4. – С. 280-298. DOI: 10.18705/1607-419X-2013-19-4-280-298.
4. Измерение абсолютной длины теломер методом проточной цитометрии / А. И. Дёмина, А. А. Семченкова, З. Р. Кагирова, А. М. Попов // Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. – 2018. – Т. 0. – № 0. – С. 1-7. DOI: 10.24287/1726-1708-0-0-0-1-7.
5. Клинические рекомендации по диагностике и лечению апластической анемии (редакция 2019 г.) / Е. А. Михайлова, З. Т. Фидарова, В. В. Троицкая [и др.] // Гематология и трансфузиология. – 2020. – Т. 65. – № 2. – С. 208-226. DOI: 10.35754/0234-5730-2020-65-2-208-226.
6. Кондратьева Ю. А. Характеристика длины теломер у пациентов с онкогематологическими заболеваниями (обзор литературы) / Ю. А. Кондратьева, Л. П. Менделеева // Онкогематология. – 2021. – Т. 16. – № 1. – С. 23-30. DOI: 10.17650/1818-8346-2021-16-1-23-30.
7. Олигоклональность и субпопуляционная структура Т-клеток костного мозга у больных апластической анемией / А. В. Абрамова, И. В. Гальцева, Е. А. Михайлова [и др.] // Гематология и трансфузиология. – 2020. – Т. 65. – № 4. –

C. 417-430. DOI: 10.35754/0234-5730-2020-65-4-417-430.

8. Особенности изменения средней длины теломер в лимфоцитах у больных бронхиальной астмой / В. И. Борисов, С. А. Демаков, В. М. Непомнящих [и др.] // Медицинская иммунология. – 2014. – Т. 11. – № 6. – С. 523-530. DOI: 10.15789/1563-0625-2009-6-523-530.

9. Сопоставление методов полимеразной цепной реакции и проточной цитометрии для измерения длины теломер лейкоцитов человека / И. В. Гальцева, М. Л. Филипенко, Ю. О. Давыдова [и др.] // Клиническая лабораторная диагностика. – 2021. – Т. 66. – № 3. – С. 154-159. DOI: 10.51620/0869-2084-2021-66-3-154-159.

10. Фидарова З. Т. Наличие клона пароксизмальной ночной гемоглобинурии и другие факторы, влияющие на эффективность иммуносупрессивной терапии у больных идиопатической апластической анемией / З. Т. Фидарова, А. В. Абрамова, А. В. Лучкин // Гематология и трансфузиология. – 2019. – Т. 64. – № 3. – С. 342-352. DOI: 10.35754/0234-5730-2019-64-3-342-352.

11. A mutation in the POT1 gene is responsible for cardiac angiosarcoma in TP53-negative Li–Fraumeni-like families / O. Calvete, P. Martinez, P. Garcia-Pavia [et al.] // Nature Communications 2015 6:1. – 2015. – Vol. 6. – № 1. – P. 1-12. DOI: 10.1038/ncomms9383.

12. Acute Myeloid Leukemia: The Good, the Bad, and the Ugly / A. Kuykendall, N. Duployez, N. Boissel [et al.] // American Society of Clinical Oncology Educational Book. – 2018. – № 38. – P. 555-573. DOI: 10.1200/EDBK\_199519.

13. Aronen T. Telomere Length in Norway Spruce during Somatic Embryogenesis and Cryopreservation / T. Aronen, S. Virta, S. Varis // Plants 2021. – 2021. – Vol. 10. – № 2. – P. 416. DOI: 10.3390/PLANTS10020416.

14. Association between telomere length and BCL2 gene rearrangements in low- and high-grade non-Hodgkin lymphomas / H. C. AS, N. MF, N. M [et al.] // Cancer genetics and cytogenetics. – 2006. – Vol. 171. – № 1. – P. 1-8. – DOI: 10.1016/J.CANCERGENCYTO.2006.05.016.

15. Association of telomere length of peripheral blood leukocytes with hematopoietic

- relapse, malignant transformation, and survival in severe aplastic anemia / P. Scheinberg, J. N. Cooper, E. M. Sloand [et al.] // *JAMA*. – 2010. – Vol. 304. – № 12. – P. 1358-1364. DOI: 10.1001/jama.2010.1376.
16. Associations between circulating sex steroid hormones and leukocyte telomere length in men in the National Health and Nutrition Examination Survey / S. B. Coburn, B. I. Graubard, B. Trabert [et al.] // *Andrology*. – 2018. – Vol. 6. – № 4. – P. 542-546. DOI: 10.1111/andr.12494.
17. Bacigalupo A. How I treat acquired aplastic anemia / A. Bacigalupo // *Blood*. – 2017. – Vol. 129. – № 11. – P. 1428-1436. DOI: 10.1182/BLOOD-2016-08-693481.
18. Structural stability and chromosome-specific telomere length is governed by cis-acting determinants in humans / B. Britt-Compton, J. Rowson, M. Locke [et al.] // *Human molecular genetics*. – 2006. – Vol. 15. – № 5. – P. 725-733. DOI: 10.1093/hmg/ddi486.
19. Brzeźniakiewicz-Janus K. Acquired Aplastic Anemia as a Clonal Disorder of Hematopoietic Stem Cells / K. Brzeźniakiewicz-Janus, J. Rupa-Matysek, L. Gil // *Stem Cell Reviews and Reports*. – 2020. – Vol. 16. – № 3. – P. 472. DOI: 10.1007/S12015-020-09971-Y.
20. Burla R. Mammalian telomeres and their partnership with lamins / R. Burla, M. La Torre, I. Saggio // *Nucleus*. – 2016. – Vol. 7. – № 2. – P. 187. DOI: 10.1080/19491034.2016.1179409.
21. *Caenorhabditis elegans* POT-1 and POT-2 repress telomere maintenance pathways / L. Shtessel, M. R. Lowden, C. Cheng [et al.] // *G3: Genes, Genomes, Genetics*. – 2013. – Vol. 3. – № 2. – P. 305-313. DOI: 10.1534/g3.112.004440.
22. Cancer in the National Cancer Institute inherited bone marrow failure syndrome cohort after fifteen years of follow-up / B. P. Alter, N. Giri, S. A. Savage, P. S. Rosenberg // *Haematologica*. – 2018. – Vol. 103. – № 1. – P. 30. DOI: 10.3324/HAEMATOL.2017.178111.
23. A. Chandra. Cdc13 both positively and negatively regulates telomere replication / A. Chandra, T. R. Hughes, C. I. Nugent, V. Lundblad // *Genes and Development*. – 2001. – Vol. 15. – № 4. – P. 404-414. DOI: 10.1101/gad.861001.

24. Clinical diagnostic value of telomere length measurement in inherited bone marrow failure syndromes / S. Miwata, A. Narita, Y. Okuno [et al.] // *Haematologica*. – 2021. – Vol. 106. – № 9. – P. 2511. DOI: 10.3324/HAEMATOL.2021.278334.
25. Correlation of telomere length shortening with promoter methylation profile of p16/Rb and p53/p21 pathways in breast cancer / R. Radpour, Z. Barekati, M. M. Haghghi [et al.] // *Modern pathology: an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc.* – 2010. – Vol. 23. – № 5. – P. 763-772. DOI: 10.1038/MODPATHOL.2009.195.
26. Danazol Treatment for Telomere Diseases / D. M. Townsley, B. Dumitriu, D. Liu [et al.] // *The new England journal of medicine*. – 2016. – Vol. 374. – № 20. – P. 1922-1931. DOI: 10.1056/NEJMOA1515319.
27. David Green M. P. Eltrombopag for Aplastic Anemia / M. P. David Green // *NEJM Journal Watch*. – 2017. – Vol. 2017. DOI: 10.1056/NEJM-JW.NA43873.
28. Decoding telomere protein Rap1: Its telomeric and nontelomeric functions and potential implications in diabetic cardiomyopathy / Y. Cai, V. Kandula, R. Kosuru [et al.] // *Cell Cycle*. – 2017. – Vol. 16. – № 19. – P. 1765-1773. DOI: 10.1080/15384101.2017.1371886.
29. Deng Z. Telomeres and viruses: common themes of genome maintenance / Z. Deng, Z. Wang, P. M. Lieberman. – Text : electronic // *Frontiers in Oncology*. – 2012. – Vol. 2. DOI: 10.3389/fonc.2012.00201.
30. Direct Comparison of Flow-FISH and qPCR as Diagnostic Tests for Telomere Length Measurement in Humans / F. Gutierrez-Rodrigues, B. A. Santana-Lemos, P. S. Scheucher [et al.] // *PLOS ONE*. – 2014. – Vol. 9. – № 11. – P. e113747. DOI: 10.1371/JOURNAL.PONE.0113747.
31. Dynamics of TRF1 organizing a single human telomere / X. Li, M. Wang, W. Zheng [et al.] // *Nucleic Acids Research*. – 2021. – Vol. 49. – № 2. – P. 760-775. DOI: 10.1093/NAR/GKAA1222.
32. Elevated telomerase activity and minimal telomere loss in cord blood long-term cultures with extensive stem cell replication / L. Gammaitoni, K. C. Weisel, M. Gunetti [et al.] // *Blood*. – 2004. – Vol. 103. – № 12. – P. 4440-4448. DOI: 10.1182/blood-

2003-09-3079.

33. Eltrombopag fails to improve severe thrombocytopenia in late-stage dyskeratosis congenita and diamond-blackfan-anaemia / K. Trautmann, C. Jakob, U. von Grünhagen [et al.] // *Thrombosis and Haemostasis*. – 2017. – Vol. 108. – № 08. – P. 397-398. DOI: 10.1160/TH12-02-0121.
34. Emergence of Clonal Hematopoiesis in the Majority of Patients with Acquired Aplastic Anemia / D. V. Babushok, N. Perdignes, J. C. Perin [et al.] // *Cancer genetics*. – 2015. – Vol. 208. – № 4. – P. 115. DOI: 10.1016/J.CANCERGEN.2015.01.007.
35. Fernández García M. S. The diagnosis and treatment of dyskeratosis congenita: A review / M. S. Fernández García, J. Teruya-Feldstein // *Journal of blood medicine*. – 2014. – Vol. 5. – P. 157-167. DOI: 10.2147/JBM.S47437.
36. Genetic analyses of aplastic anemia and idiopathic pulmonary fibrosis patients with short telomeres, possible implication of DNA-repair genes / E. G. Arias-Salgado, E. Galvez, L. Planas-Cerezales [et al.] // *Orphanet Journal of Rare Diseases*. – 2019. – Vol. 14. – № 1. DOI: 10.1186/s13023-019-1046-0.
37. Gramatges M. M. Short telomeres: From dyskeratosis congenita to sporadic aplastic anemia and malignancy / M. M. Gramatges, A. A. Bertuch // *Translational Research*. – 2013. – Vol. 162. – № 6. – P. 353-363. DOI: 10.1016/j.trsl.2013.05.003.
38. Guidelines for the diagnosis and management of adult aplastic anaemia / S. B. Killick, N. Bown, J. Cavenagh [et al.] // *British journal of haematology*. – 2016. – Vol. 172. – № 2. – P. 187-207. DOI: 10.1111/bjh.13853.
39. Guidelines for the diagnosis and management of aplastic anaemia / J. C. W. Marsh, S. E. Ball, J. Cavenagh [et al.] // *British Journal of Haematology*. – 2009. – Vol. 147. – № 1. – P. 43-70. DOI: 10.1111/J.1365-2141.2009.07842.X.
40. Harley C. B. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts / C. B. Harley, A. B. Futcher, C. W. Greider // *Nature* 1990 345:6274. – 1990. – Vol. 345. – № 6274. – P. 458-460. DOI: 10.1038/345458a0.
41. Heterodimerization of TPO and IFN $\gamma$  Impairs Human Hematopoietic Stem/Progenitor Cell Signaling and Survival in Chronic Inflammation / L. J. Alvarado, A. Andreoni, H. D. Huntsman [et al.] // *Blood*. – 2017. – Vol. 130. – № Supplement 1. –

P. 4-4. DOI: 10.1182/BLOOD.V130.SUPPL\_1.4.4.

42. High-throughput telomere length quantification by FISH and its application to human population studies / A. Canela, E. Vera, P. Klatt, M. A. Blasco // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2007. – Vol. 104. – № 13. – P. 5300-5305. DOI: 10.1073/PNAS.0609367104.

43. Homeostasis of telomere length rather than telomere shortening after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation / H. Roelofs, E. S. D. De Pauw, A. H. Zwinderman [et al.] // Blood. – 2003. – Vol. 101. – № 1. – P. 358-362. DOI: 10.1182/BLOOD-2002-06-1832.

44. L W. Pathogenesis of aplastic anemia / W. L, L. H // Hematology (Amsterdam, Netherlands). – 2019. – Vol. 24. – № 1. – P. 559-566. DOI: 10.1080/16078454.2019.1642548.

45. Lange T. De. How telomeres solve the end-protection problem / T. De Lange // Science (New York, N.Y.). – 2009. – Vol. 326. – № 5955. – P. 948-952. DOI: 10.1126/SCIENCE.1170633.

46. Lansdorp P. M. Telomeres, aging, and cancer: the big picture / P. M. Lansdorp // Blood. – 2022. – Vol. 139. – № 6. – P. 813-821. DOI: 10.1182/BLOOD.2021014299.

47. Long-Term Outcomes of Accelerated Telomere Shortening in Acquired Aplastic Anemia / A. Kulagin, V. Borisov, N. Pronkina [et al.] // Blood. – 2014. – Vol. 124. – № 21. – P. 4396. DOI: 10.1182/BLOOD.V124.21.4396.4396.

48. Ludlow A. T. Do telomeres adapt to physiological stress? Exploring the effect of exercise on telomere length and telomere-related proteins / A. T. Ludlow, L. W. Ludlow, S. M. Roth // BioMed Research International. – 2013. – Vol. 2013. DOI: 10.1155/2013/601368.

49. Martínez P. Telomere-driven diseases and telomere-targeting therapies / P. Martínez, M. A. Blasco // The Journal of Cell Biology. – 2017. – Vol. 216. – № 4. – P. 875. DOI: 10.1083/JCB.201610111.

50. McNally E. J. Long telomeres and cancer risk: The price of cellular immortality / E. J. McNally, P. J. Luncsford, M. Armanios // Journal of Clinical Investigation. – 2019. – Vol. 129. – № 9. – P. 3474-3481. DOI: 10.1172/JCI120851.



51. miR-144-3p Suppresses Osteogenic Differentiation of BMSCs from Patients with Aplastic Anemia through Repression of TET2 / N. Li, L. Liu, Y. Liu [et al.] // *Molecular Therapy. Nucleic Acids.* – 2020. – Vol. 19. – P. 619. DOI: 10.1016/J.OMTN.2019.12.017.
52. Narita A. Biomarkers for predicting clinical response to immunosuppressive therapy in aplastic anemia / A. Narita, S. Kojima // *International Journal of Hematology* 2016 104:2. – 2016. – Vol. 104. – № 2. – P. 153-158. DOI: 10.1007/S12185-016-2009-Z.
53. Novel phosphorylation sites in the *s. cerevisiae* Cdc13 protein reveal new targets for telomere length regulation / Y. Wu, P. A. DiMaggio, D. H. Perlman [et al.] // *Journal of Proteome Research.* – 2013. – Vol. 12. – № 1. – P. 316-327. DOI: 10.1021/pr300408v.
54. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and telomere length predicts response to immunosuppressive therapy in pediatric aplastic anemia / A. Narita, H. Muramatsu, Y. Sekiya [et al.] // *Haematologica.* – 2015. – Vol. 100. – № 12. – P. 1546-1552. DOI: 10.3324/haematol.2015.132530.
55. Peripheral blood lymphocyte telomere length as a predictor of response to immunosuppressive therapy in childhood aplastic anemia / H. Sakaguchi, N. Nishio, A. Hama [et al.] // *Haematologica.* – 2014. – Vol. 99. – № 8. – P. 1312. DOI: 10.3324/HAEMATOL.2013.091165.
56. Pre-transplant short telomeres are associated with high mortality risk after unrelated donor haematopoietic cell transplant for severe aplastic anaemia / Y. Wang, L. J. McReynolds, C. Dagnall [et al.] // *British Journal of Haematology.* – 2019. DOI: 10.1111/bjh.16153.
57. Prognostic role of telomere length in malignancies: A meta-analysis and meta-regression / R. Adam, L. Díez-González, A. Ocaña [et al.] // *Experimental and molecular pathology.* – 2017. – Vol. 102. – № 3. – P. 455-474. DOI: 10.1016/J.YEXMP.2017.05.010.
58. Radiation-associated changes in the length of telomeres in peripheral leukocytes from inpatients with cancer / T. Maeda, K. Nakamura, K. Atsumi [et al.] // *International*

- Journal of Radiation Biology. – 2013. – Vol. 89. – № 2. – P. 106-109. DOI: 10.3109/09553002.2013.734945.
59. Rajavel M. Multiple facets of TPP1 in telomere maintenance / M. Rajavel, M. R. Mullins, D. J. Taylor // *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*. – 2014. – Vol. 1844. – № 9. – P. 1550-1559. DOI: 10.1016/j.bbapap.2014.04.014.
60. Response to Androgen Therapy in Patients with Dyskeratosis Congenita / P. P. Khincha, I. M. Wentzensen, N. Giri [et al.] // *British journal of haematology*. – 2014. – Vol. 165. – № 3. – P. 349. DOI: 10.1111/BJH.12748.
61. Rice C. Structure and function of the telomeric CST complex / C. Rice, E. Skordalakes // *Computational and Structural Biotechnology Journal*. – 2016. – Vol. 14. – P. 161-167. DOI: 10.1016/j.csbj.2016.04.002.
62. Rode L. Long telomeres and cancer risk among 95 568 individuals from the general population / L. Rode, B. G. Nordestgaard, S. E. Bojesen // *International Journal of Epidemiology*. – 2016. – Vol. 45. – № 5. – P. 1634-1643. DOI: 10.1093/ije/dyw179.
63. Rovó A. Diagnosis of acquired aplastic anemia / A. Rovó, A. Tichelli, C. Dufour // *Bone Marrow Transplantation* 2012 48:2. – 2012. – Vol. 48. – № 2. – P. 162-167. DOI: 10.1038/bmt.2012.230.
64. RTEL1 influences the abundance and localization of TERRA RNA / F. Ghisays, A. Garzia, H. Wang [et al.] // *Nature Communications* 2021 12:1. – 2021. – Vol. 12. – № 1. – P. 1-14. DOI: 10.1038/s41467-021-23299-2.
65. Savage S. A. Dyskeratosis Congenita / S. A. Savage, B. P. Alter // *Hematology/oncology clinics of North America*. – 2009. – Vol. 23. – № 2. – P. 215. DOI: 10.1016/J.HOC.2009.01.003.
66. Scheinberg P. Acquired severe aplastic anaemia: how medical therapy evolved in the 20th and 21st centuries / P. Scheinberg // *British Journal of Haematology*. – 2021. DOI: 10.1111/BJH.17403.
67. Scheinberg P. Prognostic value of telomere attrition in patients with aplastic anemia / P. Scheinberg // *International Journal of Hematology*. – 2013. – Vol. 97. – № 5. – P. 553-557. DOI: 10.1007/S12185-013-1332-X/METRICS.
68. Scheinberg P. Recent Advances and Long-Term Results of Medical Treatment of

Acquired Aplastic Anemia: Are Patients Cured? / P. Scheinberg // Hematology/Oncology Clinics of North America. – 2018. – Vol. 32. – № 4. – P. 609-618. DOI: 10.1016/J.HOC.2018.03.003.

69. Sex hormones, acting on the TERT gene, increase telomerase activity in human primary hematopoietic cells / R. T. Calado, W. T. Yewdell, K. L. Wilkerson [et al.] // Blood. – 2009. – Vol. 114. – № 11. – P. 2236-2243. DOI: 10.1182/blood-2008-09-178871.

70. Shamma M. A. Telomeres, lifestyle, cancer, and aging / M. A. Shamma // Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care. – 2011. – Vol. 14. – № 1. – P. 28-34. DOI: 10.1097/MCO.0b013e32834121b1.

71. Shipounova I. Stromal Precursors in the Bone Marrow of Untreated Patients with Severe and Non-Severe Aplastic Anemia Differ in the Proliferative Potential / I. Shipounova // Blood. – 2020. – Vol. 136. – № Supplement 1. – P. 10-10. DOI: 10.1182/blood-2020-139286.

72. Short telomeres result in chromosomal instability in hematopoietic cells and precede malignant evolution in human aplastic anemia / R. T. Calado, J. N. Cooper, H. M. Padilla-Nash [et al.] // Leukemia. – 2012. – Vol. 26. – № 4. – P. 700-707. DOI: 10.1038/leu.2011.272.

73. Somatic Mutations and Clonal Hematopoiesis in Aplastic Anemia / T. Yoshizato, B. Dumitriu, K. Hosokawa [et al.] // The New England journal of medicine. – 2015. – Vol. 373. – № 1. – P. 35. DOI: 10.1056/NEJMOA1414799.

74. Somatic mutations identify a subgroup of aplastic anemia patients who progress to myelodysplastic syndrome / A. G. Kulasekararaj, J. Jiang, A. E. Smith [et al.] // Blood. – 2014. – Vol. 124. – № 17. – P. 2698. DOI: 10.1182/BLOOD-2014-05-574889.

75. Systematic analysis of telomere length and somatic alterations in 31 cancer types / F. P. Barthel, W. Wei, M. Tang [et al.] // Nature Genetics 2017 49:3. – 2017. – Vol. 49. – № 3. – P. 349-357. DOI: 10.1038/ng.3781.

76. Telomerase Cajal body protein 1 depletion inhibits telomerase trafficking to telomeres and induces G1 cell cycle arrest in A549 cells / P. Yuan, Z. Wang, W. Lv [et al.] // Oncology Letters. – 2014. – Vol. 8. – № 3. – P. 1009. DOI:

10.3892/OL.2014.2306.

77. Telomere dysfunction in ageing and age-related diseases / F. Rossiello, D. Jurk, J. F. Passos, F. d'Adda di Fagagna // *Nature Cell Biology* 2022 24:2. – 2022. – Vol. 24. – № 2. – P. 135-147. DOI: 10.1038/s41556-022-00842-x.
78. Telomere length, telomerase reverse transcriptase promoter mutations, and melanoma risk / S. Rachakonda, H. Kong, N. Srinivas [et al.] // *Genes, chromosomes & cancer*. – 2018. – Vol. 57. – № 11. – P. 564-572. DOI: 10.1002/GCC.22669.
79. Telomere length analysis in monocytes and lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus using multi-color flow-FISH / F. Beier, S. Balabanov, C. C. Amberger [et al.] // *Lupus*. – 2007. – Vol. 16. – № 12. – P. 955-962. DOI: 11.1177/0961203307084299.
80. Telomere length and somatic mutations in correlation with response to immunosuppressive treatment in aplastic anaemia / H. S. Park, S. N. Park, K. Im [et al.] // *British Journal of Haematology*. – 2017. – Vol. 178. – № 4. – P. 603-615. DOI: 10.1111/BJH.14691.
81. Telomere length dynamics in human lymphocyte subpopulations measured by flow cytometry / N. Rufer, W. Dragowska, G. Thornbury [et al.] // *Nature Biotechnology*. – 1998. – Vol. 16. – № 8. – P. 743-747. DOI: 10.1038/nbt0898-743.
82. Telomere Length in Haemopoietic Stem Cells can be Determined from that of Mononuclear Blood Cells or Whole Blood / J. A. Sakoff, E. De Waal, M. B. Garg [et al.] // *Leukemia and lymphoma*. – 2009. – Vol. 43. – № 10. – P. 2017-2020. DOI: 10.1080/1042819021000015970.
83. Telomere length in leukocyte subpopulations of patients with aplastic anemia / T. H. Brümmendorf, J. P. Maciejewski, J. Mak [et al.] // *Blood*. – 2001. – Vol. 97. – № 4. – P. 895-900. DOI: 10.1182/blood.V97.4.895.
84. Telomere length is reset during early mammalian embryogenesis / S. Schaezlein, A. Lucas-Hahn, E. Lemme [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2004. – Vol. 101. – № 21. – P. 8034. DOI: 10.1073/PNAS.0402400101.
85. Telomere position effect: Regulation of gene expression with progressive

- telomere shortening over long distances / J. D. Robin, A. T. Ludlow, K. Batten [et al.] // *Genes and Development*. – 2014. – Vol. 28. – № 22. – P. 2464-2476. DOI: 10.1101/gad.251041.114.
86. Telomere shortening, TP53 mutations and deletions in chronic lymphocytic leukemia result in increased chromosomal instability and breakpoint clustering in heterochromatic regions / T. K, F. C, H. W [et al.] // *Annals of hematology*. – 2017. – Vol. 96. – № 9. – P. 1493-1500. DOI: 10.1007/S00277-017-3055-1.
87. Telomere Shortening and Associated Chromosomal Instability in Peripheral Blood Lymphocytes of Patients With Hodgkin's Lymphoma Prior to Any Treatment Are Predictive of Second Cancers / R. M'kacher, A. Bennaceur-Griscelli, T. Girinsky [et al.] // *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*. – 2007. – Vol. 68. – № 2. – P. 465-471. DOI: 10.1016/J.IJROBP.2007.01.050.
88. Telomere shortening and chromosomal instability in myelodysplastic syndromes / L. K, H. L, V. N. K [et al.] // *Genes, chromosomes & cancer*. – 2010. – Vol. 49. – № 3. – P. 260-269. DOI: 10.1002/GCC.20737.
89. Telomeres and telomerase in chronic myeloid leukaemia: impact for pathogenesis, disease progression and targeted therapy / G. Keller, U. Brassat, M. Braig [et al.] // *Hematological Oncology*. – 2009. – Vol. 27. – № 3. – P. 123-129. DOI: 10.1002/HON.901.
90. Telomeres are favoured targets of a persistent DNA damage response in ageing and stress-induced senescence / G. Hewitt, D. Jurk, F. D. M. Marques [et al.] // *Nature Communications*. – 2012. – Vol. 3. DOI: 10.1038/ncomms1708.
91. Telomeres Shorten in Response to Oxidative Stress in Mouse Skeletal Muscle Fibers / A. T. Ludlow, E. E. Spangenburg, E. R. Chin [et al.] // *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*. – 2014. – Vol. 69. – № 7. – P. 821. DOI: 10.1093/GERONA/GLT211.
92. The predictive value of PNH clones, 6p CN-LOH, and clonal TCR gene rearrangement for aplastic anemia diagnosis / Y. B. Shah, S. F. Priore, Y. Li [et al.] // *Blood Advances*. – 2021. – Vol. 5. – № 16. – P. 3216-3226. DOI: 10.1182/BLOODADVANCES.2021004201.

93. The shortening telomere length of T lymphocytes maybe associated with hyperfunction in severe aplastic anemia / C. Wang, T. Zhang, Y. Wang [et al.] // *Molecular Medicine Reports*. – 2018. – Vol. 17. – № 1. – P. 1015. DOI: 10.3892/MMR.2017.8014.
94. The telomerase activator TA-65 elongates short telomeres and increases health span of adult/old mice without increasing cancer incidence / B. B. de Jesus, K. Schneeberger, E. Vera [et al.] // *Aging cell*. – 2011. – Vol. 10. – № 4. – P. 604. DOI: 10.1111/J.1474-9726.2011.00700.X.
95. TIN2 is an architectural protein that facilitates TRF2-mediated trans- and cis-interactions on telomeric DNA / P. Kaur, R. Barnes, H. Pan [et al.] // *Nucleic Acids Research*. – 2021. – Vol. 49. – № 22. – P. 13000-13018. DOI: 10.1093/NAR/GKAB1142.
96. Townsley D. M. Bone marrow failure and the telomeropathies / D. M. Townsley, B. Dumitriu, N. S. Young // *Blood*. – 2014. – Vol. 124. – № 18. – P. 2775. DOI: 10.1182/BLOOD-2014-05-526285.
97. Valent P. ICUS, IDUS, CHIP and CCUS: Diagnostic Criteria, Separation from MDS and Clinical Implications / P. Valent // *Pathobiology: journal of immunopathology, molecular and cellular biology*. – 2019. – Vol. 86. – № 1. – P. 30. DOI: 10.1159/000489042.
98. Ware R. Mutations Within the Piga Gene in Patients With Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria / R. Ware, W. Rosse, T. Howard // *Blood*. – 1994. – Vol. 83. – № 9. – P. 2418-2422. DOI: 10.1182/BLOOD.V83.9.2418.2418.