

Лавриненко В.А., Такун К.В., Минаковская Н.В., Прудников Д.В., Быданов О.И., Алейникова О.В.
Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и
иммунологии, Минск, Беларусь

Lavrinenko V., Takun K., Minakovskaya N., Prudnikov D., Bydanov O., Aleinikova O.
Belarusian Research Center of Pediatric Oncology, Hematology and Immunology, Minsk, Belarus

Полиморфизм гена NOD2/CARD15 ассоциирован с увеличенным риском развития распространенной хронической и стероидрезистентной реакции «трансплантат против хозяина» после аллогенной ТГСК

NOD2/CARD15 gene polymorphisms are associated with
the increased risk of extensive chronic and steroid-resistant
graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell
transplantation

Резюме

Полиморфизмы различных не-HLA генов, включая NOD2/CARD15, которые влияют на иммунный ответ и воспаление, потенциально могут играть роль в развитии РТПХ. Для определения влияния полиморфизмов гена NOD2/CARD15 на исход трансплантации в исследование было включено 80 пациентов и их доноров. Частота полиморфизмов SNP8, SNP12 и SNP13 гена NOD2/CARD15 составила 3,5%, 2,5% и 7,5% соответственно. Наличие данных полиморфизмов у реципиента и/или донора не влияло на общую выживаемость, смертность, связанную с трансплантацией, частоту развития рецидивов и острой РТПХ. Наличие полиморфизмов гена NOD2/CARD15 только у донора было ассоциировано с развитием распространенной формы хронической РТПХ, а также со стероидрезистентной РТПХ.

Ключевые слова: полиморфизмы гена NOD2/CARD15, РТПХ, аллогенная ТГСК, инфекционные осложнения.

Abstract

Polymorphisms of non-HLA genes including NOD2/CARD15 that influence the immune responses and inflammation may play the role in GvHD development. To evaluate the influence of NOD2/CARD15 gene polymorphisms on the outcome, 80 patients and their donors were studied. SNP8, SNP12 and SNP13 alleles of NOD2/CARD15 had a frequency of 3.5%, 2.5% and 7.5%, respectively.

The presence of NOD2/CARD15 polymorphisms in the donor and/or the recipient had no impact on OS, TRM, relapse incidence, and acute GvHD. The presence of NOD2/CARD15 polymorphisms only in the donors was associated with extensive chronic GvHD and steroid-resistant form of GvHD if compared to the group without SNPs in recipients and donors.

Keywords: NOD2/CARD15 polymorphisms, allogeneic transplantation of hematopoietic stem cells, infectious complications.

■ ВВЕДЕНИЕ

Аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (аллотГСК) позволяет достичь полного излечения при широком спектре заболеваний (онкогематологические заболевания, апластические анемии, иммунодефициты, наследственные нарушения метаболизма и др.). Однако после аллотГСК может развиваться большое количество разнообразных осложнений, например, отторжение трансплантата, реакция «трансплантат против хозяина» (РТПХ), инфекционные и токсические осложнения, рецидивы основного заболевания, что существенно снижает выживаемость пациентов и эффективность лечения. При этом РТПХ является одним из наиболее тяжелых осложнений аллотГСК и одной из главных причин смертности в посттрансплантационном периоде. В зависимости от протоколов иммуносупрессивной профилактики РТПХ, типа донора частота ее развития колеблется от 5 до 90%, а смертность составляет от 20 до 50% [1, 2]. В связи с этим большое внимание уделяется определению факторов риска развития РТПХ с целью предотвращения ее возникновения, а также разработке новых подходов к терапии данного осложнения.

Роль врожденной иммунной системы в патофизиологии осложнений после ТГСК общепризнана, начиная с открытия ван Беккума в 1974 г., который показал отсутствие РТПХ у мышей, выращенных в стерильных условиях [3], и описания провоспалительных цитокинов как главных эффекторных молекул [4]. Однако только недавно были определены рецепторы для патоген-ассоциированных молекул (pathogen-associated molecular patterns – PAMPs), которые теперь позволяют более подробно проанализировать вовлечение клеточных механизмов/молекулярных путей [5]. Среди них важную роль играет NOD2/CARD15, который был описан как первый ген, ответственный за предрасположенность к болезни Крона [6–8]. Он кодирует внутрицитоплазматический рецептор к компоненту бактериальной стенки мурамил-дипептиду и вызывает активацию транскрипционного фактора NF-κB и последующее воспаление в эпителиальных клетках кишечника [9], таким образом участвует в развитии врожденной иммунной реакции на бактериальные инфекции в ЖКТ. Описано три однонуклеотидных полиморфизма гена NOD2 (8, 12 и 13) в мурамил дипептид рецепторном участке LRR (leucine-rich repeats) гена, связанных с уменьшением продукции NF-κB и, как результат, со снижением способности к высвобождению воспалительных цитокинов в ответ на продукты клеточной стенки бактерий, которые были первоначально описаны у пациентов с болезнью Крона.

В ряде исследований было показано, что присутствие вариантов NOD2 или у донора, или у реципиента, или у обоих связано с повышенным риском РТПХ [10–12], в то время как другие исследования не подтвердили их результаты [13–16].

В ряде исследований было показано, что присутствие вариантов NOD2 или у донора, или у реципиента, или у обоих связано с повышенным риском РТПХ [10–12], в то время как другие исследования не подтвердили их результаты [13–16].

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Определить частоту встречаемости полиморфизмов SNP8, SNP12, SNP13 гена NOD2/CARD15 у реципиентов и их доноров и оценить их влияние на исход, развитие реакции «трансплантат против хозяина» и инфекционных осложнений у детей и молодых взрослых после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование включено 80 реципиентов и их доноров, которым была проведена аллоТГСК с 2010 по 2014 г., из них 23 с ОЛЛ, 20 с ОМЛ, 2 с бифенотипическим ОЛ, 5 с МДС, 3 с ЮММЛ, 4 с НХЛ, 12 с апластическими анемиями, 9 с ПИД, 1 пациент с талассемией. Возраст реципиентов, которым была проведена аллоТГСК, составил 0,5–29 лет (медиана, 9 лет), возраст доноров составил от 0 (доноры пуповинной крови) до 53 лет (медиана, 24 года). Трансплантация от HLA-совместимого сиблинга была проведена у 27, от совместимого неродственного донора у 33, от несовместимого неродственного донора у 14 и от родственного несовместимого донора у 6 пациентов. АллоТГСК с применением миелоаблативных режимов кондиционирования была выполнена у 54 и режимов пониженной интенсивности у 26 пациентов.

В качестве исследуемого материала использовали образцы периферической крови, костного мозга или пуповинной крови донора и реципиента. Для выделения ядросодержащих клеток и лизиса эритроцитов использовали RCLB (Red Cell Lysis Buffer). Клетки лизировали в DB (denaturation buffer: 5 M NaCl, 1 M Tris-HCl с pH 8, 0,5 M EDTA, 10% SDS). Затем проводили экстракцию фенол-хлороформом (фенол-хлороформ-изоамиловый спирт 25:24:1 pH=7,5–8,5), высаливали белок 8 M ацетатом аммония, осаждение и отмывку ДНК проводили в 70% этаноле. ДНК растворяли в ТЕ-буфере. Качество и концентрацию полученной ДНК оценивали на спектрофотометре NanoDrop 2000c (Thermo, США). При этом оценивали примесь белков по соотношению поглощения ультрафиолетового света с длиной волны 260 нм (для нуклеиновых кислот) и 280 нм (для белков) (260/280) и примесь углеводов по соотношению 260/230 нм. Образцы ДНК считали чистыми при значении показателей более 1,8.

Для амплификации участков ДНК, содержащих интересующие полиморфизмы SNP8, SNP12, SNP13, были подобраны три пары праймеров к наиболее консервативным участкам гена NOD2/CARD15, не содержащих другие SNP (табл. 1). ПЦР проводили в объеме 10 мкл с конечной концентрацией ДНК 6,25 нг/мкл, 1,5 mM MgCl₂, dNTP 0,2 mM, праймеры по 0,4 mM, 1 единица Go Taq Flexi DNA polymerase (Promega, США). Условия ПЦР: 94 °C – 2 мин, 30 циклов (94 °C – 30 с, 60 °C – 30 с, 72 °C – 1 мин). Размер ампликонов, которые включают области SNP8, SNP12, SNP13 – 702 п.о., 493 п.о., 510 п.о. соответственно. Очистку продуктов ПЦР проводили с помощью набора PureLink® PCR Purification Kit (Invitrogen, США). Секвенирование ДНК проводили с помощью набора ABI PRISM BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems, США) на автоматическом секвенаторе ДНК ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems, США).

Таблица 1

Последовательности праймеров для амплификации и сиквенса локусов ДНК, содержащих полиморфизмы SNP8, SNP12, SNP13 гена NOD2/CARD15

Полиморфизм и его локализация	Праймер	Последовательность праймера 5'-3'
SNP8 exon 4	SNP8_F	GTGTCGTGCCAGGGAGTAC
	SNP8_R	TGCTCTTTTCACCCATCTAC
SNP12 exon 8	SNP12_F	GGGTTAAGTTTGGCCATCCC
	SNP12_R	TCAAAACCCTGAGAGGACAAG
SNP13 exon 11	SNP13_F	TCACTGATGGTACTGAGCCT
	SNP13_R	AGAGCAGAGAAGTTGCTGAAT

Статистическую обработку данных проводили с помощью R-statistics 3.2.0. Показатели общей выживаемости рассчитывали по методу Kaplan – Meier [17], статистически значимые различия в выживаемости определяли при помощи log-rank теста. Для расчета кумулятивных частот событий применяли метод конкурирующих рисков [18] и определяли статистически значимые различия с помощью теста Грея [19]. Сравнение в группах по индивидуальным показателям проводили с помощью χ^2 -теста. Различия при вероятности ошибки менее 5% считали статистически значимыми ($p < 0,05$).

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Частоты аллелей SNP 8, 12 и 13 гена NOD2/CARD15

У всех 80 доноров и 79 пациентов было проведено секвенирование целевых участков, содержащих локусы SNP8, SNP12 или SNP13. Частота полиморфизмов SNP8, SNP12 и SNP13 гена NOD2/CARD15 составила 3,5%, 2,5% и 7,5% (табл. 2) соответственно. Согласно данным проекта 1000 Genomes (<http://www.1000genomes.org>) и других исследований [20, 21] частота встречаемости SNP8 от 0 до 7%, SNP12 от 0 до 2% и SNP13 от 0 до 3,8% сильно варьирует среди разных популяций, наиболее часто встречается среди европейских популяций и выходцев из Европы в Америке.

Частоты различных генотипов представлены в табл. 3, а более подробная картина для сочетания трех аллелей в табл. 4. Отсутствие SNP8, SNP12 и SNP13 у донора и у реципиента было выявлено у 51 (64,6%) пары донор/реципиент, данная группа была принята за референсную.

Таблица 2

Частота аллелей SNP8, SNP12 и SNP13

Полиморфизм	Аллель	Пациенты (n=79)	Доноры (n=80)	Пациенты и доноры (n=159)	NSBI database
SNP8	аллель С	0.968	0.963	0.965	0.9856
	аллель Т	0.032	0.037	0.035	0.0144
SNP12	аллель G	0.981	0.969	0.975	0.9954
	аллель С	0.019	0.031	0.025	0.0046
SNP13	дикий тип	0.943	0.906	0.925	0.9894
	мутация со сдвигом рамки считывания	0.057	0.094	0.075	0.0106

Полиморфизм гена NOD2/CARD15 ассоциирован с увеличенным риском развития распространенной хронической и стероидрезистентной реакции «трансплантат против хозяина» после аллогенной ТГСК

Таблица 3
Частота генотипов NOD2/CARD15 (WT-wild type, дикий тип)

	Пациенты (n=79)	Доноры (n=80)	Пациенты и доноры (n=159)
SNP8/WT	5 (6,3%)	4 (5%)	9 (5,7%)
SNP8/SNP8	0	1 (1,3%)	1 (0,6%)
SNP12/WT	3 (3,8%)	5 (6,3%)	8 (5,0%)
SNP13/WT	7 (8,9%)	13 (16,3%)	20 (12,6%)
SNP13/SNP13	1 (1,3%)	1 (1,3%)	2 (1,3%)

Таблица 4
Частота различных генотипов NOD2/CARD15 (WT-wild type, дикий тип)

Генотип		Пациенты (n=79)	Доноры (n=80)
WT/WT	WT/WT; WT/WT; WT/WT	63	58
SNP8/WT	SNP8/WT; WT/WT; WT/WT	5	4
SNP8/ SNP8	SNP8/ SNP8; WT/WT; WT/WT	0	1
SNP12/WT	WT/WT; SNP12/WT; WT/WT	3	3
SNP13/WT	WT/WT; WT/WT; SNP13/WT	7	11
SNP13/ SNP13	WT/WT; WT/WT; SNP13/SNP13	1	1
SNP12/WT+SNP13/WT	WT/WT; SNP12/WT; SNP13/WT	0	2

Общая выживаемость, кумулятивная частота TRM и рецидивов. В нашем исследовании наличие полиморфизмов SNP8, 12 или 13 гена NOD2 ни у донора, ни у реципиента не влияло на общую выживаемость, кумулятивную частоту TRM и рецидивов (рис. 1, 2).

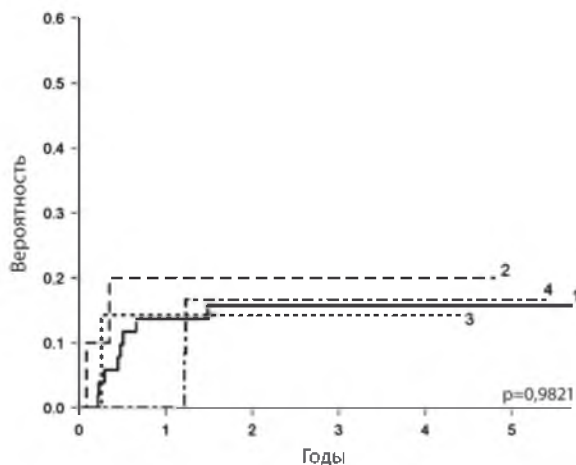


Рис. 1. Наличие полиморфизмов гена NOD2/CARD15 не оказывает влияния на кумулятивную частоту TRM

Примечания:

- 1 – отсутствие SNP8, SNP12 и SNP13 у донора и у реципиента (TRM 15,8%±5,2%);
- 2 – наличие полиморфизмов SNP8, SNP12 и/или SNP13 у донора, и у реципиента (TRM 20%±13,4%);
- 3 – наличие полиморфизмов SNP8, SNP12 и/или SNP13 только у реципиента (TRM 14,3%±14,3%);
- 4 – наличие полиморфизмов SNP8, SNP12 и/или SNP13 только у донора (TRM16,7%±11,3%).

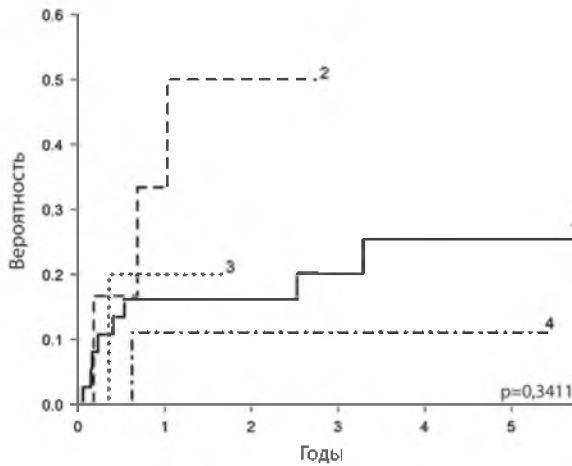


Рис. 2. Наличие полиморфизмов гена NOD2/CARD15 не оказывает влияния на кумулятивную частоту рецидивов

Примечания:

- 1 – отсутствие SNP8, SNP12 и SNP13 у донора и у реципиента (CI рецидивов 24,5%±8,5%);
- 2 – наличие полиморфизмов SNP8, SNP12 и/или SNP13 и у донора, и у реципиента (CI рецидивов 50%±25,3%);
- 3 – наличие полиморфизмов SNP8, SNP12 и/или SNP13 только у реципиента (CI рецидивов 20%±20%);
- 4 – наличие полиморфизмов SNP8, SNP12 и/или SNP13 только у донора (CI рецидивов 11,1%±11,1%).

Острая РТПХ и наличие SNP8, 12 и 13 гена NOD2/CARD15

Наличие полиморфизмов SNP8, 12 или 13 гена NOD2 ни у донора, ни у реципиента не влияло на развитие острой РТПХ, в том числе оРТПХ III–IV степени (рис. 3).

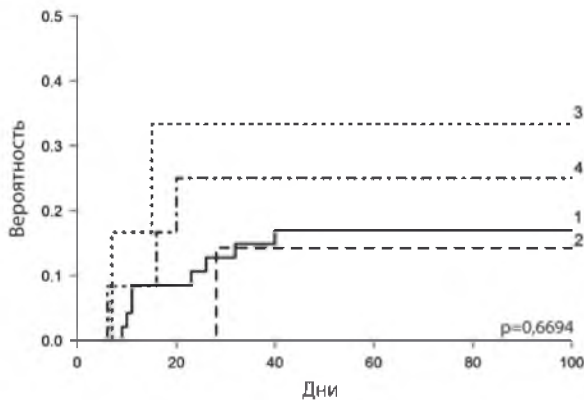


Рис. 3. Наличие полиморфизмов гена NOD2/CARD15 не оказывает влияния на кумулятивную частоту оРТПХ III–IV степени

Примечания:

- 1 – отсутствие SNP8, SNP12 и SNP13 у донора и у реципиента (CI оРТПХ 17,0%±5,5%);
- 2 – наличие полиморфизмов SNP8, SNP12 и/или SNP13 и у донора, и у реципиента (CI оРТПХ 14,3%±14,3%);
- 3 – наличие полиморфизмов SNP8, SNP12 и/или SNP13 только у реципиента (CI оРТПХ 13,3%±21,3%);
- 4 – наличие полиморфизмов SNP8, SNP12 и/или SNP13 только у донора (CI оРТПХ 25,0%±13,1%).

В ряде исследований показано влияние полиморфизмов гена NOD2/CARD15 на развитие оРТПХ [10–12, 22–24], общую выживаемость [12, 22, 25, 26], развитие рецидивов [11, 13, 25] и смертность, связанную с лечением (treatment-related mortality, TRM) [10, 12, 22, 23, 26]. Результаты некоторых исследований значительно расходятся, и эффекты полиморфизмов NOD2/CARD15 носят противоположный характер. Как в нашем, так и в других исследованиях такая зависимость не была выявлена [13–16]. Расхождение результатов может быть обусловлено различиями в выборках пациентов или в стратегиях ТГСК, таких как использование Т-клеточной деплеции *in vivo*, деконтаминации ЖКТ или применение менее токсичных режимов кондиционирования, уменьшающих степень повреждения ЖКТ, профилактики РТПХ.

Возможно, эффект полиморфизмов NOD2/CARD15 на TRM в некоторых исследованиях обусловлен смертностью в результате развития РТПХ, в нашем исследовании только один пациент умер от РТПХ, что частично объясняет расхождение с результатами других авторов.

При анализе влияния полиморфизмов NOD2/CARD15 мы учли факторы, которые могут влиять на развитие оРТПХ и на проявление эффекта SNP8, 12 и 13 данного гена. Наличие полиморфизмов SNP8, 12 и 13 у донора или реципиента не оказывало влияния на оРТПХ в различных группах пациентов: при трансплантации от HLA-совместимого сиблинга, HLA-совместимого неродственного донора, HLA-несовместимого родственного донора, HLA-несовместимого неродственного донора, с и без применения ATG (Anti-thymocyte globulin), у пациентов, получивших миелоаблативное (MAC) и немиелоаблативное (RIC) кондиционирование.

Для большинства пациентов (91%) не проводилась Т-клеточная деплеция трансплантата, однако и в этой группе наличие полиморфизмов NOD2/CARD15 не оказывало влияния на оРТПХ.

Holler et al. [22] связывает отсутствие влияния полиморфизмов гена NOD2/CARD15 с применением деконтаминации ЖКТ. В нашем исследовании деконтаминация ЖКТ проводилась у 97,5% пациентов с помощью ципрофлоксацина, колистина и аугментина. Мы сравнили влияние полиморфизмов NOD2 в группе пациентов, у которых использовался ципрофлоксацин и/или колистин, и в группе с применением только аугментина или без деконтаминации. Статистически достоверных различий не получено.

Если применение деконтаминации нивелирует влияние полиморфизмов гена NOD2/CARD15, то нельзя исключить, что они оказывают влияние в отсутствие деконтаминации. К сожалению, в большинстве исследований не указывается использование/отсутствие деконтаминации.

Хроническая реакция «трансплантат против хозяина» и наличие SNP 8, 12 и 13 гена NOD2/CARD15

В своем исследовании мы проанализировали также влияние SNP 8, 12 и 13 на развитие хронической РТПХ (хРТПХ) (рис. 4, 5). Статистически значимые различия наблюдались только для распространенной формы хРТПХ (рис. 5): наличие полиморфизмов гена NOD2/CARD15 только у донора было ассоциировано с развитием распространенной формы

хРТПХ в сравнении с референсной группой (отсутствие полиморфизма у донора и реципиента) ($p=0,0090$). В двух других группах (наличие полиморфизма и у донора, и у реципиента; только у реципиента) CI распространенной формы хРТПХ статистически не отличалась от референсной группы.

Стероидрезистентная форма реакции «трансплантат против хозяина» и наличие SNP 8, 12 и 13 гена NOD2/CARD15

Стероидрезистентная форма достоверно чаще развивалась в группе реципиентов, у доноров которых были полиморфизмы гена NOD2/CARD15 в сравнении с референсной группой (отсутствие полиморфизма у донора и реципиента) ($p=0,0093$). В двух других группах (наличие полиморфизма и у донора, и у реципиента; только у реципиента) кумулятивная частота стероидрезистентной формы РТПХ статистически не отличалась от референсной группы (рис. 6).

При этом у 11/15 (73,3%) пациентов со стероидрезистентной оРТПХ развивалась распространенная форма хРТПХ.

У пациентов со стероидрезистентной оРТПХ крайне неблагоприятный прогноз со смертностью до 90%. В исследовании J.R. Westin et al. [27] ни один из демографических показателей пациентов или характеристик аллоТГСК не предсказывал резистентность к кортикостероидам. Это выдвигает на первый план потребность в поиске биомаркеров для оценки оРТПХ. Согласно нашим данным, таким маркером стероидрезистентной РТПХ могут служить полиморфизмы гена NOD2/CARD15. Раннее выявление таких пациентов может быть использовано для назначения более агрессивного лечения или ис-

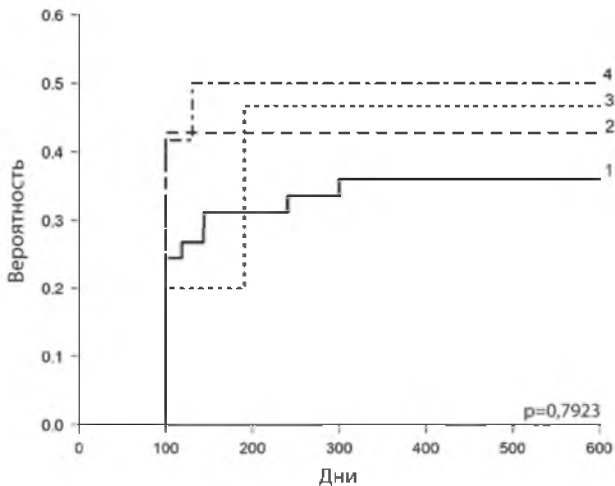


Рис. 4. Наличие полиморфизмов гена NOD2/CARD15 не оказывает влияния на кумулятивную частоту хРТПХ (локальная и распространенная форма)

Примечания:

- 1 – отсутствие SNP8, SNP12 и SNP13 у донора и у реципиента (CI хРТПХ 36,0%±7,3%);
- 2 – наличие полиморфизмов SNP8, SNP12 и/или SNP13 и у донора, и у реципиента (CI хРТПХ 42,9%±20,2%);
- 3 – наличие полиморфизмов SNP8, SNP12 и/или SNP13 только у реципиента (CI хРТПХ 46,7%±29,8%);
- 4 – наличие полиморфизмов SNP8, SNP12 и/или SNP13 только у донора (CI хРТПХ 50,0%±15,2%).

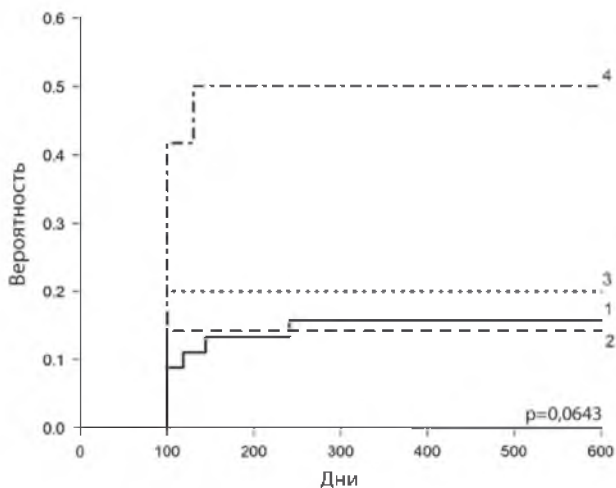


Рис. 5. Влияние полиморфизмов гена NOD2/CARD15 на кумулятивную частоту распространенной формы хРТПХ (рхРТПХ)

Примечания:

- 1 – отсутствие SNP8, SNP12 и SNP13 у донора и у реципиента (CI рхРТПХ 15,8%±5,6%);
- 2 – наличие полиморфизмов SNP8, SNP12 и/или SNP13 у донора, и у реципиента (CI рхРТПХ 14,3%±14,3%);
- 3 – наличие полиморфизмов SNP8, SNP12 и/или SNP13 только у реципиента (CI рхРТПХ 20,0%±20,0%);
- 4 – наличие полиморфизмов SNP8, SNP12 и/или SNP13 только у донора (CI рхРТПХ 50,0%±15,2%).

пользования иммунотерапии (МСК), что может улучшить результаты лечения РТПХ.

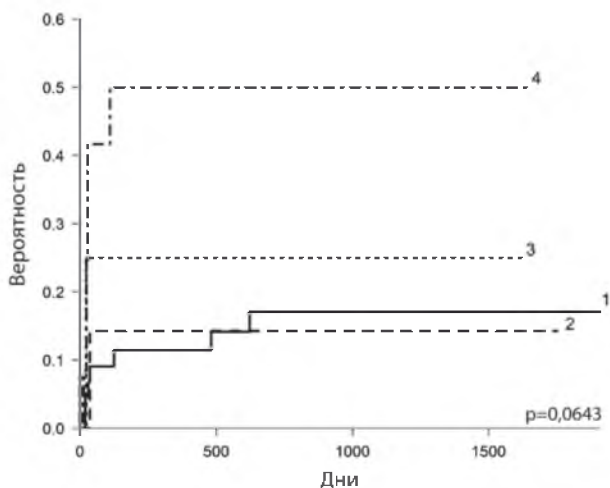


Рис. 6. Влияние полиморфизмов гена NOD2/CARD15 на кумулятивную частоту стероидрезистентной формы хРТПХ (срРТПХ)

Примечания:

- 1 – отсутствие SNP8, SNP12 и SNP13 у донора и у реципиента (CI срРТПХ 17,1%±6,0%);
- 2 – наличие полиморфизмов SNP8, SNP12 и/или SNP13 у донора, и у реципиента (CI срРТПХ 14,3%±14,3%);
- 3 – наличие полиморфизмов SNP8, SNP12 и/или SNP13 только у реципиента (CI срРТПХ 25,0%±25,0%);
- 4 – наличие полиморфизмов SNP8, SNP12 и/или SNP13 только у донора (CI срРТПХ 50,0%±15,3%).

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Мы впервые выявили влияние SNP8, SNP12 и/или SNP13 гена NOD2/CARD15 на развитие хронической и стероидрезистентной формы РТПХ: значительное увеличение риска развития данных осложнений наблюдалось в группе с SNP8, 12 или 13 только у донора. Наличие данных полиморфизмов у реципиента и/или донора не влияло на общую выживаемость, смертность, связанную с трансплантацией, частоту развития рецидивов и острой РТПХ. Типирование реципиентов и доноров по наличию NOD2/CARD15 полиморфизмов может помочь в выборе донора ТГСК и выделить среди пациентов группы риска развития стероидрезистентной РТПХ.

■ ЛИТЕРАТУРА

1. Chao N.J. (2016) Treatment of acute graft-versus-host disease. Uptodate.com (electronic resource). Available at: <http://uptodate.com/contents/treatment-of-acute-graft-versus-host-disease> (accessed 25 May 2016).
2. Berger M., Biasin E., Saglio F., Fagioli F. (2008) Innovative approaches to treat steroid-resistant or steroid refractory GVHD. *Bone Marrow Transplantation*, vol. 42, no 7, pp. 101–105.
3. Van Bekkum D.W., Roodenburg J., Heidt P.J., van der Waaij D. (1974) Mitigation of secondary disease of allogeneic mouse radiation chimeras by modification of the intestinal microflora. *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 52, no 2, pp. 401–404.
4. Ball L.M., Egeler R.M. (2008) Acute GvHD: pathogenesis and classification. *Bone Marrow Transplantation*, vol. 41, suppl. 2, pp. 58–64.
5. Eckmann L. (2006) Sensor molecules in intestinal innate immunity against bacterial infections. *Current Opinion in Gastroenterology*, vol. 22, no 2, pp. 95–101.
6. Hugot J., Chamaillard M., Zouali H., Lesage S., Ce J., Macry J. (2001) Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*, vol. 411, pp. 599–603.
7. Ducloux B., Dupas J.L., Galmiche J.P. (2001) A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*, vol. 411, pp. 603–606.
8. Hampe J., Grebe J., Nikolaus S. (2002) Association of NOD2 (CARD 15) genotype with clinical course of Crohn's disease: a cohort study. *Lancet*, vol. 359, no 9318, pp. 1661–1665.
9. Ogura Y., Lala S., Xin W., Smith E., Dowds T.A., Chen F.F., Zimmermann E., Treiakova M., Cho J.H., Hart J., Greenson J.K., Keshav S., Nunez G. (2003) Expression of NOD2 in Paneth cells: a possible link to Crohn's ileitis. *Gut*, vol. 52, pp. 1591–1597.
10. Holler E., Rogler G., Herfarth H., Brenmoehl J., Wild P., Johannes H. (2004) Both donor and recipient NOD2/CARD15 mutations associate with transplant-related mortality and GVHD following allogeneic stem cell transplantation. *Blood*, vol. 104, no 3, pp. 889–894.
11. Elmaagacli A.H., Koldehoff M., Hindahl H., Steckel N.K., Trenschele R., Peceny R., Ottinger H., Rath P.M., Ross R.S., Roggendorf M., Grosse-Wilde H.B.D. (2006) Mutations in innate immune system NOD2/CARD 15 and TLR-4 (Thr399Ile) genes influence the risk for severe acute graft-versus-host disease in patients who underwent an allogeneic transplantation. *Transplantation*, vol. 81, no 2, pp. 247–254.
12. Holler E., Rogler G., Brenmoehl J., Hahn J., Greinix H., Dickinson A.M., Socie G., Wolff D., Finke J., Fischer G., Jackson G., Rocha V., Hilgendorf I., Eissner G., Marienhagen J., Andreesen R. (2008) The role of genetic variants of NOD2/CARD15, a receptor of the innate immune system, in GVHD and complications following related and unrelated donor haematopoietic stem cell transplantation. *International Journal of Immunogenetics*, vol. 35, no 4, pp. 381–384.
13. Wermke M., Maiwald S., Schmelz R., Thiede C., Schetelig J., Ehninger G., Bornhäuser M., Was-smuth R. (2010) Genetic variations of interleukin-23R (1143A>G) and BPI (A645G), but not of

- NOD2, are associated with acute graft-versus-host disease after allogeneic transplantation. *Biology of Blood & Marrow Transplantation*, vol. 16, no 12, pp. 1718–1727.
14. Sairafi D., Uzunel M., Remberger M., Ringden O., Mattson J. (2008) No impact of NOD2/CARD15 on outcome after SCT. *Bone Marrow Transplantation*, vol. 41, no 11, pp. 961–964.
 15. Gruhn B., Intek J., Pfaffendorf N. (2009) Polymorphism of interleukin-23 receptor gene but not of NOD2/CARD15 is associated with graft-versus-host Disease after hematopoietic stem cell transplantation in children. *Biology of Blood & Marrow Transplantation*, vol. 15, no 12, pp. 1571–17577.
 16. Nguyen Y., Al-Lehibi A., Gorbe E. (2010) Insufficient evidence for association of NOD2/CARD15 or other inflammatory bowel disease-associated markers on GVHD incidence or other adverse outcomes in T-replete, unrelated donor transplantation. *Blood*, vol. 115, no 17, pp. 3625–3631.
 17. Kaplan E., Meier P. (1958) Nonparametric estimation from incomplete observations. *Journal of the American Statistical Association*, vol. 53, no 282, pp. 457–481.
 18. Gooley T., Leisenring W., Crowley J. (1999) Estimation of failure probabilities in the presence of competing risks: new representations of old estimators. *Statistics in Medicine*, vol. 18, no 6, pp. 695–706.
 19. Gray R. (1988) A class of K-sample tests for comparing the cumulative incidence of a competing risk. *The Annals of Statistics*, vol. 16, no 3, pp. 1140–1154.
 20. Lesage S., Zouali H., Cezard J.P., Colombel J.F., Belaiche J., Almer S. (2002) CARD15/ NOD2 mutational analysis and genotype–phenotype correlation in 612 patients with inflammatory bowel disease. *American Journal of Human Genetics*, vol. 70, no 4, pp. 845–857.
 21. Hugot J.P., Zaccaria I., Cavanaugh J., Yang H., Vermeire S., Lappalainen M. (2007) Prevalence of CARD15/NOD2 mutations in Caucasian healthy people. *American Journal of Gastroenterology*, vol. 102, no 6, pp. 1259–1267.
 22. Holler E., Rogler G., Brenmoehl J. (2006) Prognostic significance of NOD2/CARD15 variants in HLA-identical sibling hematopoietic stem cell transplantation: effect on long-term outcome is confirmed in 2 independent cohorts and may be modulated by the type of gastrointestinal decontamination. *Blood*, vol. 107, no 10, pp. 4189–4193.
 23. Van der Velden W.J.F.M., Blijlevens N.M.A., Maas F.M.H.M. (2009) NOD2 polymorphisms predict severe acute graft-versus-host and treatment-related mortality in T-cell-depleted hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplantation*, vol. 44, no 4, pp. 243–248.
 24. Elmaagacli A.H., Steckel N., Ditschkowski M. (2011) Toll-like receptor 9, NOD2 and IL23R gene polymorphisms influenced outcome in AML patients transplanted from HLA-identical sibling donors. *Bone Marrow Transplantation*, vol. 46, no 5, pp. 702–708.
 25. Mayor N.P., Shaw B.E., Hughes D.A. (2007) Single nucleotide polymorphisms in the NOD2/ CARD14 gene are associated with an increased risk of relapse and death for patients with acute leukemia after hematopoietic stem-cell transplantation with unrelated donors. *Journal of Clinical Oncology*, vol. 25, no 27, pp. 4262–4269.
 26. Kreyenberg H., Jarisch A., Bayer C. (2011) NOD2/CARD15 gene polymorphisms affect outcome in pediatric allogeneic stem cell transplantation. *Blood*, vol. 118, no 4, pp. 558–561.
 27. Westin J.R., Saliba R.M., Lima M.D. (2011) Steroid-refractory acute GVHD: predictors and outcomes. *Advances in Hematology*, vol. 2011. Epub 2011 Nov 3. Available at: <http://www.hindawi.com/journals/ah/2011/601953/#B15>.

Поступила / Received: 30.06.2016

Контакты / Contacts: gemtrans@recipe.by