

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

Д.Л.Пиневич



2016 г.

Регистрационный № 068-1016

**МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МИНИМАЛЬНОЙ
ОСТАТОЧНОЙ БОЛЕЗНИ ПРИ ОСТРОМ
МИЕЛОИДНОМ ЛЕЙКОЗЕ У ДЕТЕЙ**
инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ - РАЗРАБОТЧИК:

ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии,
гематологии и иммунологии».

АВТОРЫ:

Баровская Ю.А., Стёганцева М.В., Пахомова И.В., Волочник Е.В., к.б.н.
Савицкая Т.В., к.б.н., доцент Белевцев М.В., д.м.н., профессор, член-
корреспондент НАН Беларуси Алейникова О.В.

Минск, 2016

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра

_____ Д.Л. Пиневиц

28.10.2016

Регистрационный № 068-1016

**МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МИНИМАЛЬНОЙ ОСТАТОЧНОЙ БОЛЕЗНИ
ПРИ ОСТРОМ МИЕЛОИДНОМ ЛЕЙКОЗЕ У ДЕТЕЙ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: ГУ «Республиканский научно-практический
центр детской онкологии, гематологии и иммунологии»

АВТОРЫ: Ю.А. Баровская, М.В. Стеганцева, И.В. Пахомова, Е.В. Волочник,
канд. биол. наук Т.В. Савицкая, канд. биол. наук, доц. М.В. Белевцев, д-р мед.
наук, проф., чл.-корр. НАН Беларуси О.В. Алейникова

Минск 2016

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота

дНТФ — дезоксирибонуклеотидтрифосфат

ДТТ — дитиотреитол

ИГ — исследуемый ген

ИФТ — иммунофенотипирование

кДНК — комплементарная ДНК

КГ — контрольный ген

КМ — костный мозг

КТ — комнатная температура

МНК — моноклеарные клетки

МОБ — минимальная остаточная болезнь

ОМЛ — острый миелоидный лейкоз

ТГСК – трансплантация гемопоэтических стволовых клеток

ЛАИФ — лейкоз-ассоциированный иммунофенотип

ПК — периферическая кровь

ПЦР — полимеразная цепная реакция

ПЦФ — проточная цитофлуориметрия

РНК — рибонуклеиновая кислота

ТГСК — трансплантация гемопоэтических стволовых клеток

ФСБ — фосфатно-солевой буфер

ЭДТА — этилендиаминтетрауксусная кислота

RGE — относительная экспрессия гена

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложены методы определения минимальной остаточной болезни у пациентов с острым миелоидным лейкозом, которые могут быть использованы в комплексе медицинских услуг, направленных на диагностику и лечение этих пациентов.

Настоящая инструкция предназначена для врачей-гематологов, врачей-онкологов, врачей лабораторной диагностики, а также для других врачей-специалистов, оказывающих специализированную медицинскую помощь пациентам с острым миелоидным лейкозом.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМЫХ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ, РЕАКТИВОВ И РАСХОДНЫХ МАТЕРИАЛОВ

- термоциклер (ПЦР-амплификатор) для ПЦР в реальном времени;
- центрифуга с охлаждением для пробирок объемом 15–50 мл;
- ПЦР-бокс;
- аппарат для горизонтального электрофореза в агарозном геле;
- вортекс;
- водяная баня;
- генетический анализатор для проведения капиллярного электрофореза продуктов секвенирующей реакции;
- документирующая система для визуализации результатов электрофореза;
- инкубатор для клеточных культур с 5% CO₂;
- камера Горяева;
- магнитная мешалка с подогревом;
- спектрофотометр;
- термомиксер;
- холодильник (2–8 °С) с морозильным отделением (-20 °С);
- центрифуга с охлаждением на 14 000 об/мин (объем пробирок 1,5–2 мл);
- дозаторы для работы с объемами растворов в диапазоне от 0,1 до 1000 мкл;
- ДТТ;
- Таq ДНК-полимераза;
- агароза;
- бромистый этидиум;
- вода деионизованная;
- изопропанол;
- ингибитор РНКаз;
- 2x мастер микс для проведения ПЦР в реальном времени с флуоресцентной пробой;
- маркер молекулярного веса;
- набор для выделения РНК;
- обратная транскриптаза;
- олигонуклеотиды;
- растворы дезоксирибонуклеотидтрифосфатов;

- рэндом-гексамеры;
- уксусная кислота, 10%;
- фенол-содержащий реагент для выделения РНК, рН = 4,0;
- фенол-хлороформ-изоамиловый спирт (25:24:1);
- фосфатно-солевой буфер;
- хлороформ;
- этанол, 70%;
- этанол, 96%;
- раствор, содержащий бензилпенициллина натриевую соль (10000 ед./мл)/стрептомицина сульфат (10 мг/мл)/амфотерицина В (25 мкг/мл) (далее — антибактериальный и противогрибковый препарат);
- наконечники для дозаторов с аэрозольными барьерами (объем — от 0,1 до 1000 мкл);
- пробирки (объем — 0,2–50 мл), пробирки с антикоагулянтом (ЭДТА, цитратом)

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Острый миелоидный лейкоз.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Отсутствуют.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Иммунофенотипическое определение аберрантной экспрессии антигенов лейкоэмических клеток методом 6–8-цветной проточной цитофлуориметрии

Метод проточной цитометрии основан на определении ЛАИФ, который представляет собой аберрантную экспрессию антигенов на поверхности лейкозных клеток, обнаруживаемую в момент постановки диагноза. ЛАИФ определяют по следующим признакам:

- асинхронная экспрессия антигенов, т.е. ко-экспрессия ранних (CD34 или CD117) и более поздних маркеров, таких как CD15, CD11c, CD14 или CD65 на миелоидных бластах;

- кросс-линейная экспрессия антигенов, т.е. экспрессия антигенов, которые обычно представлены на других гемопоэтических линиях (например, аберрантная экспрессия лимфоид-ассоциированных маркеров CD2, CD3, CD5, CD19 или CD56);

- гиперэкспрессия антигенов, т.е. аномальное повышение экспрессии антигенов (например, CD33 или CD34) на миелоидных бластах;

- потеря экспрессии основного миелоидного антигена (например, HLA-DR).

Для определения ЛАИФ достаточно хотя бы одного из вышеперечисленных признаков.

Выделение популяции МНК крови и обработка клеток с помощью моноклональных антител выполняются в соответствии с инструкциями фирмы-

изготовителя, прилагаемыми к поставляемым реагентам. Для выделения мононуклеаров периферическую кровь или аспират КМ наслаивают на гистопак (Histopaque 1077) или раствор фиколл-верографина плотностью 1,077 г/см³ в соотношении 2:1 и центрифугируют при 1200 об./мин в течение 30 мин. Слой клеток в интерфазе собирают, переносят в чистую пробирку и отмывают дважды фосфатно-солевым буферным раствором с 0,1% азидом натрия путем центрифугирования взвеси клеток при 2200 об/мин в течение 3 мин. При необходимости лизируют эритроциты раствором хлорида аммония. В этом случае производят дополнительную отмывку клеток с помощью ФСБ. Затем готовят взвесь клеток с концентрацией 5–10 млн/мл, вносят ее по 100 мкл в предварительно промаркированные пробирки. В каждую пробирку вносят одно или несколько моноклональных антител, конъюгированных с различными флуорохромами.

Пробирки, содержащие моноклональные антитела и клетки (из расчета 1 мкг/1 млн клеток), инкубируют в темноте при комнатной температуре в течение 20–30 мин, после чего дважды отмывают центрифугированием с 0,5 мл ФСБ. К ресуспендированному осадку клеток добавляют 250 мкл 1% раствора параформальдегида и оставляют при 4°C до момента учета результатов на проточном цитометре (до 2-х сут).

Определение внутриклеточных маркеров требует предварительной пермеабилзации клеточных мембран до внесения моноклональных антител. С этой целью мононуклеары сначала инкубируют в течение 10 мин при комнатной температуре с фиксирующим раствором, затем отмывают и обрабатывают 10 мин при комнатной температуре пермеабилзирующим раствором (FACS Permeabilizing Solution, Becton Dickinson). Осадок клеток отмывают, инкубируют с моноклональными антителами при 4°C в течение 30 мин, далее обрабатывают, как описано выше. Для пермеабилзации могут применяться и другие методы, например, с использованием 0,1% раствора сапонины или готовых пермеабилзирующих составов фирм-производителей моноклональных антител.

Методологический подход заключается в анализе степени экспрессии определенных ИФТ-маркеров (или их комбинации) в КМ пациента и сопоставлении с экспрессией данных маркеров на лейкозных клетках до начала специфической терапии на CD45+ клетках КМ. Для этого предварительно из анализа исключаются лейкоциты, не относящиеся к миелобластам, путем выделения области изучаемых клеток во всех пробах по CD45 маркеру. Используют моноклональные антитела в следующих комбинациях: IgG1/IgG2a/CD45, CD7/CD13/CD45, CD34/CD33/CD45, CD34/CD117/CD45, дополнительные маркеры — CD20, CD7, CD4, CD2.

Определение МОБ с использованием ПЦР

Определение МОБ с использованием ПЦР основано на количественном анамнезе специфических молекулярно-генетических маркеров (PML/RARa, RUNX1-RUNX1T1 AML1-ETO, CBFB-MYH11) либо различных вариантов реаранжировок MLL (MLL-AF4, MLL-ENL, MLL-ELL, MLL-AF6, MLL-AF9, MLL-AF10), либо дупликации внутри гена (MLL-PTD, FLT3-ITD). Определение

данных маркеров проводится на ДНК или кДНК в зависимости от мишени и включает несколько этапов: пробоподготовка (выделение моноклеаров из периферической крови или КМ, выделение ДНК или РНК с последующим синтезом кДНК), ПЦР в реальном времени и интерпретация полученных результатов.

Пробоподготовка

Выделение моноклеарных клеток

5 мл КМ наслаивают на 0,5 объема градиента плотности 1,077 г/мл, находящегося при комнатной температуре, и центрифугируют при комнатной температуре в течение 30 мин при 400 g. Слой МНК переносят в чистую пробирку, дважды отмывают в ФСБ (250 g, 10 мин), клетки ресуспендируют в соответствующем объеме ФСБ.

Выделение суммарной РНК

Осадок, содержащий $5-10 \times 10^6$ клеток (количество клеток определяют в камере Горяева с использованием 10% уксусной кислоты), лизируют в 1 мл фенол-содержащего реагента для выделения РНК. Лизат оставляют на 5 мин при комнатной температуре для полной диссоциации нуклеопротеиновых комплексов, после чего его либо замораживают при -20°C , либо используют непосредственно для экстракции РНК. РНК выделяют с использованием фенол-содержащего реагента для выделения РНК в соответствии с инструкциями производителя. Для выделения РНК подходит любой иной способ или коммерческий набор, обеспечивающие надлежащее качество РНК.

Качество и количество РНК оценивают спектрофотометрически и электрофоретически. При этом оценивают 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. Образец суммарной РНК считают чистым при значении показателей более 1,8. Качество РНК оценивают также визуально после электрофореза 5 мкл РНК в 1,5% агарозном геле, окрашенном бромистым этидиумом: в случае качественной РНК флуоресценция в лунке (примесь ДНК) и конце (деградированная РНК) дорожки отсутствует, а интенсивность полосы 18S рибосомальной РНК примерно в два раза выше, чем полосы 16S рРНК.

Обратная транскрипция

Для синтеза кДНК подходит любой набор, обеспечивающий эффективный синтез кДНК. Синтез кДНК проводят согласно инструкции производителя. Например, 100 нг — 1 мкг тотальной РНК смешивают с 50–250 нг рэндом-гексамеров, 1 мкл 2,5 мМ дНТФ и водой до объема 13 мкл, инкубируют 5 мин при 65°C . Охлаждают на льду не менее 1 мин, осаждают конденсат со стенок и добавляют остальные реагенты до конечного объема 20 мкл: 4 мкл 5x буфера, 1 мкл 0,1 М ДТТ, 1 мкл ингибитора РНКаз (40 ед./мкл), 1 мкл обратной транскриптазы, которая работает при $50-55^\circ\text{C}$ (200 ед./мкл). Инкубируют последовательно при комнатной температуре 5 мин, при 50°C в течение 30–60 мин, 70°C в течение 15 мин. Помещают образец на 4°C . В полученную кДНК добавляют 30 мкл воды, кДНК используют непосредственно в ПЦР или замораживают при -20°C .

Выделение ДНК

Осадок, содержащий $5-10 \times 10^6$ клеток (количество клеток определяют в камере Горяева с использованием 10% уксусной кислоты), лизируют и выделяют ДНК фенол-хлороформной экстракцией. Для выделения ДНК подходит любой иной способ или коммерческий набор, обеспечивающие надлежащее качество ДНК. Количество и качество ДНК оценивают спектрофотометрически при длине волны 260 и 280 нм. Образец суммарной ДНК считают чистым при значении показателей более 1,8.

Определение МОБ с помощью ПЦР в реальном времени по молекулярно-генетическим маркерам

Определение МОБ по перестройкам гена MLL

После определения типа химерного гена необходимо подобрать праймеры для определения МОБ с использованием ПЦР в реальном времени. Количественная интерпретация данных, полученных в ходе ПЦР в реальном времени, требует 100% эффективности амплификации. Для этого праймеры подбирают таким образом, чтобы они амплифицировали фрагменты размером 50–150 пар оснований, так как при увеличении длины амплифицируемого участка эффективность амплификации снижается. Это накладывает определенные ограничения на дизайн праймеров, не позволяет применять праймеры, которые использовались для выявления химерных генов в качественной ПЦР, и ограничивает спектр сплайс-вариантов, определяемых в ходе ПЦР. Поэтому для подбора праймеров и оценки МОБ используются разные подходы в зависимости от типа химерного гена.

1. Определение МОБ у пациентов с химерными онкогенами MLL-AF9, MLL-ENL

Определение экспрессии генов MLL-AF9, MLL-ENL проводят с использованием праймеров, указанных в таблице 1. В этом случае результаты ПЦР получаются полуколичественными.

На первом этапе определяют оптимальную комбинацию праймеров. Так, если диагностическая ПЦР выявила экспрессию гена MLL-AF9, для проведения реакции готовят реакцию смесь, содержащую 12,5 мкл 2х мастер микса для ПЦР в реальном времени с флуоресцентной пробой, 300 нМ праймеров и 200 нМ пробы (MLL-F1/MLL-T1/AF9-R1/AF9-R2/AF9-R3 и MLL-F2/MLL-T2/AF9-R1/AF9-R2/AF9-R3), воды до 20 мкл и 5 мкл кДНК (общий объем реакционной смеси 25 мкл). Реакцию, содержащую исследуемую кДНК и реакцию, содержащую воду и/или кДНК без экспрессии MLL-AF9 (К-), вносят в оптические пробирки (можно использовать 96-луночный планшет или ленты пробирок), тщательно закрывают оптическими крышками (оптической пленкой), осаждают и помещают в термоциклер для проведения ПЦР в реальном времени. Реакционную смесь инкубируют 2 минуты при 50°C, 10 мин при 95°C, затем проводят 50 циклов ПЦР (95°C — 15 с, 60°C — 60 с), считывание флуоресценции проводят на этапе элонгации.

Таблица 1. — Последовательности олигонуклеотидов для оценки минимальной остаточной болезни у пациентов с перестройками генов MLL-AF9, MLL-ENL

Ген	Название	Последовательность	Метки
MLL	MLL-F1	cgcctcagccacctactacag	
	MLL-F2	aggagaatgcaggcactttga	
	MLL-T1	cgccaagaaaagaagtcccaaaaccact	FAM/BHQ
AF9	AF9-R1	tcacgatcgctgcagaatgt	
	AF9-R2	tggcaggactgggttgttc	
	AF9-R3	gctgctgctgctggtatgaat	
ENL	ENL-R1	ggagttggacgggcttgac	
	ENL-R2	tgggcttcttgcgcagtt	
MLL	MLL-T1	cgccaagaaaagaagtcccaaaaccact	FAM/BHQ
	MLL-T2	catcctcagcactctctccaatggcaat	FAM/BHQ

После ПЦР выбирают реакцию, дающую наименьшее значение C_t , т. е. содержащую праймеры/пробы, наиболее подходящие для варианта транскрипта исследуемого гена. Задача этого этапа — определить, какой вариант гена присутствует у пациента. В этом случае возможны несколько вариантов:

1. Определяется нуклеотидная последовательность, ограниченная праймерами MLL-F1/MLL-T1/AF9-R1/AF9-R2/AF9-R3. На следующем этапе вносят исследуемый образец в пробирки, содержащие комбинации праймеров/пробы:

- а) MLL-F1/MLL-T1/AF9-R1;
- б) MLL-F1/MLL-T1/AF9-R2;
- в) MLL-F1/MLL-T1/AF9-R3.

2. Определяется нуклеотидная последовательность, ограниченная праймерами MLL-F2/MLL-T2/AF9-R1/AF9-R2/AF9-R3. На следующем этапе вносят исследуемый образец в пробирки, содержащие комбинации праймеров/пробы:

- а) MLL-F2/MLL-T2/AF9-R1;
- б) MLL-F2/MLL-T2/AF9-R2;
- в) MLL-F2/MLL-T2/AF9-R3.

Если диагностическая ПЦР выявила экспрессию гена MLL-ENL, для проведения реакции готовят реакционную смесь, содержащую 12,5 мкл 2х мастер микса для ПЦР в реальном времени с флуоресцентной пробой, 300 нМ праймеров и 200 нМ пробы (MLL-F1/MLL-T1/ENL-R1/ENL-R2 и MLL-F2/MLL-T2/ENL-R1/ENL-R2), воды до 20 мкл и 5 мкл кДНК (общий объем реакционной смеси 25 мкл). Реакцию, содержащую исследуемую кДНК, реакцию, содержащую воду и/или кДНК без экспрессии MLL-ENL (К-) вносят в оптические пробирки (можно использовать 96-луночный планшет или ленты из пробирок), тщательно закрывают оптическими крышками (оптической пленкой), осаждают и помещают в термоциклер для проведения ПЦР в реальном времени. Реакционную смесь инкубируют 2 мин при 50°C, 10 мин при 95°C, затем проводят 50 циклов ПЦР (95°C — 15 с, 60°C — 60 с), считывание флуоресценции проводят на этапе элонгации.

После ПЦР выбирают реакцию, дающую наименьшее значение C_t , т. е. содержащую праймеры/пробы, наиболее подходящие для варианта транскрипта исследуемого гена. Задача этого этапа — определить, какой вариант гена присутствует у пациента. В этом случае возможны несколько вариантов:

Определяется нуклеотидная последовательность, ограниченная праймерами MLL-F1/MLL-T1/ ENL-R1/ENL-R2. На следующем этапе вносят исследуемый образец в пробирки, содержащие следующие комбинации праймеров/пробы:

- а) MLL-F1/MLL-T1/ENL-R1;
- б) MLL-F1/MLL-T1/ENL-R2.

4. Определяется нуклеотидная последовательность, ограниченная праймерами MLL-F2/MLL-T2/ ENL-R1/ENL-R2. На следующем этапе вносим исследуемый образец в пробирки, содержащие следующие комбинации праймеров/пробы:

- А. MLL-F2/MLL-T2/ENL-R1;
- Б. MLL-F2/MLL-T2/ENL-R2.

После амплификации используют комбинацию праймеров и пробы, которая дает наименьшее значение C_t (с использованием которой амплификация выявляется на более ранних циклах ПЦР). В дальнейшем эту комбинацию используют для оценки уровня МОБ.

Определение МОБ у пациентов с химерными онкогенами MLL-AF6, MLL-AF10, MLL-ELL

Если отсутствуют стандартные праймеры/проба для оценки уровня МОБ, продукты амплификации, полученные в ходе диагностики, секвенируют с использованием праймеров, указанных в таблице 3. Для этого 3 мкл очищенного продукта смешивается с прямым или обратным праймером, вносятся реактивы в соответствии с методикой, описанной в наборе, содержащем флуоресцентно меченные дидезоксинуклеотиды. После реакции секвенирования в продукт секвенирования объемом 20 мкл вносится 5 мкл 0,125 М ЭДТА, 65 мкл 96% спирта, инкубируется в течение 15 мин и осаждается при 14000 об./мин. После удаления супернатанта в пробирку вносится 120 мкл 70% спирта, и центрифугирование повторяют в течение 20 мин. Затем супернатант удаляют, осадок сушат, ресуспендируют в 15–20 мкл формамида, денатурируют в течение 5 мин при 95°C и загружают в генетический анализатор для капиллярного электрофореза продуктов секвенирующей реакции.

Полученные данные анализируют с использованием баз данных, определяют точку слияния экзонов генов партнеров и проводят дизайн праймеров/проб исходя из следующих параметров:

- размер ПЦР продукта — 50–150 пар оснований;
- размер праймеров (олигонуклеотидов) — 18–23 основания;
- температура отжига праймеров — 58–62°C;
- содержание GC — от 30 до 80%;
- максимальное количество одинаковых последовательных оснований — 5;
- размер пробы (олигонуклеотида) — 18–30 оснований;
- температура отжига праймеров — 68–72°C;
- содержание GC — от 30 до 80%.

Проба размещается между праймерами и метится с 5 конца красителем, с 3 конца — гасителем.

После подбора праймеров/пробы проводят проверку на наличие полиморфизмов в местах посадки праймеров для снижения вероятности формирования димеров праймеров, гомодимеров, шпилечных структур.

2. *Определение МОБ по химерным онкогенам BCR-ABL1, PML-RARa, AML1-ETO, CBFB-MYH11 количественным методом*

Анализ экспрессии химерных онкогенов BCR-ABL1, PML-RARa, AML1-ETO, CBFB-MYH11 проводится на кДНК методом ПЦР в реальном времени с использованием TaqMan зондов. Так как онкогены BCR-ABL1 имеют два варианта транскриптов с белковыми продуктами p210 (Mbcf) и p190 (mbcf), PML-RARa — три варианта транскриптов bcr1, bcr2, bcr3, CBFB-MYH11 — основных три: тип А, тип D, тип Е, анализ проводится в зависимости от типа транскрипта.

Таблица 2. — Последовательности олигонуклеотидов для оценки МОБ у пациентов с онкогенами BCR-ABL1, PML-RARa, AML1-ETO, CBFB-MYH11

Ген	Название праймеры/пробы	5–3 последовательность
<i>ABL1</i>	ENF1003	TGGAGATAACAСТСТАAGCATAACTAAAGGT
	ENPr1043	Fam CCATTTTTGGTTTGGGCTTCACACCATT BHQ1
	ENR1063	GATGTAGTTGCTTGGGACCCA
<i>BCR-ABL1</i>	ENF402 BCR для p190	CTGGCCCAACGATGGCGA
	ENP541 ABL	Fam CCCTTCAGCGGCCAGTAGCATCTGA BHQ1
	ENR561 ABL	CACTCAGACCCTGAGGGCTCAA
	ENF501 BCR для p210	TCCGCTGACCATCAAYAAGGA
<i>AML1-ETO</i>	ENF701 AML1	CACCTACCACAGAGCCATCAA A
	ENP747 AML1	Fam ACCTCGAAATCGTACTGAGAAGCACTCCA BHQ1
	ENR761 ETO	ATCCACAGGTGAGTCTGGCATT
<i>PML-RARa</i>	ENF903 PML для bcr1	TCTTCCTGCCCAACAGCAA
	ENF906 PML для bcr2	ACCTGGATGGACCGCCTAG
	ENF905 PML для bcr3	CCGATGGCTTCGACGAGTT
	ENP942 RARa	Fam AGTGCCCAGCCCTCCCTCGC BHQ1
	ENR962 RARa	GCTTGTAGATGCGGGGTAGAG
<i>CBFB-MYH11</i>	ENF803 CBFB	CATTAGCACAACAGGCCTTTGA
	ENPr843 CBFB	Fam TCGCGTGTCTTCTCCGAGCCT BHQ1
	ENR862MYH11 для типа А	AGGGCCCGCTTGGACTT
	ENR863MYH11 для типа D	CCTCGTTAAGCATCCCTGTGA
	ENR865MYH11 для типа Е	CTCTTCTCCAGCGTCTGCTTAT

Для химерных онкогенов BCR-ABL1, PML-RAR α , AML-ETO, CBFB-MYH11 и контрольного гена ABL1 предусмотрены коммерческие стандарты для определения абсолютного количества копий генов. Для генов BCR-ABL1, PML-RAR α , AML-ETO, CBFB-MYH11 диапазон стандартов включает следующие концентрации: 10¹; 10²; 10³; 10⁵; 10⁶; для ABL1 — 10³; 10⁴; 10⁵.

Для проведения реакции готовят реакцию смесь на основе любого коммерческого набора для ПЦР в реальном времени с TaqMan пробамии, согласно инструкции производителя с 300 нМ праймеров и 200 нМ пробы и 5 мкл кДНК или стандартов. Общий объем реакционной смеси составляет 25 мкл. Обязательна постановка отрицательного контроля. Реакционную смесь инкубируют 2 мин при 50°C, 10 мин при 95°C, затем проводят 50 циклов ПЦР (95°C — 15 с, 60°C — 60 с), считывание флуоресценции проводится на этапе элонгации.

3. Определение МОБ по дупликации гена FLT3-ITD полуколичественным методом

Для определения внутренней дупликации гена FLT3-ITD используются праймеры, амплифицирующие участок, содержащий экзоны, участвующие в перестройке. Затем данный участок секвенируется, определяется точная последовательность данной дупликации и подбираются пациент-специфические праймеры.

Для проведения реакции готовят реакцию смесь на основе любого коммерческого набора для ПЦР в реальном времени с TaqMan пробамии согласно инструкции производителя с 300 нМ праймеров и 200 нМ пробы. Общий объем реакционной смеси составляет 25 мкл.

Расчет МОБ производят как отношение количества мутантного FLT3-ITD (отражающее количество опухолевых клеток в образце) к контрольному гену альбумина ALB (отражающее количество всех клеток в образце — как опухолевых так и нормальных) относительно показателя на момент постановки диагноза.

Для определения эффективности реакции и чувствительности выполняют 10-кратные разведения ДНК первичной точки (от 10⁰ до 10⁻⁶) в поликлональной ДНК здоровых доноров. Качество калибровки определяется тремя параметрами: slope (наклон) 3,3 (3,1–3,9), коэффициент корреляции (0,95–1) и эффективность ПЦР, которая должна быть 90–110%.

Полученные стандартные кривые используют для расчета относительного количества продуктов амплификации мутантного гена FLT3-ITD по отношению к альбумину с учетом эффективности реакции:

$$\text{МОБ}\% = (1 + E)^{-(\Delta\text{CtU} - \Delta\text{CtC})} \times 100\%.$$

$\Delta\text{Ct} = \text{Ct}_{\text{FLT3-ITD}} - \text{Ct}_{\text{ALB}}$, где ΔCtU — значение ΔCt в исследуемом образце; ΔCtC — значение ΔCt в калибраторе (в первичной точке); E — эффективность амплификации.

Интерпретация результатов

Оценка качества ПЦР

В результате ПЦР получают несколько типов данных — о цикле, на котором кривая амплификации пересекает пороговый уровень (threshold),

т. н. пороговый цикл C_t ; о количестве копий исследуемых молекул во внесенном материале при использовании стандартов.

Перед началом анализа необходимо убедиться в том, что параметры ПЦР позволяют получить качественные результаты — эффективность должна быть 100% (95–105%), тангенс угла наклона кривой составляет -3,32, коэффициент корреляции $R = 0,995-1,005$.

В случае соответствия стандартной кривой заданным параметрам оценивают разброс параметров C_t для контрольного и исследуемого гена, который в идеале не должен превышать 0,5 цикла. Следует также отметить, что экспрессия контрольного гена должна составить не менее 10 000 копий гена, в C_t это составляет не более 26–29 циклов.

Оценка уровня экспрессии и определение МОБ при анализе с использованием абсолютного количественного измерения экспрессии генов

Для оценки уровня экспрессии усредненное количество копий ИГ разделяют на количество копий КГ на момент постановки диагноза. Полученное значение нормализованной экспрессии ИГ на момент постановки диагноза принимают за 100% и в дальнейшем с ним сопоставляют все последующие точки, выражая уровень МОБ в процентах (%) от диагноза. Изменение уровня МОБ можно также выражать в логарифмах, когда 1 логарифму соответствует изменение в 10 раз.

Если качество кДНК низкое (например, менее 10 000 копий гена Абельсон), и химерный ген не амплифицируется, ответ с использованием данного материала выдан быть не может по причине низкого качества или недостаточного количества материала. Рекомендуется также перевыделить РНК/пересинтезировать кДНК и повторить ПЦР.

Низкое качество кДНК (например, менее 10 000 копий гена Абельсон) и амплификация химерного гена свидетельствуют о том, что экспрессия гена в образце присутствует, но количественно интерпретировать данные не представляется возможным с использованием данного материала. Рекомендуют также перевыделить РНК/пересинтезировать кДНК и повторить ПЦР.

В случае высокого качества материала при отсутствии амплификации ИГ речь идет о том, что экспрессия изучаемого гена в исследованном образце не определяется или отсутствует.

Оценка уровня экспрессии и определение МОБ при анализе с использованием полуколичественного измерения экспрессии генов

После подбора оптимальной комбинации праймеров/пробы идет определение уровня МОБ в ходе терапии. Для постановки ПЦР готовят реакционные смеси, содержащие необходимые реактивы для амплификации 2+2n пробирок в случае контрольного гена и 2+2n пробирки для амплификации искомого гена, где n — количество образцов, анализируемых с использованием выбранной комбинации праймеров. В качестве контрольного гена используют ABL (чаще) или GUS. Выбранный контрольный ген целесообразно использовать постоянно для данного типа химерных генов, предпочтительнее — для всех анализов, проводимых в лаборатории.

Для оценки уровня экспрессии от усредненного значения Ct ИГ следует вычесть значение Ct КГ на момент постановки диагноза (ΔCt). Затем 2 следует возвести в степень ΔCt . Полученное значение нормализованной экспрессии ИГ на момент постановки диагноза принимают за 100% и в дальнейшем с ним сопоставляют все последующие точки, выражая уровень МОБ в процентах (%) от диагноза. Применяется также выражение уровня МОБ в логарифмах, когда 1 логарифму соответствует изменение в 10 раз.

Если качество кДНК низкое (например, $Ct > 26-29$ циклов при амплификации гена Абельсон) и химерный ген не амплифицируется, ответ с использованием данного материала выдан быть не может — низкое качество или недостаточное количество материала. Рекомендуется также перевыделить РНК/пересинтезировать кДНК и повторить ПЦР.

Низкое качество кДНК (например, $Ct > 26-29$ циклов при амплификации гена Абельсон) и амплификация химерного гена свидетельствуют о том, что экспрессия гена в образце присутствует, но количественно интерпретировать данные не представляется возможным с использованием данного материала. Рекомендуется также заново выделить РНК и/или повторно синтезировать кДНК и повторить ПЦР.

В случае высокого качества материала при отсутствии амплификации ИГ речь идет о том, что экспрессия изучаемого гена в исследованном образце не определяется или отсутствует.

Методика флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH)

1. Стекла с фиксированным в жидкости Карнуа (метанол-уксусная кислота 3:1) материалом выдерживают при 56°C 2–3 ч, дают остыть при комнатной температуре.

2. Остывшие стекла просматривают под оптическим микроскопом с общим увеличением $\times 100$, выбирают участки с достаточной клеточностью и равномерно распределенными клетками. Участок помечается.

3. Помещают стекла в раствор $2\times\text{SSC}$, предварительно прогретый до 37°C , на 30 минут.

4. Дегидратируют образцы в серии спиртов (70; 80 и 96% этанол) по 2 мин при комнатной температуре.

5. Стекла сушат вертикально 10–15 мин при комнатной температуре.

6. В обозначенную зону интереса наносят предварительно приготовленный ДНК-зонд, накрывают покровным стеклом и заклеивают края резиновым клеем. Особое внимание следует уделить отсутствию пузырьков воздуха между покровным и предметными стеклами, проба должна быть нанесена по центру выделенной зоны.

7. ДНК денатурируют и гибридизируют на режиме, указанном фирмой-производителем (температура и время). Оптимальное время гибридизации 16–20 ч.

8. Покровные стекла быстро снимают и отмывают в растворе $0,4\times\text{SSC}/0,3\%$ NP40 в течение 2 мин при температурах, указанных производителем.

9. Стекла выдерживают 10 мин в 2xSSC/0,1% NP40 при комнатной температуре.

10. Дегидратируют образцы в серии спиртов (70; 80 и 96% этанол) по 2 мин при комнатной температуре. Затем 15–20 мин стекла сушат вертикально при комнатной температуре в темноте.

11. Наносят рабочий раствор DAPI, накрывают покровным стеклом. Через 10-15 мин возможен анализ стекла.

12. Анализируют полученный результат под флуоресцентным микроскопом с соответствующими пробам фильтрами на общем увеличении x1000-1500.

13. Окрашенный препарат может храниться 0,5–2 года при температуре -20°C или 3–6 мес. при +4–8°C, для дальнейшего или повторного анализа.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Отсутствуют.

Алгоритм определения МОБ при ОМЛ

Первичная диагностика.
Определение маркеров для определения МОБ: молекулярно-генетические aberrации и/или ЛАИФ

*ЛАИФ определяется во всех случаях ОМЛ (применимость >90%). Молекулярно-генетические aberrации выявляются у 35–60% пациентов



14-й день терапии — взятие КМ для определения МОБ молекулярно-генетическим методом пациенту с ОМЛ при наличии молекулярно-генетического маркера
*Методом проточной цитометрии МОБ не определяется вследствие низкой клеточности костного мозга



По восстановлении гемопоза перед консолидацией 1 (28–43-й день лечения): 1) взятие КМ для определения МОБ у молекулярно-генетическим методом пациенту с ОМЛ при наличии молекулярно-генетического маркера; 2) взятие КМ для определения МОБ методом проточной цитометрии



Перед каждым последующим курсом консолидации либо перед ТГСК: 1) взятие КМ для определения МОБ молекулярно-генетическим методом пациенту с ОМЛ при наличии молекулярно-генетического маркера 2) взятие КМ для определения МОБ методом проточной цитометрии

В течение 1-го года после завершения полихимиотерапии исследование МОБ проводится 1 раз в 6 мес.: 1) взятие КМ для определения МОБ молекулярно-генетическим методом пациенту с ОМЛ при наличии молекулярно-генетического маркера; 2) взятие КМ для определения МОБ методом проточной цитометрии.

На 2-м году наблюдения исследование МОБ проводится 1 раз в 6 мес. только тем пациентам, у которых есть молекулярно-генетический маркер.

В последующие годы наблюдения исследование МОБ проводится 1 раз в год только тем пациентам, у которых есть молекулярно-генетический маркер.

Пациентам после ТГСК исследование МОБ проводится в установленные сроки при наличии у них молекулярно-генетического маркера.

**В случае наличия молекулярно-генетического маркера и невозможности проведения анализа ПЦР МОБ исследуется в установленные сроки с помощью метода флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH).