

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

Е.Л.Богдан

«29» декабря 2020 г.

Регистрационный № 121-1120



МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ СООТНОШЕНИЯ КЛЕТОК ДОНОР-РЕЦИПИЕНТ (ХИМЕРИЗМА) У ПАЦИЕНТОВ ПОСЛЕ АЛЛОГЕННОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК
(инструкция по применению)

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

АВТОРЫ: Корзик А.В., Филипович Т.В., Русакович Е. Ю., к.б.н. Савицкая Т.В., к.б.н. Липай Н.В., к.м.н. Минаковская Н.В., к.б.н. Белевцев М.В.

Минск, 2020

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель министра

29.12.2020 Е. Л. Богдан
Регистрационный № 121-1120

**МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ СООТНОШЕНИЯ КЛЕТОК ДОНОР-РЕЦИПИЕНТ
(ХИМЕРИЗМА) У ПАЦИЕНТОВ ПОСЛЕ АЛЛОГЕННОЙ
ТРАНСПЛАНТАЦИИ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК**

инструкция по применению

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

АВТОРЫ: А. В. Корзик, Т. В. Филипович, Е. Ю. Русакович, канд. биол. наук
Т. В. Савицкая, канд. биол. наук Н. В. Липай, канд. мед. наук Н. В. Минаковская,
канд. биол. наук М. В. Белевцев

Минск 2020

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- аллоТГСК — аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток
- ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота
- ПЦР — полимеразная цепная реакция
- ALB — albumin (референсный ген)
- DB — digestion buffer (лизирующий буфер)
- InDel — insertion/deletion (инсерция/делеция)
- MACS — Magnetic Activated Cell Sorting
- PBS — phosphate buffered saline (натрий-фосфатный буфер)
- RCLB — red cell lysis buffer (буфер для лизиса эритроцитов)
- RQ-PCR — Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction (количественная полимеразная цепная реакция в реальном времени)
- SDS — sodium dodecyl sulfate
- STR-ПЦР — short tandem repeat ПЦР (полимеразная цепная реакция для коротких tandemных повторов)

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложен метод определения соотношения клеток донор-реципиент (химеризма) у пациентов после аллогенной трансплантации с помощью ПЦР в режиме реального времени, который может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на оценку приживления трансплантата, после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток.

Метод, изложенный в настоящей инструкции, предназначен для врачей-гематологов, врачей-трансплантологов, врачей-онкологов, врачей-иммунологов, врачей лабораторной диагностики и иных врачей-специалистов, оказывающих медицинскую помощь пациентам со злокачественными гематологическими, незлокачественными заболеваниями, а также нарушениями, вовлекающими иммунные механизмы в стационарных и (или) амбулаторных условиях, и (или) условиях отделений дневного пребывания.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

1. Перчатки нитриловые/латексные неопудренные.
2. Дезинфицирующий раствор без содержания спиртов.
3. Емкость для утилизации отходов и дезсредства.
4. Маркер.
5. Пробирки с консервантом (этилендиаминтетрауксусная кислота, цитрат натрия).
6. Одноразовые пробирки объемом 15 и 50 мл.
7. Дозаторы переменного объема (0,1–10; 20–200; 100–1000 мкл).
8. Пастеровские пипетки.
9. Одноразовые наконечники с фильтром до 10, 100, 200, 1000 мкл.
10. Одноразовые пробирки типа «эппендорф» 0,2–1,5 мл.
11. Оптический прозрачный пластик (стрипы, плашки или пробирки) для ПЦР в режиме реального времени.
12. Штатив с охлаждением под пробирки 0,5 и 0,2 мл.
13. Камера Горяева.
14. Микроскоп для подсчета клеток.
15. Спектрофотометр.
16. Вортекс.
17. Термомиксер.
18. Центрифуга для пробирок с адаптером под пробирки 15 и 50 мл.
19. Центрифуга с охлаждением на 14 000 об/мин и адаптером под пробирки типа «эппендорф» 1,5–2 мл.
20. Вакуумный аспиратор.
21. Морозильники -20, -80 °С.
22. Термоциклер для ПЦР в режиме реального времени.
23. Проточный цитомтр.

24. Компьютер с программным обеспечением для управления прибором ПЦР в режиме реального времени, хранения данных и анализа.

Реактивы

1. Буфер для лизиса эритроцитов (RCLB).
2. Натрий-фосфатный буфер (PBs, pH = 7,5).
3. Раствор фиколл-урографина ($\rho = 1,077$ г/мл).
4. Раствор 3 % уксусной кислоты.
5. Деионизированная вода.
6. Лизирующий буфер (DB).
7. Лизирующий буфер для сортированных клеток.
8. Фенол-хлороформ.
9. 8М ацетат аммония.
10. Изопропанол.
11. Этанол 70 %.
- 12 Proteinase K.
13. Набор для сортировки клеток.
14. Набор праймеров и TaqMan-зондов для амплификации InDel-мишеней.
15. Буфер для ПЦР в режиме реального времени.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

1. Злокачественные новообразования лимфоидной, кроветворной и родственных им тканей (МКБ-10: C81–C96).
2. Новообразования неизвестного и неопределенного характера (МКБ-10: D37–D48).
3. Болезни крови, кроветворных органов и отдельных нарушений, вовлекших иммунный механизм (МКБ-10: D50–D89).

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Отсутствуют.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

1. Подготовка материала для исследования

В качестве материала для исследования используют образцы периферической крови/костного мозга. Для забора крови необходимы пробирки с консервантом (этилендиаминтетрауксусная кислота, цитрат натрия). После забора материал в пробирке тщательно перемешивают путем покачивания. До исследования материал можно хранить при комнатной температуре не более 24 ч.

Для каждой пары донор/реципиент проводят забор необходимого материала периферической крови/костного мозга непосредственно перед аллогенной трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток (аллоТГСК). Для определения химеризма после аллоТГСК у реципиентов производят забор периферической крови на +30, +60, +100, +180, +245, +365 и костного мозга на +30, +60, +100, +180, +365 дни.

Образец в объеме 3–10 мл набирают в пробирку, содержащую калий-этилендиаминтетрауксусную кислоту в качестве антикоагулянта.

1.1. Выделение мононуклеаров периферической крови и костного мозга

Клетки реципиента до аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (аллоТГСК), а также клетки донора лизируют с помощью RCLB (100 mM NaCl, 10 mM TrisHCl, 25 mM EDTA, 0,5 % SDS). Материал без сгустков переносят в пробирку на 50 мл, добавляют RCLB в соотношении 1:3 и тщательно перемешивают. Лизис проводят на льду 10–15 мин и центрифугируют 10 мин 1700g при температуре 4 °С. Осадок отмывают в натрий-фосфатном буфере (PBS – phosphate buffered saline) и центрифугируют 10 мин 1700g при температуре 4 °С. Суспензию переносят в пробирки типа «эппендорф» по 5–10 млн клеток для выделения ДНК.

После аллоТГСК мононуклеары выделяют на градиенте плотности (раствор фиколл-урографина $\rho = 1,077$ г/мл). Биоматериал (периферическая кровь, костный мозг) переносят в пробирку, если материал густой и имеет сгустки, то разбавляют PBS в 2–3 раза и разбивают сгустки. В пробирку на 15 мл вносят раствор фиколл-урографина в количестве 1/2 от объема материала (≈ 4 мл гистопак на 10 мл биоматериала), сверху аккуратно наслаивают разбавленный биоматериал. Центрифугируют 20–30 мин 400g при комнатной температуре. На границе раздела фаз отбирают кольцо мононуклеарных клеток (не задевая гистопак, можно отбирать с плазмой) и переносят в новую пробирку. Клетки отмывают в PBS, центрифугируют 10 мин 1700g при температуре 4 °С. Оставшиеся эритроциты лизируют с RCLB (1–3 мл в зависимости от количества клеток и оставшихся эритроцитов) 5–10 мин при комнатной температуре. Затем клетки отмывают в PBS еще раз и сортируют аналогично методике с RCLB для дальнейшего выделения ДНК.

Определение количества и концентрации клеток в образце проводят в растворе 3 % уксусной кислоты в камере Горяева. Пробирки с клеточными осадками хранят при температуре -20 °С.

Для последующей сортировки клеток методом проточной цитометрии или магнитной сепарации клеток необходимо провести концентрацию ядросодержащих клеток. Выделение мононуклеаров на градиенте плотности предпочтительнее, так как позволяет получать хорошую суспензию жизнеспособных клеток. Однако, при нехватке материала возможно выделение гранулоцитов из нижней фазы после градиента плотности при помощи лизиса с RCLB. Для поддержания жизнеспособности клеток в отмывочные растворы был введен бычий сывороточный альбумин (BSA).

1.2. Сортировка по клеточным субпопуляциям (Т-, В-, ЕК-клетки, гранулоциты) с помощью MACS или FACS методов

MACS метод

А) Сортировка популяции Т-лимфоцитов (CD3+)

Используют набор для сортировки Т-лимфоцитов. Позволяет осуществлять позитивную селекцию CD3+ Т-лимфоцитов непосредственно из

антикоагулированной цельной крови (можно использовать мононуклеары). Для сортировки рекомендуется использовать не менее 16 млн клеток. Сортировка производится согласно инструкции производителя набора.

Б) Сортировка популяции В-лимфоцитов (CD19+)

Используют набор для сортировки В-лимфоцитов. Позволяет осуществлять позитивную селекцию CD19+ В-лимфоцитов. Для сортировки рекомендуется использовать не менее 25 млн клеток. Сортировка производится согласно инструкции производителя набора.

В) Сортировка популяции гранулоцитов (CD15+)

Используют набор для сортировки гранулоцитов. Позволяет осуществлять позитивную селекцию CD15+ гранулоцитов. Для сортировки рекомендуется использовать не менее 10 млн клеток. Сортировка производится согласно инструкции производителя набора.

Г) Сортировка популяции естественных киллеров (CD56+)

Используют набор для сортировки естественных киллеров. Позволяет осуществлять негативную селекцию CD56+ естественных киллеров. Для сортировки рекомендуется использовать не менее 50 млн клеток. Сортировка производится согласно инструкции производителя набора.

Д) Сортировка популяции CD34+

Используют набор для сортировки CD34+ клеток. Позволяет осуществлять позитивную селекцию CD34+ клеток. Для сортировки рекомендуется использовать не менее 40 млн клеток. Сортировка производится согласно инструкции производителя набора.

FACS метод

Клетки (оптимально 2–4 млн) окрашиваются антителами. При одновременной сортировке двух популяций необходимо использовать антитела мечеными флуорофорами, спектры которых не прикрываются. Метки антител могут меняться в зависимости от наличия реагентов в лаборатории.

Клетки окрашивают в темноте 15 мин и отмывают буфером PBS с 3 % BSA. Затем осаждают при 2200 об/мин в течение 3–5 мин. Супернатант удаляют и клетки разводят в 0,5–1 мл PBS буфера с 3 % BSA.

Суспензию клеток обязательно фильтруют через специальный фильтр для клеток с диаметром ячеек 70 мкм, чтобы убрать агрегаты клеток. Сортировка на проточном цитометре.

Рекомендуемая чистота сортировки 95–100 % клеток, при более низкой чистоте высока вероятность получения неверного результата из-за высокой примеси других клеток.

1.3. Выделение ДНК из мононуклеаров периферической крови и костного мозга

Выделение ДНК производят методом фенол-хлороформной экстракции. К суспензии клеток добавляют 1 мл ДВ. Лизат пипетируют и вортексируют до гомогенного состояния (без комков или хлопьев). Инкубируют 1 ч при температуре

55 °С или ночь 37 °С. Если лизат густой, то добавляют еще до 0,5 мл ДВ и инкубируют. Фенол-хлороформ добавляют в количестве 0,6 мл на 1 мл ДВ. Смесь интенсивно перемешивают (если фенол-хлороформ собирается каплями на дне, то разбавляют лизат с помощью ДВ) и центрифугируют 1–2 мин до 5000 об/мин. Верхнюю водную фазу, содержащую ДНК, переносят в новые пробирки типа «эппендорф». Экстракцию ДНК можно повторить еще раз, если раствор ДНК густой (перед этим подержать пробирку 10 мин при температуре 50 °С). ДНК высаливают 8М ацетатом аммония в количестве 1/2 от объема, на этом этапе можно добавить еще 100 мкл ДВ и тщательно перемешать до помутнения раствора. Далее инкубируют при температуре -70 °С 2–3 мин или при температуре -20 °С — 10–20 мин (можно оставить на ночь при температуре 4 °С), центрифугируют 20 мин 14 000 об/мин при температуре 4 °С. Водную фазу с ДНК преципитируют в равном объеме изопропанола, центрифугируют 20–30 мин при 14 000 об/мин при температуре 4 °С. Осадок отмывают 70 %-м этанолом. Пробирки с ДНК хранят при температуре -20 °С (можно при -80 °С).

1.4. Выделение ДНК из сортированных клеток

После сортировки, как правило, получается небольшое количество клеток (от 300 до 500 тыс.) из-за малого количества изначального биоматериала и/или цитопении после аллоТГСК. Для выделения ДНК из образцов с малым количеством клеток (до 500 тыс.) используют метод прямого лизиса с протеиназой К. Для этого к осадку клеток добавляют лизирующий буфер Lysis Buffer (Tris-HCl 10 mM, NaCl 50 mM, MgCl₂ 6,25 mM, NP40 0,045 %, Tween-20 0,45 %) и Proteinase K. Затем инкубируют 1 ч при 65 °С и инактивируют 15 мин при 95 °С.

1.5. Растворение и измерение концентрации ДНК

Дезоксирибонуклеиновую кислоту разводят деионизированной водой до конечной концентрации 50 нг/мкл, минимальная пороговая концентрация необходимая для проведения ПЦР в режиме реального времени 25–30 нг/мкл. Для лучшего растворения рекомендуется инкубировать в термомиксере при температуре 37 °С в течение 1 ч. После инкубации раствор ДНК тщательно вортексируют и осаждают капли. Качественную и количественную оценку ДНК проводят на спектрофотометре. Для каждого измерения оценивают значение концентрации и соотношение A260/A280 и A260/A230. Значение для чистой ДНК по A260/A280 должно находиться в диапазоне 1,8-2,0, по A260/A230 в диапазоне 2,0-2,2. В случае соответствия материал готов к исследованию.

2. Оценка уровня химеризма методом InDel-ПЦР

2.1. Скрининг InDel-мишеней и их выбор

Скрининг InDel-мишеней производят для каждой пары донор/реципиент перед аллоТГСК для выявления информативных аллелей, а также на +30, +45, +60, +80, +100, +180, +245, +365 дни и каждые последующие полгода после аллоТГСК для реципиента. При диагностике методом InDel-ПЦР аллели могут быть информативными для донора (аллель донора амплифицируется, и не

амплифицируется аллель реципиента) и для реципиента (наоборот, амплифицируется только аллель реципиента).

Критерии выбора InDel-мишеней:

полиморфизмы InDel и нулевые аллели должны быть биаллельными;

биаллельные полиморфизмы должны отличаться, по крайней мере, 3 последовательными варьируемыми основаниями с длиной ≥ 3 пар оснований (п.о.);

полиморфизмы должны показывать высокий уровень гетерозиготности в общей и/или европейской популяции в целом с вероятностью выявления отличий клеток реципиента от донора выше 20 %.

В таблице 1 представлены полиморфизмы, подобранные для оценки химеризма на основании литературных данных и баз данных для основной панели скрининга химеризма. Принцип отбора мишеней для основной панели следующий:

Ст мишеней должно быть в пределах 20–26 цикла;

InDel мишени должны встречаться более, чем у 50 % доноров;

не должно быть неспецифической амплификации.

Таблица 1. — Полиморфизмы инсерция/делеция к основной панели, удовлетворяющие критериям алгоритма подбора мишеней для оценки химеризма

Название	Тип	Последовательность	Длина, п. о.	Частота в общей популяции		Частота в европейской популяции		Вероятность применения	
				аллели W/M	генотип WW/MM	аллели W/M	генотип WW/MM	W	M
rs34603233	Del	GAGCCCCTG	9	61/39	37/16	61/39	39/16	13,4	24,0
rs774322484	In	GAGCTGCTCAAGAG AGAGG	19	-	-	-	-	23,6*	12,7*
rs763617369	In	CAAGGTCCCACCAC ACTCGCGTGGGA	26	-	-	-	-	1,8*	27,3*
rs16626	In	GGACTTCACG	10	57/43	36/22	66/34	44/11	9,8	24,6
rs782544937	In	TCAACCAA	8	-	-	-	-	31,0*	21,8*
rs72501127	Del	AAC	3	53/47	30/25	57/43	32/17	25,0	21,8
rs113678447	In	CCAG	4	74/26	56/8	82/18	66/3,4	3,3	22,4
rs768578340, ACE***	In	GGGATTACAG	10	-	-	-	-	-	-
GSTT1	null	-	12090	-	-	-	-/19**	15,4	-
DCP1	In	-	287	-	32#/-	-	-	21,8	-

* — согласно Alizadeh, 2002;

** — согласно Kasthurinaidu, 2015;

*** — праймеры из статьи Koldehoff, 2006;

— согласно Velasco, 2005.

Примечания:

1) — W — аллель дикого типа;

2) — M — полиморфная аллель;

3) — In — инсерция;

4) — Del — делеция;

5) — null — нулевая аллель.

В таблице 2 представлены полиморфизмы дополнительной панели для скрининга химеризма. Для отбора маркеров дополнительной панели пользовались следующими критериями:

Ст мишеней должно быть в пределах 20–26 цикла, либо до 38 при наличии продукта амплификации;

встречаемость мишени менее чем у 50 % доноров, но более чем у 20 %;

не должно быть неспецифической амплификации.

Таблица 2. — Полиморфизмы инсерция/делеция к дополнительной панели, удовлетворяющие критериям алгоритма подбора мишеней для оценки химеризма

Название олигонуклеотида	Сокращенное название	Тип	Длина, п. о.	Последовательность олигонуклеотида, 5' → 3'
1	2	3	4	5
Y-хромосома (sys 3)	S 02F	-	-	AACTTTTGCCGAAGCTCACAA
	S 02R			TTGGTTTTTCGCAGGCAGACT
	S 02probe			CAGGCGCCTGAGCCACCCTCA
rs3832385* (sys 4)	S 03F	Del	4	CTTTTGCTTTCTGTTTCTTAAGGGC
	S 03R			TCAATCTTTGGGCAGGTTGAA
	S 03probe			CATACGTGCACAGGGTCCCCGAGT
rs113678447 (sys 15)	S 09aF	In	4	GGGCACCCGTGTGAGTTTT
	S 09bR			CAGCTTGTCTGCTTTCTGCTG
	S 09aprobe			TGGAGGATTTCTCCCCTGCTTCAGACAG
rs146813605 (sys 18)	S 11bF	Del	9	CCCTGGATCGCCGTGAA
	S 11aR			CCAGCATGCACCTGACTAACA
	S 11aprobe			CAAGGCTTCCTCAATTCTCCACCCTTCC
rs146813605 (sys 19)	S 11aF	Del	9	TAGGATTC AACCTGGAAGC
	S 11aR			CCAGCATGCACCTGACTAACA
	S 11aprobe			CAAGGCTTCCTCAATTCTCCACCCTTCC
GSTM1 (sys 24)	GSTM1_F	null	-	CCATGGTTTGCAGGAAACAAGG
	GSTM1_R			AGAATATGTGGGCTGGAACCTC
	GSTM1_probe			GGGGAATGAGATCTGTTTTGCTTCACG
rs4399** (sys 27)	rs4399_F	In-Del	22	TGACTAATTGGCAGGAGCAGAC
	rs4399_R			ATTCATCGAGGCTGGACTAGAC
	rs4399_probe			CGGGGTAACGGGGCCTCTGA
rs36208070 FVII (sys 29)	FVII_F	In	10	CCCAACTTACATTCCTATATCCT
	FVII_R			GGGACAGGAGAAAGGTCAGG
	FVII_probe			TTGAAGTGTTGGTGCCACACAC
rs3045215 (sys 32)	S12_bF	In	9	TGAGGTCAAATTCCAAAGTGC
	S12_R			TGACTCAGTGCAGACTGGTCTCT
	S12probe			TTTCTGCATGTGTGCATTCA
rs16416 (sys 42)	S40_aF	Del	4	GCTTTCCTACAGCCTCACAGA
	S40_R			CCTCCTCCCACCCACAAAAT
	S40probe			ATGTGATCACCCAACTATTGTC
rs2307561 (sys 53)	S26_F	Del	6	AACCCCCACTAGCATCAAGA
	S26_aR			AGGTCCTACAAATGTACAACACT
	S26probe			GCACTGCTCCTTATTCAGGC

Продолжение таблицы 2

1	2	3	4	5
rs3081400 (sys 61)	S31_F	Del	5	TGAGTGAGCACGCAGACAAT
	S31_bR			TTATAGAAGCCCTTTGTCCCAT
	S31probe			TGCAAGAAAGCAAGATGACA
rs8190570 (sys 63)	S32_aF	Del	9	ACCTCAGTTCATCTTTGTGGTCT
	S32_R			TGGCTACTTTGGCGTCTGAG
	S32probe			ACTAAAGTGGAGCCCCAGAACCCT
rs2307581 (sys 64)	S33_aF	In	18	CCAAAATTTTCATCCTATTCTACTCTGA
	S33_R			ACCCTTGAAATTATAGTCTGGACAGT
	S33probe			AGCGATGCTGTTCCGCCAACT
rs2307581 (sys 65)	S33_bF	In	18	CCAAAATTTTCAGAGGGGACA
	S33_R			ACCCTTGAAATTATAGTCTGGACAGT
	S33probe			AGCGATGCTGTTCCGCCAACT
rs2067204 (sys 68)	S36_F	In	12	TACATGTCAACCCCTTGGC
	S36_bR			TCCTGAGGGAAGCATCAACAC
	S36probe			AGCGTGCAGGGTTAGTTTGGTGA

* — согласно Alizadeh, 2002;
 ** — согласно Ksthurinaidu, 2015;
 *** — праймеры из статьи Koldehoff, 2006;
 # — согласно Velasco, 2005.

Примечания:

- 1) — W — аллель дикого типа;
- 2) — M — полиморфная аллель;
- 3) — In — инсерция;
- 4) — Del — делеция;
- 5) — null — нулевая аллель.

Применимость для аллеля дикого типа (W) рассчитывают по формуле 1:

$$\% = (WW + WM) * (100 - WW - WM) / 100, \quad (1)$$

где WW — частота встречаемости генотипа дикого типа в гомозиготном состоянии в Европейской популяции;

MW — частота встречаемости аллеля в гетерозиготном состоянии в Европейской популяции.

Для мутантного аллеля (формула 2):

$$\% = (MM + WM) * (100 - MM - WM) / 100, \quad (2)$$

где WW — частота встречаемости генотипа дикого типа в гомозиготном состоянии в Европейской популяции;

MW — частота встречаемости аллеля в гетерозиготном состоянии в Европейской популяции;

MM — частота встречаемости генотипа полиморфного типа в гомозиготном состоянии.

Последовательности проб и праймеров для каждого из полиморфизмов инсерция/делеция представлены в таблице 3 (для основной панели) и в таблице 4 (для дополнительной панели). Праймеры и пробы подобраны в соответствии с требованиями для проведения ПЦР в реальном времени.

Каждая система включает в себя пару олигонуклеотидов, состоящую из прямого и обратного праймеров, и пробы, которая имеет метку на 5' конце – FAM и на 3' конце – ВНQ-1.

Для мониторинга химеризма достаточно двух информативных маркеров.

Основная панель из 12 InDel мишеней (sys 1, 5, 6, 8, 11, 12, 14, 17, 20, 21, 25, 28) предназначена для обнаружения маркеров в исследуемых парах донор-реципиент, из нее информативными должны быть минимум 2 системы.

Дополнительная панель из 16 InDel мишеней используется для нахождения дополнительных маркеров при условии, что в основной панели для пары донор-реципиент была найдена только одна информативная аллель либо ни одной. В дополнительной панели в первую очередь рекомендуется использовать sys 3, 4, 15, 18, 19, 24, 27, 29. Для дополнительного скрининга также могут быть использованы sys 32, 42, 53, 61, 63, 64, 65, 68.

В качестве референсного гена для подсчета количества химеризма используется ген ALB (таблица 5).

Таблица 3. — Последовательности проб и праймеров к основной панели для скрининга химеризма

Название олигонуклеотида	Сокращенное название	Тип	Длина, п. о.	Последовательность олигонуклеотида, 5' → 3'
1	2	3	4	5
rs34603233 (sys 1)	S 01F	Del	9	GGTACCGGGTCTCCACATGA
	S 01R			GGGAAAGTCACTCACCCAAGG
	S 01probe			CTGGGCCAGAATCTTGGTCCTCACA
rs774322484 (sys 5)	S 04aF	In	19	CTGGTGCCACAGTTACGCT
	S 04aR			AAGGATGCGTGA CTGCTATGG
	S 04aprobe			TCCTGGCAGTGTGGTCCCTTCAGAA
rs774322484 (sys 6)	S 04aF	In	19	CTGGTGCCACAGTTACGCT
	S 04bR			AGGATGCGTGA CTGCTCCTC
	S 04aprobe			TCCTGGCAGTGTGGTCCCTTCAGAA
rs763617369 (sys 8)	S 05bF	In	26	AGTTAAAGTAGACACGGCCTCCC
	S 05aR			CATCCCCACATACGAAAAGA
	S 05aprobe			CCCTGGACACTGAAAACAGGCAATCCT
rs782544937 (sys 11)	S 07bF	In	8	GGTATTGGCTTTAAAATACTCAACC
	S 07bR			CAGCTGCAACAGTTATCAACGTT
	S 07aprobe			TCCTCACTTCTCCACCCCTAGTTAAACAG
rs72501127 (sys 12)	S 08aF	Del	3	CTGGATGCCTCACTGATCCA
	S 08aR			TGGGAAGGATGCATATGATCTG
	S 08probe			CTCCCAACCCCATTTCTGCCTG

1	2	3	4	5
rs113678447 (sys 14)	S 09aF	In	4	GGGCACCCGTGTGAGTTTT
	S 09aR			TCAGCTTGTCTGCTTTCTGGAA
	S 09aprobe			TGGAGGATTTCTCCCCTGCTTCAGACAG
rs5830253 (sys 17)	S 10bF	In	8	TTAGAGCCACAAGAGACAACCAG
	S 10aR			TGGCTTCCTTGAGGTGGAAT
	S 10probe			CAGTGTCCCACTCAAGTACTCCTTTGGA
rs768578340, ACE (sys 20)	ACE 1428F	In	10	CCATTTCTCTAGACCTGCTGCC
	ACE 1428R			GCCCTTAGCTCACCTCTGCTT
	ACE 1428pr			TCACTTTTATGTGGTTTTCGCCAATTTTATTCCA
rs768578340, ACE (sys 21)	ACE 1721F	In	10	GCTGGGATTACAGGCGTGATA
	ACE 1428R			GCCCTTAGCTCACCTCTGCTT
	ACE 1428pr			TCACTTTTATGTGGTTTTCGCCAATTTTATTCCA
GSTT1 (sys 25)	GSTT1_F	null	-	TGATGCATGTGAGTGCTGTG
	GSTT1_R			TTAAGCACAGTGCCATAGCC
	GSTT1_probe			GGGGGCCCTGGCTAGTTGCT
DCP1 (sys 28)	DCP1_F	In	287	TGGGATTACAGGCGTGATACAG
	DCP1_R			TTGAATGGCTTGAGCTCCAG
	DCP1_probe			TCCCCTTACAAGCAGAGGTGAGCT

Примечания:

1) — In — инсерция;

2) — Del — делеция.

Таблица 4. — Последовательности проб и праймеров к дополнительной панели для скрининга химеризма

Название олигонуклеотида	Сокращенное название	Тип	Длина, п. о.	Последовательность олигонуклеотида, 5' → 3'
1	2	3	4	5
Y-хромосома (sys 3)	S 02F	-	-	AACTTTTGCCGAAGCTCACAA
	S 02R			TTGGTTTTCGCAGGCAGACT
	S 02probe			CAGGCGCCTGAGCCACCCTCA
rs3832385* (sys 4)	S 03F	Del	4	CTTTTGCTTTCTGTTTCTTAAGGGC
	S 03R			TCAATCTTTGGGCAGGTTGAA
	S 03probe			CATACGTGCACAGGGTCCCCGAGT
rs113678447 (sys 15)	S 09aF	In	4	GGGCACCCGTGTGAGTTTT
	S 09bR			CAGCTTGTCTGCTTTCTGCTG
	S 09aprobe			TGGAGGATTTCTCCCCTGCTTCAGACA G
rs146813605 (sys 18)	S 11bF	Del	9	CCCTGGATCGCCGTGAA
	S 11aR			CCAGCATGCACCTGACTAACA
	S 11aprobe			CAAGGCTTCCTCAATTCTCCACCCTCC
rs146813605 (sys 19)	S 11aF	Del	9	TAGGATTCAACCCTGGAAGC
	S 11aR			CCAGCATGCACCTGACTAACA
	S 11aprobe			CAAGGCTTCCTCAATTCTCCACCCTCC
GSTM1 (sys 24)	GSTM1_F	null	-	CCATGGTTTTGCAGGAAACAAGG
	GSTM1_R			AGAATATGTGGGCTGGAACCTC
	GSTM1_probe			GGGGAATGAGATCTGTTTTGCTTCACG

Продолжение таблицы 4

1	2	3	4	5
rs4399** (sys 27)	rs4399_F	In- Del	22	TGACTAATTGGCAGGAGCAGAC
	rs4399_R			ATTCATCGAGGCTGGACTAGAC
	rs4399_probe			CGGGGTAACGGGGCCTCTGA
rs36208070 FVII (sys 29)	FVII_F	In	10	CCCAACTTACATTCTATATCCT
	FVII_R			GGGACAGGAGAAAGGTCAGG
	FVII_probe			TTGAAGTGTTGGTGCCACACAC
rs3045215 (sys 32)	S12_bF	In	9	TGAGGTCAAATTCCAAAGTGC
	S12_R			TGACTCAGTGCAGACTGGTCTCT
	S12probe			TTTCTGCATGTGTGCATTCA
rs16416 (sys 42)	S40_aF	Del	4	GCTTTCCTACAGCCTCACAGA
	S40_R			CCTCCTCCCACCCACAAAAT
	S40probe			ATGTGATCACCCAAACTATTGTC
rs2307561 (sys 53)	S26_F	Del	6	AACCCCTACTAGCATCAAGA
	S26_aR			AGGTCCTACAAATGTACAACACT
	S26probe			GCACTGCTCCTTATTCAGGC
rs3081400 (sys 61)	S31_F	Del	5	TGAGTGAGCACGCAGACAAT
	S31_bR			TTATAGAAGCCCTTTGTCCCATT
	S31probe			TGCAAGAAAGCAAGATGACA
rs8190570 (sys 63)	S32_aF	Del	9	ACCTCAGTTCATCTTTGTGGTCT
	S32_R			TGGCTACTTTGGCGTCTGAG
	S32probe			ACTAAAGTGGAGCCCCAGAACCT
rs2307581 (sys 64)	S33_aF	In	18	CCAAAATTTTCATCCTATTCTACTCTGA
	S33_R			ACCCTTGAAATTATAGTCTGGACAGT
	S33probe			AGCGATGCTGTTCCGCCAACT
rs2307581 (sys 65)	S33_bF	In	18	CCAAAATTTTCAGAGGGGACA
	S33_R			ACCCTTGAAATTATAGTCTGGACAGT
	S33probe			AGCGATGCTGTTCCGCCAACT
rs2067204 (sys 68)	S36_F	In	12	TACATGTCAACCCCTTGGC
	S36_bR			TCCTGAGGGAAGCATCAACAC
	S36probe			AGCGTGCAGGGTTAGTTTGGTGA

Примечания:

1) — In — инсерция;

2) — Del — делеция.

Таблица 5. — Последовательность пробы и праймеров референсного гена ALB

Название олигонуклеотида	Сокращенное название	Последовательность олигонуклеотида, 5' → 3'
ALB	ALB_F	AGGGTAAAGAGTCGTCGATATGCT
	ALB_R	CAATCTCAACCCACTGTCAGCTA
	ALB_probe	CAAACGCATCCATTCTACCAACTTGAGCAT

Для каждой пары донор/реципиент проводится скрининг основной панели мишеней. Если вовремя тестирования основной панели не было найдено минимум двух мишеней, то необходимо провести скрининг дополнительной панели. Протокол

для скрининга дополнительной панели полностью соответствует пунктам проведения и для основной.

2.2. Количественное определение уровня химеризма методом ПЦР в реальном времени (Real-Time PCR, RQ-PCR)

Перед проведением аллоТГСК проводят скрининг с применением основной и/или дополнительной панели на поиск информативных мишеней в каждой из исследуемых пар донор-реципиент. Для количественного определения уровня химеризма после аллоТГСК также выполняют скрининг реципиентов по найденным ранее информативным аллелям.

Для амплификации InDel-мишеней используют прямой, обратный праймеры и TaqMan-зонды (пробы) подобранные ранее.

Изначально для каждой из мишеней готовят миксы проб и праймеров: по 6 мкл прямого и обратного праймеров, 4 мкл пробы с концентрацией 100 рМ, 84 мкл воды. Конечный объем микса ($V_{\text{конечн.}}$) 100 мкл. Рабочие миксы хранят при температуре $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Перед дальнейшим использованием все миксы тщательно вортексируют и осаждают.

InDel-ПЦР проводят на термоциклере для проведения ПЦР в реальном времени. Объем одной реакции составляет 20 мкл: 10 мкл TaqMan Master Mix 2x, 1 мкл смеси пробы и праймеров и 4 мкл ДНК образца (донора/реципиента) с концентрацией 25–30 нг/мкл. Если ДНК имеет низкую концентрацию или плохое качество (в т. ч. применимо для сортированных клеток, то можно увеличить объем материала на одну реакцию до 5–6 мкл. Миксы готовят путем смешивания всех компонентов на ледяной бане, кроме ДНК (добавляют непосредственно в реакцию), тщательно вортексируют и осаждают. Постановка реакции осуществляется в дублях для контрольного гена ALB и двух информативных аллелей реципиента. В лунки пластиковой 96-луночной низкопрофильной плашки или в низкопрофильные оптические пробирки вносят по 16 мкл готового микса каждой из систем, туда же добавляют 4 мкл ДНК доноров и реципиентов с концентрацией 25 нг/мкл ($V_{\text{конечн.}} = 20\text{ мкл}$)

Оптимальная температура отжига праймеров при температуре $58\text{ }^{\circ}\text{C}$, что соответствует наилучшему соотношению уровней флуоресценции и максимальной эффективности ПЦР. Протокол для проведения ПЦР реакции представлен далее:

50 °C – 2 мин
95 °C – 10 мин
95 °C – 15 с
58 °C – 1 мин



50 циклов

Протокол проведения реакции ПЦР в реальном времени остается неизменным для скрининга до и после аллоТГСК, а также для использования ДНК из различных клеток.

3. Анализ результатов

Результат ПЦР в реальном времени определяется по значению ΔCt .

Ct — это значение номер цикла, в котором сигнал флуоресценции пересекает пороговую линию (threshold). Для CFX96 Real-Time System (BioRad) baseline threshold устанавливают на уровне 200–400.

Для подсчета уровня химеризма используют следующую формулу 3:

$$ДХ, \% = 100\% * (1 - (1 + E)^{-(\Delta CtU - \Delta CtC)}), \quad (3)$$

где ΔCt — Ct аллель-специфического маркера – Ct референсного гена (ABL);

ΔCtU — значение ΔCt в неизвестном образце;

ΔCtC — значение ΔCt в калибраторе (в образце до трансплантации);

E — эффективность амплификации исследуемой последовательности ДНК.

Если не используем калибровочную кривую, то эффективность реакции принимается за 1.

При использовании двух информативных мишеней считается их среднее значение. Интерпретация полученных результатов проводится по следующей схеме: более 99 % — полный донорский химеризм (приживление трансплантата), менее 5 % — отторжение трансплантата, 1–99 % — смешанный донорский химеризм.

Динамику химеризма у реципиента после аллотГСК мониторируют в течение первого года, а также каждые последующие полгода, что позволяет отследить процесс приживления трансплантата.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Метод InDel-ПЦР основан на использовании специфических праймеров и проб, которые амплифицируют аллели реципиента и донора в различных пробирках. При InDel-ПЦР разница в условиях амплификации между дублями влияет на точность определения значения химеризма. Допускаемая погрешность измерения порогового значения $Ct \pm 0,5$ между дублями, что соответствует вариации количества ДНК до 50 % (коэффициент вариации парных измерений = 0–50 %). Если разница между дублями больше, необходимо переставить ПЦР.

Возможные причины различий между дублями:

неодинаковый объем вносимого образца (ошибка пипетирования);

плохо растворена ДНК (рекомендуется подержать образцы ДНК в термоблоке при 37 °С в течение 15 мин).

При получении значения химеризма <95 % рекомендуется подтвердить результат методом STR-ПЦР.

Причины: недостатком ПЦР в реальном времени является то, что она имеет меньшую точность количественного определения, т. е. низкую воспроизводимость с коэффициентом вариации до 30–50 % по сравнению с 5–15 % для STR-ПЦР. Это не

препятствует количественному анализу только при очень низких уровнях смешанного химеризма, ниже 15 % для минорной популяции. При низких значениях химеризма эта погрешность незначительна, а при высоких не допустима. Для сравнения, 100 % химеризм при измерении может давать значения между 75 и 150 %, что не пригодно для измерения химеризма, а при значении 1 % может давать значения между 0,75 и 1,5 %, что вполне допустимо.

В образце до аллоТГСК контрольный ген ALB или информативные системы, а также ALB в образце после аллоТГСК (! Но не информативные системы) проходят ниже 25 цикла (для CFX96 Real-Time System (BioRad) Ct при baseline threshold = 200-400).

Возможные причины и пути их решения:

низкая концентрация или качество образца ДНК. Рекомендуется проверить концентрацию или заново выделить образец. Если не удастся добиться хорошей концентрации образца, то переставить образец с помощью STR-ПЦР;

низкая эффективность реакции, разрушенные праймеры. Необходимо проверить работу праймеров с помощью построения калибровочной кривой (эффективность должна быть $100\% \pm 10\%$, чувствительность не менее 10^{-4}). При необходимости заказать новые праймеры.

Большая разница в значении химеризма между информативными системами (более 0,5–1 lg для остаточных клеток реципиента при уровне химеризма $<99,9\%$).

Возможные причины и пути их решения:

низкая эффективность ПЦР. Необходимо проверить работу праймеров с помощью построения калибровочной кривой (эффективность должна быть $100\% \pm 10\%$, чувствительность не менее 10^{-4}). При необходимости заказать новые праймеры;

делеция локуса/хромосомы в опухолевых клетках (крайне редко). Сравнить наличие цитогенетических аномалий в опухолевых клетках и локализацию информативного маркера. Для доказательства рекомендуется отсортировать лейкоз-ассоциированную субпопуляцию клеток и провести соответствующие исследования (цитогенетические исследования, определение минимальной остаточной болезни и другие).

Лабораторный алгоритм определения химеризма (скрининг, выбор мишеней, количественное определение уровня химеризма)

