

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель

министра здравоохранения

\_\_\_\_\_ В.В. Колбанов

23 октября 2006 г.

Регистрационный № 179-1205

**ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ЛЕЧЕНИЯ ЛИМФОЛЕЙКОЗОВ С  
ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИММУНОФЕНОТИПИЧЕСКОГО И  
МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО МЕТОДОВ**

Инструкция по применению

***Учреждение-разработчик:*** Республиканский научно-практический центр  
детской онкологии и гематологии

***Авторы:*** д-р мед. наук, проф. О.В. Алейникова, канд. мед. наук Н.Н. Савва,  
канд. биол. наук М.В. Белевцев, канд. биол. наук Т.В. Савицкая, канд. биол.  
наук А.М. Кустанович, В.П. Савицкий, А.Н. Мелешко

## **ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ**

Достижение цитоморфологической ремиссии в костном мозге (КМ) при использовании современной терапии лимфолейкоза в половине случаев не сопровождается полной элиминацией опухолевых клеток. Так, например, у пациентов с острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ), находясь в клинико-лабораторной ремиссии после терапии, в КМ могут сохранять до  $10^{10}$  остаточных опухолевых клеток. Поэтому использование адекватных методов выявления минимальной резидуальной болезни (МРБ) необходимо для оценки эффективности антилейкемического лечения на прогностически значимых этапах терапии, прогнозирования возникновения рецидива заболевания и стратификации пациентов по группам риска. Определение МРБ применимо также для оценки степени риска развития рецидива у пациентов, подвергшихся трансплантации костного мозга, а также для определения контаминации образцов стволовых клеток бластами.

Таким образом, у больных с лимфолейкозами наряду с цитоморфологической оценкой ремиссии должны использоваться иммунофенотипический и молекулярно-генетический методы выявления минимальной резидуальной болезни.

### **Оценка эффективности лечения острого лимфобластного лейкоза у детей**

#### Этап I. Оценка статуса ремиссии ОЛЛ:

1. Клиническая оценка ремиссии (день 15, день 36, день начала ПТ, день окончания ПТ).
2. Цитоморфологическая оценка ремиссии (день 15, день 36, день начала ПТ, день окончания ПТ).

#### Этап II. Оценка минимальной резидуальной болезни:

1. Оценка цитогенетической ремиссии (G-banding и FISH) при наличии специфических аберраций на момент установления диагноза (день 36, день начала ПТ, день окончания ПТ).

2. Оценка ремиссии с использованием ОТ-ПЦР или РТ-ПЦР при наличии химерных онкогенов на момент установления диагноза (день 15, день 36, день начала ПТ, день окончания ПТ).

3. Выявление остаточных опухолевых клеток с использованием метода проточной цитофлуориметрии.

4. Выявление остаточных опухолевых клеток с использованием полуколичественного определения МРБ методом серийных разведений или количественный анализ с использованием РТ-ПЦР.

### **Оценка эффективности лечения множественной миеломы у взрослых**

#### Этап I. Оценка статуса ремиссии ММ:

1. Клинико-лабораторная оценка ремиссии ММ по общепринятым параметрам (до проведения высокодозной ХТ, после проведения высокодозной ХТ перед забором ПСК, после аутотрансплантации ПСК).

2. Цитоморфологическая оценка ремиссии (до проведения высокодозной ХТ, после проведения высокодозной ХТ перед забором ПСК, после аутотрансплантации ПСК).

#### Этап II. Оценка минимальной резидуальной болезни:

1. Выявление остаточных опухолевых клеток с использованием метода проточной цитофлуориметрии (до проведения высокодозной ХТ, после проведения высокодозной ХТ перед забором ПСК, после аутотрансплантации ПСК).

### **ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, МАТЕРИАЛОВ И РЕАКТИВОВ**

Иммунофенотипическое определение aberrантной экспрессии антигенов лейкоэмических клеток методом многоцветной проточной цитофлуориметрии:

1. Проточный цитофлуориметр с набором прикладных программ.
2. Центрифуга.

3. Моноклональные антитела (IgG1/IgG2a/CD19, CD45/CD14/CD19, CD20/CD10/CD19, CD58/CD10/CD19, CD10/CD34/CD19, CD10/CD11a/CD19, CD45RA/CD10/CD19).

4. Фосфатно-солевой буфер (PBS).

5. Раствор для лизиса эритроцитов.

6. Раствор параформальдегида 1 %.

Полимеразная цепная реакция:

1. Термоциклер.

2. Центрифуги с охлаждением на 14 000 об/мин.

3. Ячейки для горизонтального и вертикального электрофореза с источником тока.

4. Набор пипеток с переменными объемами от 0,5 мкл до 1 мл.

5. Термомиксер для выделения ДНК.

6. Ламинарный шкаф с вертикальным потоком воздуха.

7. Набор для выделения тотальной РНК.

8. Набор для выделения геномной ДНК.

9. Набор для синтеза кДНК.

10. Набор для проведения ПЦР.

11. Праймеры к определяемым химерным онкогенам.

## **ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА**

Наиболее чувствительными в настоящее время считаются три метода определения МРБ:

1) иммунофенотипическое определение aberrантной экспрессии антигенов лейкемических клеток методом многоцветной проточной цитофлуориметрии;

2) ПЦР для выявления перестроек, приводящих к возникновению химерных онкогенов;

3) полимеразная цепная реакция (ПЦР) для определения клональных перестроек иммуноглобулиновых и Т-клеточных рецепторов.

### ***Определение МРБ иммунофенотипическим методом***

Определение аберрантных иммунофенотипических характеристик лейкозных клеток с использованием проточной цитофлуориметрии является одним из современных методов диагностики МРБ. В настоящее время применяются сочетания маркеров, которые не встречаются в периферической крови и в костном мозге в норме [Campana 1995]. Считается, что с применением указанного подхода возможно идентифицировать опухолевые клетки у 90 % пациентов с ОЛЛ с чувствительностью  $10^{-3}$ – $10^{-4}$ .

В то же время, несмотря на высокую чувствительность, возможны ложноотрицательные результаты, обусловленные изменением экспрессии одного или более иммунофенотипических маркеров лейкозных клеток вследствие их эволюции уже на ранних стадиях терапии. В связи с этим, одной из наиболее важных задач при оценке МРБ методом проточной цитофлуориметрии является выявление новых иммунофенотипических маркеров, способных с высокой чувствительностью и специфичностью выявлять опухолевые клетки не только при первичной диагностике, но и на этапах терапии [Campana 1999].

С использованием метода проточной цитофлуориметрии исследование МРБ проводится как во фракции мононуклеаров с целью повышения чувствительности (Neale et al), так и в образцах цельного костного мозга (без сепарации), что позволяет минимизировать изменение экспрессии антигенов и более достоверно оценить клеточную популяцию.

Методологический подход заключается в анализе степени экспрессии определенных иммунофенотипических маркеров (или их комбинации) на CD19+клетках КМ. С этой целью, из анализа предварительно исключаются лейкоциты, не относящиеся к В-клеткам, путем установки «ворот» во всех пробах по маркеру CD19 (рис. 1).

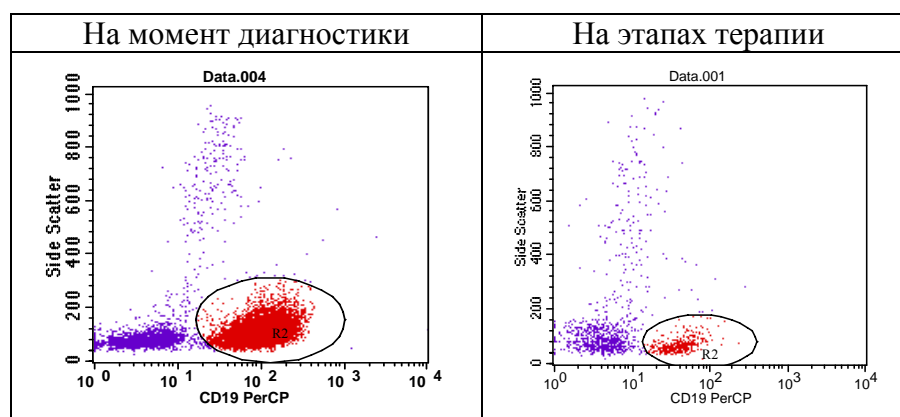


Рис. 1. Пример выделения CD19 клеток на момент диагностики и на этапах терапии среди лейкоцитов

На рисунке 2 показан пример идентификации лейкемических клеток в образцах КМ пациентов с В-линейным ОЛЛ. Представлены распределения клеток по степени экспрессии CD10 относительно CD20, CD58 и CD45RA. Для сравнения показаны аналогичные распределения клеток здорового КМ. Видно, что характер экспрессии указанных маркеров на клетках КМ донора и больного ОЛЛ существенно различается, что позволяет нам дифференцировать лейкезные клетки от нормальных гемопоэтических клеток, несущих те же маркеры. Анализ представленных комбинаций иммунофенотипических маркеров позволяет идентифицировать лейкемические клетки и определить их относительное количество как на момент диагностики, так и на этапах терапии.

Определяется относительное содержание остаточных опухолевых клеток в КМ больных В-линейным ОЛЛ. Для этого образец КМ в объеме от 2 до 5 мл помещают в пробирку Vacutaner (BD), содержащую антикоагулянт (калий ЭДТА).

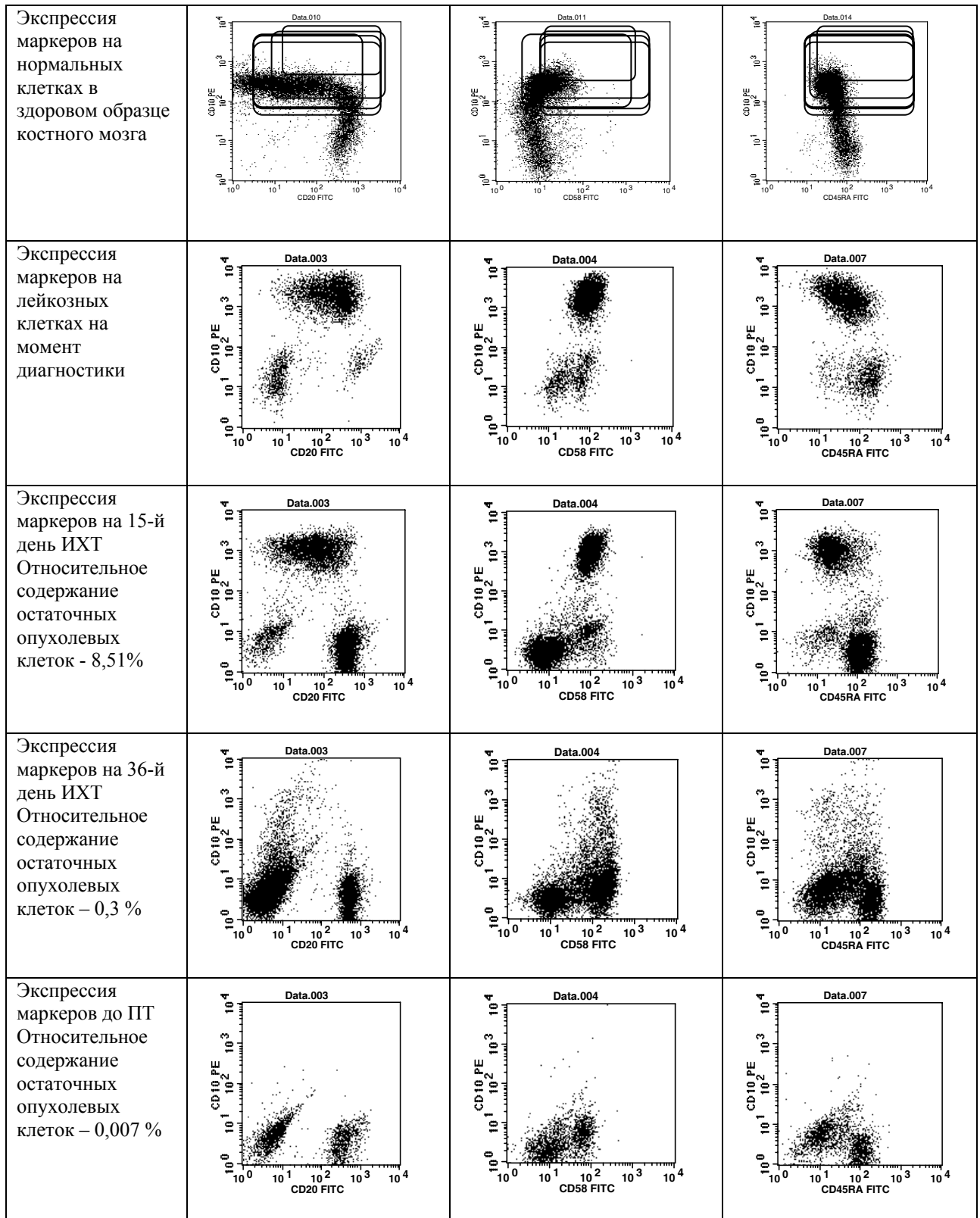


Рис. 2. Анализ экспрессии антигенов CD19+ клеток костного мозга, полученного от донора и пациента (А-но) на момент постановки диагноза и во время терапии, методом проточной цитофлуориметрии

В течение не более 2-3-х часов образец КМ доставляют в лабораторию и обрабатывают. По 100-300 мкл цельного костного мозга (в зависимости от объема и клеточности) помещают в специальные пробирки FALCON (BD) и добавляют по 20 мкл моноклональных антител в следующих комбинациях: IgG1/IgG2a/CD19, CD45/CD14/CD19, CD20/CD10/CD19, CD58/CD10/CD19, CD10/CD34/CD19, CD10/CD11a/CD19, CD45RA/CD10/CD19 (BD). Тщательно перемешивают и инкубируют в темноте при комнатной температуре в течение 30 мин. После инкубации эритроциты лизируют путем добавления 2 мл лизирующего раствора FACS Lysing Solution (BD). Тщательно перемешивают и инкубируют в течение 5-7 мин в темноте.

Осаждают клетки центрифугированием (3 минуты при 2200 об/мин), надосадок сливают, а осадок встряхивают на Vortex. Добавляют буфер PBS Cell Wash (BD) и данную процедуру отмывки повторяют 2 раза. После этого к суспензии клеток добавляют 100-200 мкл 1 % р-ра параформальдегида.

Учет и анализ результатов проводят на проточном цитофлуориметре FACSCan в программах CellQuest Pro и Paint-a-gate.

Результат расценивают положительным при наличии 10 и более опухолевых клеток в виде кластера при учете 300 000 ядросодержащих клеток костного мозга.

#### ***Определение МРБ молекулярно-генетическими методами***

#### **Выделение лейкоцитов из образцов костного мозга (КМ) и/или периферической крови (ПК)**

Образец костного мозга или периферической крови с 0,5 М ЭДТА (рН 8,0) или цитратом натрия в качестве антикоагулянта смешивается с пятикратным объемом буфера для лизиса эритроцитов (0,155 мМ хлорид аммония; 10 мМ гидрокарбонат калия, 0,1 мМ ЭДТА с рН 7,4). После инкубации в течение 10 мин, лейкоциты осаждают центрифугированием в центрифуге BR4i (400 g, 10 мин при +4 °С). Если осадок содержит эритроциты, процедуру лизиса повторяют. После лизиса эритроцитов



лейкоциты отмывают в 14 мл фосфатно-солевого буфера и осаждают снова при тех же условиях центрифугирования.

### **Выделение нуклеиновых кислот**

#### *а) Выделение суммарной РНК*

Выделение суммарной РНК проводят по методике [Chomczynski P. & Sacchi N., 1987]. Осадок, содержащий  $5-10 \times 10^6$  клеток (количество клеток определяют в камере Горяева с использованием 10 % уксусной кислоты), лизируют в 500 мкл Solution D (4М тиоционата гуанидина, 5 мМ ЭДТА pH 8,0, 25 мМ цитрата натрия pH 7,0, 0,5 % N-лаурил саркозина с добавлением 7,1 мкл  $\beta$ -меркаптоэтанола). Лизат оставляют на 5 минут при комнатной температуре для полной диссоциации нуклеопротеиновых комплексов, после чего его либо замораживают при  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , либо используют непосредственно для экстракции РНК. Для этого к лизату добавляют 50 мкл 2М ацетата натрия (pH 4,0), 600 мкл кислого фенол-хлороформ-изоамилового спирта (25:24:1) и интенсивно перемешивают на вортексе. После 15 минутной инкубации на льду пробирку центрифугируют при 14000 g в течение 20 мин при  $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . После центрифугирования раствор разделяют на две фазы (нижнюю органическую и верхнюю водную) и интерфазу. Органическую фазу, содержащую белок, и интерфазу, содержащую ДНК, используют для выделения ДНК, а водную фазу, содержащую РНК, переносят в чистую пробирку. К этой фракции добавляют 500 мкл изопропанола и оставляют на 1-12 ч при  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  для преципитации РНК, после чего центрифугируют при 14000 g в течение 20 минут при  $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Осадок отмывают с 1 мл 70 % этанола для удаления остатков солей из преципитата РНК. Надосадочную жидкость удаляют с помощью вакуумного аспиратора, не допуская захвата осадка, и высушивают в течение 10 мин. После этого РНК растворяют в 50 мкл деонизованной стерильной воды, обработанной ДЭПК.

Качество и количество РНК оценивают спектрофотометрически и электрофоретически. Спектрофотометрическое определение проводят на спектрометре Lambda Bio 10 в соответствии с инструкциями производителя.

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 флюоресценция в начале (примесь ДНК) и конце (деградированная РНК) дорожки отсутствует, а интенсивность полосы 18S рибосомальной РНК (рРНК) – примерно в два раза выше, чем полосы 16S рРНК.

*б) Выделение геномной ДНК*

3 x 10<sup>6</sup> клеток лизируют в 600 мкл лизирующего буфера (10 mM Трис-НСl pH 8,5, 5 mM ЭДТА, 0,2 % SDS, 0,2 M хлорид натрия, 0,1 мг/мл протеиназы К) [Laird P.W., 1991]. После инкубации при 37 °С в течение 2 ч на термомиксере к лизату клеток добавляют 300 мкл 3M ацетата натрия, который вызывает преципитацию белков. После центрифугирования (3 минуты, максимальное число оборотов при комнатной температуре) супернатант переносят в чистую пробирку и смешивают с 500 мкл изопропанола. После осаждения преципитированной ДНК осадок отмывают с 1 мл 70 % этанола, высушивают и растворяют в ТЕ буфере (10 mM Трис-НСl, 0,1 mM ЭДТА, pH 7,5).

Равный объем фенола (pH 8,0) перемешивают на вортексе. После 15-минутной инкубации на льду пробирку центрифугируют при 14000 g в течение 20 мин при +4 °С. После центрифугирования верхнюю фазу переносят в чистую пробирку. Добавляют равный объем смеси фенол/хлороформ (1:1) и центрифугируют. Затем к образовавшейся верхней фазе добавляют равный объем хлороформа, смешанного с изоамиловым спиртом (24:1) и центрифугируют в том же режиме. К верхней фазе в чистой пробирке добавляют 500 мкл изопропанола. После осаждения

преципитированной ДНК осадок отмывают с 1 мл 70 % этанола, высушивают и растворяют в TE буфере [Sambrook J., Fritch E.F. and Manniatis T., 1989].

Качество и количество ДНК оценивают спектрофотометрически на спектрометре Lambda Bio 10 по соотношению 260/280 нм. Количественное определение концентрации ДНК проводят аппаратом автоматически путем умножения на коэффициент 50 значения поглощения света при 260 нм.

### **Синтез комплементарной ДНК (кДНК)**

После денатурации в присутствии рэндом гексамеров в течение 5 минут при 70 °С, РНК вносят в смесь для обратной транскрипции (25 мМ Трис-НСl рН 8,3, 1,5 мМ хлорида магния, 37,5 мМ хлорида калия, 5 мМ ДТТ, 0,625 мМ дНТФ, 10 единиц/мкл обратной транскриптазы MMLV) и инкубируют при 37 °С в течение одного часа.

### **Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР)**

*Определение экспрессии гена BCR-ABL (последовательности праймеров указаны в табл. 1) [Cross N.C., 1997]*

а) Мультиплексная ОТ-ПЦР для выявления химерного онкогена BCR-ABL. 4 мкл кДНК добавляют к 21 мкл раствора для мультиплексной ПЦР, содержащего 12 мМ Трис-НСl рН 8,3, 1,8 мМ MgCl<sub>2</sub>, 60 мМ KCl, 0,25 мМ дНТФ, 0,6 мкМ каждого из праймеров BCR-C, B2B, C5e-, CA3+, 30 единиц/мл Taq-полимеразы. 35 циклов амплификации (денатурация при 96 °С – 30 с, отжиг при 56 °С – 50 с, удлинение при 72 °С – 1 мин) проводят после 5-минутной инкубации при 96 °С. После завершения ПЦР смесь оставляют в течение 10 мин при 72 °С. Полоса размером 481 п.о. соответствует транскрипту e1a2, 385 п.о. – b3a2, 310 п.о. – b2a2 гена BCR-ABL и 808 п.о. – гену BCR.

б) Гнездная ОТ-ПЦР для обнаружения химерного онкогена BCR-ABL<sup>p210</sup> (транскрипты b3a2/b2a2). 5 мкл кДНК добавляют к 21 мкл раствора для первого шага гнездной ПЦР, содержащему 10 мМ Трис-НСl рН 8,3, 2,4 мМ MgCl<sub>2</sub>, 50 мМ KCl, 0,25 мМ дНТФ, по 0,5 мкМ праймеров NB1+, ABL3-,

0,75 единиц Taq-полимеразы. После амплификации в течение 30 циклов (96<sup>0</sup> С – 30 с, 64<sup>0</sup> С – 30 с, 72<sup>0</sup> С – 1 мин) и 10 минутной инкубации при 72<sup>0</sup> С, 1 мкл продукта амплификации 1 шага добавляют к 20 мкл раствора для 2 шага гнездовой ПЦР (10 мМ Трис-НСl рН 8,3, 1,7 мМ MgCl<sub>2</sub>, 50 мМ KCl, 0,25 мМ дНТФ, 0,5 мкМ каждого праймера СА3-, В2А, 0,75 ед. Таq-полимеразы). Амплификацию проводят в течение 30 циклов (96<sup>0</sup> С – 30 с, 60<sup>0</sup> С – 50 с, 72<sup>0</sup> С – 1 мин) и завершают 10 минутной инкубацией при 72<sup>0</sup> С. Полоса размером 310 п.о. соответствует транскрипту b3a2, 385 п.о. – b2a2.

в) Гнездовая-ПЦР для выявления химерного онкогена BCR-ABL<sup>p190</sup> (транскрипты e1a2). 5 мкл кДНК добавляют к 21 мкл раствора для первого шага гнездовой ПЦР (10 мМ Трис-НСl рН 8,3, 1,73 мМ MgCl<sub>2</sub>, 50 мМ KCl, 0,25 мМ дНТФ, по 0,5 мкМ праймеров BCR-B и ABL3-, 0,75 единиц Таq-полимеразы). 1 мкл продукта амплификации первого шага добавляли к 20 мкл раствора для 2 шага гнездовой ПЦР (10 мМ Трис-НСl (рН 8.3), 1,95 мМ MgCl<sub>2</sub>, 50 мМ KCl, 0,25 мМ дНТФ, по 0,5 мкМ праймеров СА3-, BCR1+, 0,75 единиц Таq-полимеразы). Режим амплификации такой же, как и для BCR-ABL<sup>p210</sup>. Полоса размером 481 п.о. соответствует транскрипту e1a2.

*Выявление экспрессии химерного онкогена TEL-AML1 [Harbott J. Et al., 1997]*

Два мкл кДНК вносят в 16 мкл раствора первого шага гнездовой ПЦР (10 мМ Трис-НСl рН 8,3, 1,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 50 мМ KCl, 0,2 мМ дНТФ, 1,6 пМ/пробу каждого из праймеров (937 и 1142), 0,75 единиц Таq-полимеразы). После амплификации в течение 25 циклов (94<sup>0</sup> С – 15 с, 62<sup>0</sup> С – 15 с, 72<sup>0</sup> С – 45 с) и 2-минутной инкубации при 72<sup>0</sup> С, 1 мкл продукта амплификации первого шага добавляют к 19 мкл раствора второго шага гнездовой ПЦР (10 мМ Трис-НСl (рН 8.3), 1,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 50 мМ KCl, 0,2 мМ дНТФ, 8 пМ/пробу каждого из праймеров 969 и Z3R, 0,75 единиц Таq-полимеразы). Амплификацию проводят в течение 35 циклов (96<sup>0</sup> С – 15 с, 60<sup>0</sup> С – 15 с, 72<sup>0</sup> С – 45 с), завершающуюся 10-минутной инкубацией при 72<sup>0</sup> С. Гену TEL-AML1 соответствовала полоса размером 174 или 135 п.о.

*Определение экспрессии химерного онкогена MLL-AF4 [Borkhardt A. Et al., 1994]*

4 мкл кДНК добавляют к 16 мкл раствора для первого шага гнездовой ПЦР (10 мМ Трис-НСl (рН 8.3), 1,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 50 мМ KCl, 0,2 мМ дНТФ, 0,5 мкМ праймеров MLL1 и AF41, 0,75 единиц Taq-полимеразы).

**Таблица 1**

**Последовательности праймеров**

Название	Последовательность праймеров 5' → 3'
BCR-C	ACCGCATGTTCCGGGACAAAAG
B2B	ACAGaATTCCGCTGACCATCAATAAG
C5e-	ataggaTCCTTTGCAACCGGGTCTGAA
CA3+	TGTTGACTGGCGTGATGTAGTTGCTTGG
NB1+	GAGCGTGCAGAGTGGAGGGAGAACA
ABL3-	GGTACCAGGAGTGTCTCCAGACTG
CA3-	TGTTGACTGGCGTGATGTAGTTGCTTGG
B2A	TTCAGAAGCTTCTCCCTGACAT
BCR-B	CCCCCGGAGTTTTGAGGATTG C
BCR1+	GAATCGCAACAGTCCCTTCGAC
937	AACCTCTCTCATCGGGAAGA
1142	CAGAGTGCCATCTGGAACAT
969	GAACCACATCATGGTCTCTG
Z3R	AACGCCTCGCTCATCTTGCCTG
MLL1	CTGAATCCAAACAAGCCACCACTC
AF41	GTCACTGAGCTGAAGGTCGTCT
MLL2	GGTCTCCCAGCCAGCACTGGTC
AF42	ACCTACTCCAATGAAGTCCATTGTG
19F	TCGCCAGCTACGACGGGGGTCTC
1B	GAGTTGTCTGAACCTGCCCTCCA
19FN	GGCCTGCAGAGTAAGATAGAAGACC
1BN	CCACGCCTCCGCTAACAGCAT
Sildb-5'	AAGGGGAGCTAGTGGGAGAAA
Tal1db1-3'	AGAGCCTGTCCGCAAGAA
Tal1db2-3'	TTGTAATAATGGGGAGATAATGTTCGAC

После амплификации в течение 25 циклов (94 °C – 15 с, 60 °C – 15 с, 72 °C – 45 с) и 2-минутной инкубации при 72 °C, 1 мкл продукта амплификации

первого шага добавляют к 19 мкл раствора для 2 шага гнездовой ПЦР (10 mM Трис-НСl (рН 8.3), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 0,2 mM дНТФ, 0,5 мкМ праймеров MLL2 и AF42, 0,75 единиц Таq-полимеразы). Амплификацию проводят в течение 35 циклов (96 °С – 15 с, 64 °С – 15 с, 72 °С – 45 с), завершающихся 10-минутной инкубацией при 72 °С. Гену *MLL-AF4* соответствует полоса размером 590 п.о.

*Выявление экспрессии химерного онкогена E2A-PBX1 [Devaraj P.E. et al., 1995]*

4 мкл кДНК добавляют к 16 мкл раствора для 1 шага гнездовой ПЦР (10 mM Трис-НСl (рН 8.3), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 0,2 mM дНТФ, 0,5 мкМ праймеров 19F и 1B, 0,75 единиц Таq-полимеразы). 1 мкл продукта амплификации первого шага добавляют к 19 мкл раствора для 2 шага гнездовой ПЦР (10 mM Трис-НСl (рН 8.3), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 0,2 mM дНТФ, 0,5 мкМ праймеров 19FN и 1BN, 0,75 единиц Таq-полимеразы). Амплификацию проводят в течение 30 циклов (96 °С – 40 с, 68 °С – 40 с, 72 °С – 1 мин) как для первого, так и для второго шага. Гену *E2A-PBX1* после первого шага соответствует полоса размером 481 п.о., после второго – 378 п.о.

*Выявление химерного онкогена SIL-TAL1 [Pongers-Willemse M.J. et al., 1999]*

1-2 мкл ДНК добавляют к 16 мкл раствора, содержащего 10 mM Трис-НСl (рН 8.3), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 0,2 mM дНТФ, по 0,5 мкМ праймеров Sildb-5' и Tal1db1-3' или Sildb-5' и Tal1db2-3', 0,75 единиц Таq-полимеразы). Амплификацию проводят в течение 40 циклов (92 °С – 40 с, 60 °С – 1 мин, 72 °С – 1 мин). Гену *SIL-TAL1* соответствует полоса размером 300 п.о. При использовании первой пары праймеров и 359 п.о. - второй. Согласно с данными авторов метода, использование указанных праймеров позволяет выявить 95% случаев с *SIL-TAL1*.

Для подтверждения результата ПЦР, оценка экспрессии генов *TEL-AML1*, *MLL-AF4*, *E2A-PBX1* и *SIL-TAL1* проводится также с использованием

протоколов ОТ-ПЦР европейской группы BIOMED-1 [van Dongen J.J. et al., 1999]. Протоколы рабочей группы BIOMED-1 отработаны для достижения чувствительности  $10^{-4}$ , необходимой и достаточной для проведения определения МОБ с использованием ПЦР.

### **Метод определения МРБ с использованием генов антигенных рецепторов лимфоцитов в качестве молекулярных мишеней**

Использование генов Ig и TCR для диагностики и мониторинга лимфоидных опухолей началось с конца 1980-х годов. Данный подход основан на том факте, что опухолевые клетки при лимфолейкозах и лимфомах, аналогично нормальным лимфоидным клеткам, сохраняют специфический профиль («паттерн») реаранжировки генов антигенраспознающих рецепторов В и Т клеток. Таким образом, индивидуальность реаранжировки генов Ig и TCR отражает моноклональность пролиферирующих лимфоидных опухолевых клеток.

Соединительные регионы перестроенных генов Ig и TCR являются подходящими мишенями для определения МРБ более чем в 90% лимфобластного ОЛЛ. В то же время, присутствие нормальных лимфоцитов, несущих разнообразные перестройки в крови и костном мозге является серьезным ограничением определения остаточных лейкозных клеток. Гетеродуплексный ПЦР-анализ может быть использован в период разгара заболевания (и начала терапии), когда количество бластных клеток в образце очень велико (>70 %). Чувствительность этого метода достигает  $10^{-2}$ , что недостаточно для определения МРБ. Следовательно, для увеличения чувствительности и специфичности должны быть использованы специальные методы.

### **Выявление мишеней МРБ**

Осуществляется методом ПЦР соединительного региона реаранжированных генов IgH, TCRD и TCRG. При оценке реаранжировки генов Т-клеточного рецептора используется протокол и праймеры, предложенные в соответствии с рекомендациями Европейского

многоцентрового исследования BIOMED-1 CONCERTED ACTION (Pongers-Willemse M.J., Leukemia,1999). В пробирки вносят реактивную смесь, содержащую 1 единицу Tag-полимеразы, 12,5мкМ каждого праймера, 200 нМ НТФ и 0,1 мкг ДНК. Реакцию амплификации проводят в объеме 50 мкл в термоциклере Т3 (Biometra, Германия). Режим проведения ПЦР: 3 минуты при 92° С, далее 35 циклов (92 °С –45 с, 60 °С – 90 с, 72 °С – 2 мин), затем 72 °С – 10 мин. Соответствующий негативный (поликлональный – ДНК здорового человека) и позитивный (моноклональный – ДНК клеточной линии или пациента) контроли используются при каждой постановке реакции.

Из многочисленных вариантов перестроек генов антигенных рецепторов мы остановились на выявлении следующих реаранжировок: неполные перестройки TCRD гена (V $\delta$ 2-D $\delta$ 3 и D $\delta$ 2-D $\delta$ 3) для В-линейного ОЛЛ, полная перестройка (V $\delta$ 1-J $\delta$ 1) для Т-линейного ОЛЛ, и 4 реаранжировки TCRG гена (V $\gamma$ I:J $\gamma$ 1.1/2.1; V $\gamma$ I:J $\gamma$ 1.3; V $\gamma$ II:J $\gamma$ 1.3; V $\gamma$ IV:J $\gamma$ 1.3), характерные как для В- так и Т-линейного ОЛЛ. 6 полных (V(D)J) реаранжировок (VH1, VH2, VH3, VH4, VH5, VH6) IgH гена определяются только для В-линейного ОЛЛ. Таким образом, весь комплекс ПЦР анализа каждого первичного случая включает 13 пар праймеров (Таблица 2). Отработанная панель праймеров позволяет захватить > 85% всех возможных реаранжировок.

## Таблица 2

### Перечень праймеров, использованных для ПЦР-анализа мишеней МРБ



Ген	Название	Прямой/ обратный	Последовательность
TCRD	V $\delta$ 1-5'	Пр.	ACTCAAGCCCAGTCATCAGTATCC
	J $\delta$ 1-3'	Обр.	ACCTCTTCCCAGGAGTCCTCC
	V $\delta$ 2	Пр.	GGACATCGAGTCATGTCAGCC
	D $\delta$ 2	Пр.	AGAAGAGGGTTTTTATACTGATGTG
	D $\delta$ 3	Обр.	AGGGAATGGCACTTTTGCC
TCRG	V $\gamma$ I-5'	Пр.	CAGGCCGACTGGGTCATCTGC
	V $\gamma$ II-5'	Пр.	CAGCCCGCCTGGAATGTGTGG
	V $\gamma$ IV-5'	Пр.	CTGAAATATCTATTTCCAGACCAGC
	J $\gamma$ 1.1/2.1-3'	Обр.	TTACCAGGTGAAGTTACTATGAGC
	J $\gamma$ 1.3/2.3-5'	Обр.	AATGTTGTATTCTTCCGATACTTACC
IGH	VH1/VH7	Пр.	CCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGG
	VH2	Пр.	TCCTGCGCTGGTGAAAGCCACACA
	VH3	Пр.	GGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCA
	VH4a	Пр.	TCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGC
	VH5	Пр.	GAAAAAGCCCGGGGAGTCTCTGAA
	VH6	Пр.	CCTGTGCCATCTCCGGGGACAGTG
	JH	Обр.	ACCTGAGGAGACGGTGACCAGGGT

Предварительный анализ продуктов ПЦР проводят в 1-1,5% агарозном геле. Для идентификации моно- и поликлональных продуктов реакции ПЦР, неразличимых при электрофорезе в агарозном геле, используется гетеродуплексный анализ. ПЦР продукт прогревается в течение 5 минут при +95 °C с последующим быстрым охлаждением до +4 °C и инкубацией при этой температуре в течение 1 часа. Результаты анализируются путем электрофореза в 6-10 % полиакриламидном геле в аппарате для вертикального электрофореза. Моноклональные ПЦР продукты, происходящие из опухолевых клеток, выявляются в геле в виде четких полос. Поликлональные продукты ПЦР, происходящие из нормальных клеток, на электрофореграмме образуют медленно движущийся мазок ДНК. Моноклональные фрагменты ДНК вырезаются из геля скальпелем и инкубируются в ТЕ-буфере 10-12 часов при комнатной температуре, и затем реамплифицируются с той же парой праймеров.

ПЦР продукт (минимум 50 мкл) очищается колоночным методом от примеси низкомолекулярных соединений и олигонуклеотидов. Полученную

ДНК используется для реакции секвенирования с использованием набора с мечеными терминаторами. Реакция секвенирования проводится в обоих направлениях, т.е. с использованием каждого из пары праймеров.

### **Метод использования аллель-специфических олигонуклеотидов (АСО)**

Этот метод наиболее длительный и трудоемкий, но наиболее информативный, надежный и чувствительный. Для реализации этого метода различные реаранжировки генов Ig и TCR должны быть идентифицированы в каждом отдельном случае лейкоза. Соединительные регионы клональных реаранжировок секвенируют. Полученную последовательность нуклеотидов анализируют с помощью программных средств Интернета электронных баз данных: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> и <http://www.imgt.cines.fr/>, а также программ для энцилинга (Sequence Manager, MEGA-3, BioEdit). Информация о нуклеотидной последовательности используется для дизайна аллель-специфических олигонуклеотидов (АСО). Нуклеотидная последовательность ориентируется в 5' – 3' направлении, кодирующая цепь – соответствует прямому праймеру. АСО олигонуклеотид подбирается к месту соединения V(D)J генных сегментов, максимально перекрывая область N нуклеотидов, 23-36 п.н. в обратной ориентации и комплементарным кодирующей цепи (для использования в паре с прямым праймером). Полученный праймер пациент-специфичен, аллель-специфичен и клон-специфичен может использоваться как специфический праймер или зонд для тестирования образцов периферической крови или костного мозга на этапах лечения для отслеживания МРБ. Схема использования АСО продемонстрировано на рисунке 3.

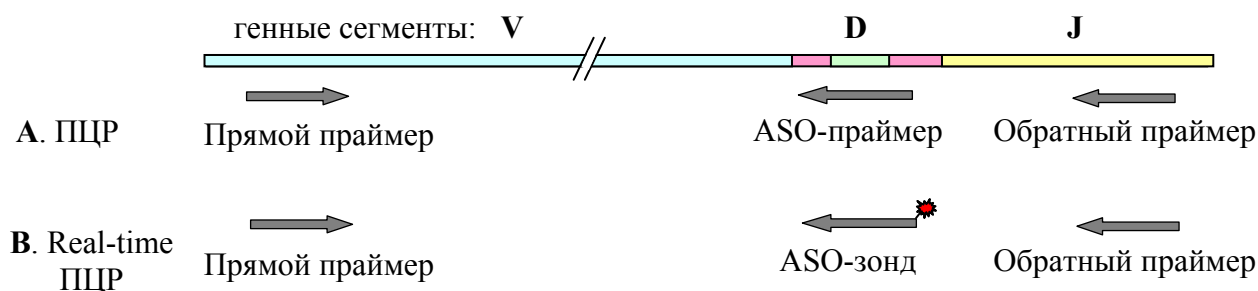


Рис. 3. Схема использования ASO олигонуклеотдов для выявления МРБ. **А.** ASO-праймер подход. ASO используются в паре с прямым праймером. **В.** ASO-зонд подход. Здесь, ПЦР выполняется с участием прямого и обратного праймеров, а ASO используется в качестве TaqMan-пробы

### Количественное определение МРБ.

Метод лимитирующих разведений состоит в серийном разведении первичного положительного образца ДНК в растворе поликлональной или нелимфоидной ДНК до тех пор, пока не исчезнет позитивный продукт. Обычно используется смесь ДНК из мононуклеарнов периферической крови как минимум от 5 здоровых доноров. Желательно, что бы первичный образец содержал не менее 90 % бластных клеток, иначе бластоз необходимо учитывать при разведении. Разведение производят от  $10^0$  до  $10^{-6}$  с шагом в один порядок. Конечное разведение, при котором выявляется ПЦР-продукт, определяет предел определения первичной мишени. По сравнению с полученной шкалой можно определить содержание опухолевых клеток в образце на этапе лечения (рис. 4).

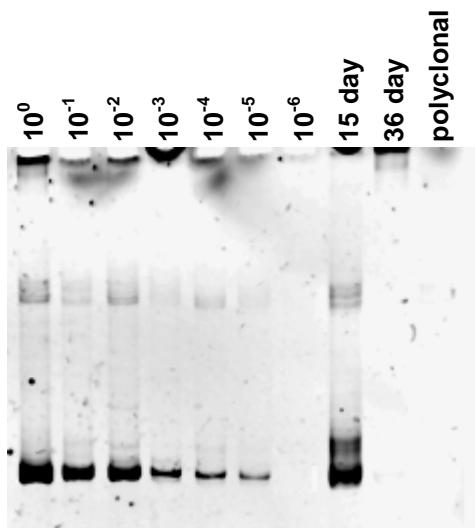


Рис. 4. Определение МРБ методом серийных разведений с использованием ASO-праймера