

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

«УТВЕРЖДАЮ»

Первый заместитель Министра

Д. Л. Пиневиц

2015 г.

Регистрационный № 148-1415

**МЕТОД ДИАГНОСТИКИ МИНИМАЛЬНОЙ ОСТАТОЧНОЙ
БОЛЕЗНИ У ПАЦИЕНТОВ С ОСТРЫМИ ЛЕЙКОЗАМИ ПРИ
АЛЛОГЕННОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ
СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК**
инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ - РАЗРАБОТЧИК:

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

Авторы: Прудников Д.В., к.б.н Кустанович А.М., Пахомова И.В., Марейко Ю.Е., Лавриненко В.А., к.б.н Мелешко А.Н., к.б.н Савицкая Т.В., к.б.н Белевцев М.В., Минаковская Н.В., д.м.н, профессор, член-корр. Алейникова О.В..

Минск, 2015

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкция) изложены методы определения и оценки количества остаточных опухолевых клеток у пациентов с ОЛЛ и ОМЛ, которые могут быть использованы в комплексе медицинских услуг, направленных на диагностику минимальной остаточной болезни при аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК).

Настоящая инструкция предназначена для врачей-трансплантологов, врачей-иммунологов, врачей-гематологов, врачей-онкологов, врачей-педиатров, врачей лабораторной диагностики, а также для других врачей-специалистов, оказывающих специализированную медицинскую помощь пациентам при проведении аллогенной ТГСК.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Аллогенная ТГСК.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ:

Нет.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМЫХ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ, МАТЕРИАЛОВ, РЕАКТИВОВ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ПЦР.

- 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;
- морозильник –20⁰С;
- спектрофотометр;
- термомиксер;
- холодильник;
- центрифуга с охлаждением на 14000 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 полимеразы;
- агароза;
- бромистый этидиум;
- вода деионизованная;
- изопропанол;
- ингибитор РНКаз;
- 2х 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 – антибиотик-антимикотик);
 - наконечники для дозаторов с аэрозольными барьерами (объем – от 0,1 до 1000 мкл);
 - пробирки (объем - 0,2-50 мл), пробирки с антикоагулянтом (ЭДТА, цитратом натрия для молекулярно-биологических исследований).

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

дНТФ – дезоксирибонуклеотидтрифосфат

ДТТ – дитиотреитол

ИГ – исследуемый ген

ИФТ - иммунофенотипирование

кДНК – комплиментарная ДНК

КГ - контрольный ген

КМ – костный мозг

КТ – комнатная температура

МНК – моноклеарные клетки

МОБ – минимальная остаточная болезнь

ОЛЛ – острый лимфобластный лейкоз

ОМЛ – острый миелоидный лейкоз
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
IgG – иммуноглобулин класса G
CD – кластер дифференцировки
TCR – Т-клеточный рецептор
RGE – относительная экспрессия гена

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

1. Исследование количества остаточных опухолевых клеток (минимальной остаточной болезни) проводится общепринятыми методами (проточной цитофлуориметрии, молекулярно-генетическими методами).

2. Алгоритм использования различных методов определения МОБ с целью осуществления возможности субмикроскопической оценки ответа на лечение у максимального количества пациентов представлен в приложении.

3. Взятие материала (костный мозг, периферическая кровь) проводится всем реципиентам аллогенной ТГСК с острым лимфобластным, острым миелобластным лейкозом до трансплантации (не позднее, чем за 14-21 день до начала кондиционирования).

4. В течение первого года после трансплантации оценка количества остаточных опухолевых клеток у реципиентов аллогенной трансплантации проводится в плановом порядке на день +30, +60, +100, +180, +270, +365.

5. Реципиентам аллогенной ТГСК через год после трансплантации оценка количества остаточных опухолевых клеток проводится по показаниям - в зависимости от клинического и лабораторного статуса реципиента (снижение химеризма, лейкопения, тромбоцитопения, анемия,).

6. Исследование включает определение процентного или абсолютного содержания остаточных опухолевых клеток по имеющимся молекулярно-генетическим или иммунологическим маркерам.

7. В качестве молекулярно-генетических маркеров для мониторинга МОБ используются специфичные aberrантные генные перестройки (PML/RAR α , RUNX1-RUNX1T1 (AML1-ETO), CBFB-MYH, BCR-ABL1), либо различные варианты мутации MLL (MLL-AF4, MLL-ENL, MLL-ELL, MLL-AF6, MLL-AF9, MLL-AF10), либо дупликации внутри гена (MLL-PTD, FLT3-ITD), либо гиперэкспрессия WT1.

8. Для реципиентов с ОЛЛ целевое значение МОБ перед аллогенной ТГСК любым методом (проточной цитофлуориметрии, молекулярно-генетическими методами) принимается менее или равное 10^{-4} (0,01%).

9. Для реципиентов с ОМЛ целевое значение МОБ перед аллогенной ТГСК методом проточной цитофлуориметрии принимается менее или равное 10^{-3} (0,1%), молекулярно-генетическими методами менее или равное 10^{-4} (0,01%).

10. Полученные значения МОБ перед аллогенной ТГСК являются оценочными, не позволяют достоверно оценить степень риска рецидива

после аллогенной трансплантации. Однако позволяют предположить вероятность развития рецидива в посттрансплантационном периоде и своевременно скорректировать терапию.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ МЕТОДОВ ДЕТЕКЦИИ МОБ

А. Иммунофенотипическое определение aberrантной экспрессии антигенов лейкоэмических клеток методом трехцветной ПЦФ

При ОЛЛ методологический подход заключается в анализе степени экспрессии определенных ИФТ-маркеров (или их комбинации) на CD19+ клетках КМ. С этой целью, предварительно, из анализа исключаются лейкоциты, не относящиеся к В-клеткам, путем установки границ («ворот») во всех пробах по маркеру CD19. Определяют относительное содержание остаточных опухолевых клеток в КМ. Используют следующие комбинации моноклональных антител: IgG1/IgG2a/CD19/CD45, CD20/CD10/CD19/CD45, CD58/CD10/CD19/CD45, CD10/CD34/CD19/CD45, CD10/CD11a/CD19/CD45, CD45RA/CD10/CD19/CD45. Результат расценивается положительным при наличии 10 и более опухолевых клеток в виде скопления при учете 300 000 ядросодержащих клеток костного мозга.

При ОМЛ методологический подход заключается в анализе степени экспрессии определенных ИФТ-маркеров (или их комбинации) 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 МКА в следующих комбинациях: IgG1/IgG2a/CD45, CD7/CD13/CD45, CD34/CD33/CD45, CD34/CD117/CD45 дополнительными маркерами используются CD20, CD7, CD4, CD2 и т.д..

Б. Определение минимальной остаточной болезни с использованием ПЦР.

Определение минимальной остаточной болезни с использованием ПЦР основано на количественном определении специфических молекулярно-генетических маркеров (PML/RARa, RUNX1-RUNX1T1 (AML1-ETO), CBFB-MYH11), либо различные варианты мутации MLL (MLL-AF4, MLL-ENL, MLL-ELL, MLL-AF6, MLL-AF9, MLL-AF10), либо дупликации внутри гена (MLL-PTD, FLT3-ITD), либо гиперэкспрессия WT1. Определение данных маркеров проводится на ДНК или кДНК в зависимости от мишени и включает несколько этапов: пробоподготовка (выделение мононуклеаров из периферической крови или костного мозга, выделение ДНК или РНК с последующим синтезом кДНК), проведение ПЦР в реальном времени и интерпритации полученных результатов.

1. Пробоподготовка

1.1 Выделение мононуклеарных клеток

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

1.2 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 минут 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.

1.3 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 и инкубируют 5 минут при 65⁰С. Охлаждают на льду не менее минуты, осаждают конденсат со стенок и добавляют остальные реагенты до конечного объема 20 мкл: 4 мкл 5х буфера, 1 мкл 0,1 М ДТТ, 1 мкл ингибитора РНКаз (40 единиц/мкл), 1 мкл обратной транскриптазы, которая работает при 50-55⁰С (200 единиц/мкл). Инкубируют последовательно при комнатной температуре 5 минут, при 50⁰С в течение 30-60 минут, 70⁰С в течение 15 минут. Помещают образец на 4⁰С. В полученную кДНК добавляют

30 мкл воды, кДНК используют непосредственно в ПЦР или замораживают при -20°C .

1.4 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.

2. Определение минимальной остаточной болезни с помощью ПЦР в реальном времени по молекулярно-генетическим маркерам

2.1 Определение минимальной остаточной болезни по перестройкам гена MLL

После определения типа химерного гена необходимо подобрать праймеры для определения минимальной остаточной болезни 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, ведь при увеличении длины амплифицируемого участка эффективность амплификации снижается. Это накладывает определенные ограничения на дизайн праймеров, не позволяет использовать 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 минимальной остаточной

болезни используются разные подходы в зависимости от типа химерного гена.

2.1.1 Определение минимальной остаточной болезни у пациентов с экспрессией MLL-AF4

Экспрессию гена MLL-AF4 в ходе терапии определяют с использованием метода, описанного Gabert J et al. (2003). Для проведения реакции готовят реакционную смесь, содержащую 12,5 мкл 2х мастер микса для проведения ПЦР в реальном времени с флуоресцентной пробой, 300 нМ праймеров (ENF207/ENR262 или ENF208/ENR262) и 200 нМ пробы ENP242, воды до 20 мкл и 5 мкл кДНК (общий объем реакционной смеси составляет 25 мкл). Две реакции, содержащие исследуемую кДНК две реакции, содержащие воду (К-) и/или кДНК без экспрессии MLL-AF4 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 минуты при 50⁰С, 10 минут при 95⁰С, затем проводят 50 циклов ПЦР (95⁰С – 15 секунд, 60⁰С – 60 секунд), считывание флуоресценции проводится на этапе элонгации.

Задача этого этапа – определить, какой вариант гена присутствует у пациента. В этом случае возможны несколько вариантов:

1) Присутствует нуклеотидная последовательность, ограниченная праймерами ENF207/ENR262: в исследуемом образце лейкозных клеток присутствуют варианты e9-e5 или e9-e4. В дальнейшем используют комбинацию праймеров ENF207/ENR262 и пробы ENP242.

2) Присутствует нуклеотидная последовательность, ограниченная праймерами ENF208/ENR262: в исследуемом образце лейкозных клеток

присутствуют варианты e10-e5, e10-e4, e11-e4, e11-e5. В дальнейшем используют комбинацию праймеров ENF208/ENR262 и пробы ENP242.

3) Присутствуют нуклеотидные последовательности, ограниченные обеими парами праймеров (ENF207/ENR262 и ENF208/ENR262). В дальнейшем используют комбинацию праймеров и пробы, давшей наименьшее значение Ct (с использованием которой амплификация выявляется на более ранних циклах ПЦР).

После подбора оптимальной комбинации праймеров/пробы идет определение уровня минимальной остаточной болезни в ходе терапии. Для постановки ПЦР готовят реакционные смеси, содержащие необходимые реактивы для амплификации 8+2n пробирок в случае контрольного гена и 12+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 (таблица 1). Выбранный контрольный ген целесообразно использовать постоянно для данного типа химерных генов, предпочтительнее – для всех анализов, проводимых в лаборатории.

Таблица 1 – Последовательности олигонуклеотидов для оценки минимальной остаточной болезни у пациентов с перестройками гена MLL-AF4

Ген	Название	Последовательность	Метки
<i>MLL-AF4</i>	ENP242	catggccgcctcctttgacagc	FAM/BHQ
	ENF207	cccaagtatccctgtaaaacaataa	
	ENF208	gatggagtccacaggatcagagt	
	ENR262	gaaaggaaacttggatggctca	
<i>ABL</i>	ENF1003	tggagataacactctagcataactaaaggt	
	ENP1043	ccatttttggttgggcttcacaccatt	FAM/BHQ
	ENR1063	gatgtagtgttgggaccca	
<i>GUS</i>	ENF1102	gaaaatatgtggttgagagctcatt	
	ENP1142	ccagcactctcgtcgggtgactgttca	FAM/BHQ
	ENR1162	ccgagtgaagatcccctttta	

2.1.2 Определение минимальной остаточной болезни у пациентов с экспрессией MLL-AF9, MLL-ENL

Определение экспрессии генов MLL-AF9, MLL-ENL проводят с использованием праймеров, указанных в таблице 2. 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 реакционную смесь, содержащую 12,5 мкл 2х мастер микса для проведения 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 составляет 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 минут при 95°C, затем проводят 50 циклов ПЦР (95°C – 15 секунд, 60°C – 60 секунд), считывание флуоресценции проводят на этапе элонгации.

Таблица 2 – Последовательности олигонуклеотидов для оценки минимальной остаточной болезни у пациентов с перестройками генов MLL-AF9, MLL-ENL .

Ген	Название	Последовательность	Метки
MLL	MLL-F1	cgctcagccacactacag	
	MLL-F2	aggagaatgcaggcacttga	
AF9	AF9-R1	tcacgatcgctgcagaatgt	
	AF9-R2	tggcaggactgggttgctc	
	AF9-R3	gctgctgctgctggtatgaat	
ENL	ENL-R1	ggagttggacgggcttgac	

	ENL-R2	tgggcttcttgcgagtt	
MLL	MLL-T1	cgccaagaaaagaagttcccaaaaccact	FAM/BHQ
	MLL-T2	catcctcagcactctctccaatggcaat	FAM/BHQ

После проведения ПЦР выбирают реакцию, дающую наименьшее значение Ct, то есть 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 следующие комбинации праймеров/пробы

A) MLL-F1/MLL-T1/AF9-R1;

B) MLL-F1/MLL-T1/AF9-R2;

B) 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 следующие комбинации праймеров/пробы

A) MLL-F2/MLL-T2/AF9-R1;

B) MLL-F2/MLL-T2/AF9-R2;

B) 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 проведения 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 составляет 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 минуты при 50°C, 10 минут при 95°C, затем проводят 50 циклов ПЦР (95°C – 15 секунд, 60°C – 60 секунд), считывание флуоресценции проводят на этапе элонгации.

После проведения ПЦР выбирают реакцию, дающую наименьшее значение Ct, то есть 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:

3) Определяется нуклеотидная последовательность, ограниченная праймерами MLL-F1/MLL-T1/ ENL-R1/ENL-R2. На следующем этапе вносим 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 Ct (с использованием которой

амплификация выявляется на более ранних циклах ПЦР). В дальнейшем эту комбинацию используют для оценки уровня МОБ.

2.2 Определение минимальной остаточной болезни по химерным онкогенам TEL-AML1, SIL-TAL, E2A-PBX1, BCR-ABL1, CBFB-MYH11.

Анализ экспрессии химерных онкогенов TEL-AML1, SIL-TAL, E2A-PBX1, BCR-ABL1, CBFB-MYH11 проводится на кДНК методом ПЦР в реальном времени с использованием TaqMan зондов. У перестройки BCR-ABL1 есть два варианта транскриптов с белковыми продуктами p210 (Mbcf) и p190 (mbcf) и два варианта стандартов, анализ проводится в зависимости от типа транскрипта.

Для химерных генов TEL-AML1, SIL-TAL, E2A-PBX1, BCR-ABL1, *CBFB-MYH11* и для контрольного гена предусмотрены коммерческие стандарты для определения абсолютного количества копий генов. Для генов TEL-AML1, SIL-TAL, E2A-PBX1, BCR-ABL1, CBFB-MYH11 диапазон стандартов включает следующие концентрации: 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^5 , 10^6 . В качестве контрольного гена используются гены GUS и ABL, диапазон стандартов включает следующие концентрации: 10^3 , 10^4 , 10^5 .

Для проведения реакции готовят реакционную смесь на основе любого коммерческого набора для проведения ПЦР в реальном времени с TaqMan пробамми, 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 минуты при 50°C , 10 минут при 95°C , затем проводят 50 циклов ПЦР (95°C – 15 секунд, 60°C – 60 секунд), считывание флуоресценции проводится на этапе элонгации.

2.3 Определение минимальной остаточной болезни по дупликации гена FLT3-ITD

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 реакционную смесь на основе любого коммерческого набора для проведения ПЦР в реальном времени с TaqMan пробами, согласно инструкции производителя с 300 нМ праймеров и 200 нМ пробы. Общий объем реакционной смеси составляет 25 мкл.

Расчет МОБ производился как отношение показателей количества перестроек FLT3-ITD (отражающее количество опухолевых клеток в образце) к контрольному гену альбумина (отражающее количество всех клеток в образце, как опухолевых так и нормальных) относительно количества на момент постановки диагноза.

Для определения эффективности реакции и чувствительности выполняют 10-кратные разведения ДНК первичной точки (от 10^0 до 10^{-6}) в поликлональной ДНК здоровых доноров. Полученные стандартные кривые используют для расчета относительного количества продуктов амплификации перестроенного гена FLT3-ITD по отношению к альбумину с учетом эффективности реакции:

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

$$\Delta\text{Ct} = \text{Ct}_{\text{FLT3-ITD}} - \text{Ct}_{\text{ABL}}$$

Где ΔCtU – значение ΔCt в исследуемом образце; ΔCtC – значение ΔCt в калибраторе (в первичной точке); E – эффективность амплификации.

Качество калибровки определяется тремя параметрами: slope (наклон) 3,3 (3,1-3,9), коэффициент корреляции (0,95-1) и эффективность ПЦР, которая должен быть 90-110%.

2.4 Определение минимальной остаточной болезни с использованием идентификации клональных реаранжировок генов Ig/TCR в лейкозных клетках.

Клон клеток лейкоза, происходящих из одной первично-трансформированной клетки, несет идентичные реаранжировки Ig/TCR во всех клетках. Поэтому реаранжировки, выявляемые в опухолевых лимфоидных клетках, могут использоваться как специфические молекулярные опухолевые маркеры у данного пациента.

Для количественной ПЦР в реальном времени (вариант RQ-PCR) с парой праймеров и TaqMan - зондом, меченным флуоресцентной меткой 3'FAM и гасителем 5'ВНQ. При этом один из праймеров (чаще всего прямой) подбирается к соединительному региону реаранжировки, как АСО-праймер в паре с консенсусным (герминативным) праймером и зондом. Для стандартизации анализа для используемой панели реаранжировок существует соответствующая панель праймеров и зондов.

Реакция проводится в 20 мкл с 50% 2x TaqMan Universal PCR Master Mix, 500 нг ДНК, 500 нг каждого праймера и 150 нг ТМ - зонда. В процессе амплификации, ДНК-полимераза гидролизует зонд, что сопровождается излучением флуоресцентного сигнала. Интенсивность сигнала считывается прибором каждый цикл ПЦР и оказывается пропорциональна количеству специфического ПЦР - продукта (нуклеотидной последовательности). Количественным параметром ПЦР в «реальном времени» является величина Ct, которая обозначает цикл ПЦР (расчетная величина, может быть дробной), на котором амплификационная

кривая пересекает линию (threshold), обычно определяемую автоматически.

Синтезированные под заказ АСО-праймеры тестируются перед проведением количественного анализа МОБ. Тестирование проводится методом ПЦР в реальном времени (RQ-PCR) в дуплетах на ДНК лейкозных клеток по сравнению со смесью ДНК от 10 здоровых доноров (поликлональный контроль).

Для постановки анализа количественная обработка данных выполняется методом серийных разведений. Стандартная калибровочная кривая для нормализации количества ДНК проводится по гену альбумина на разведениях ДНК донора в воде. Стандартная калибровочная кривая для мишени (с АСО - праймером) строится в серии реакций на разведениях диагностической ДНК в смеси поликлональной ДНК доноров с шагом в 1 порядок до 10^{-5} .

Уровень амплификации для диагностической ДНК (образец костного мозга до начала лечения с содержанием более 80% бластов) принимается за 1. Уровень специфической амплификации в образцах МОБ оценивается по стандартной кривой в долях относительно 1 (диагностической ДНК). Для всех измерений проводится нормализация количества ДНК между образцами. Полученная в результате величина уровня МОБ характеризует количество опухолевых клеток среди нормальных лейкоцитов. Например, уровень МОБ $2,16 \cdot 10^{-3}$ соответствует 1 опухолевой клетке на $2,16 \cdot 10^3$ нормальных клеток.

2.5 Оценка уровня экспрессии гена WT1 с использованием ПЦР в реальном времени

Количественная оценка экспрессии гена WT1 является актуальным инструментом для мониторинга МОБ в образцах КМ пациентов, не имеющих альтернативных цитогенетических и молекулярно-генетических мишеней.

Для проведения реакции готовят реакционную смесь, содержащую 12,5 мкл 2х мастер микса для проведения ПЦР в реальном времени с флуоресцентной пробой, 300 нМ праймеров и 200 нМ пробы (таблица 2), воды до 20 мкл и 5 мкл кДНК или плазмиды со вставкой детектируемых последовательностей генов GUS и WT1 (стандарты). Общий объем реакционной смеси составляет 25 мкл. По две реакции, содержащие исследуемую кДНК, воду (К-) и/или кДНК без экспрессии WT1 и стандарты для каждого гена, вносят в оптические пробирки (можно использовать 96 луночный планшет или ленту из пробирок), тщательно закрывают оптическими крышками (оптической пленкой), осаждают и помещают в термоциклер для проведения ПЦР в реальном времени. Реакционную смесь инкубируют 2 минуты при 50⁰С, 10 минут при 95⁰С, затем проводят 50 циклов ПЦР (95⁰С – 15 секунд, 60⁰С – 60 секунд), считывание флуоресценции проводится на этапе элонгации.

Таблица 2 - Олигонуклеотидные последовательности праймеров и проб для генов GUS и WT1

Ген	Название олигонуклеотида	Последовательность олигонуклеотида, 5' → 3'
GUS	enf1102	GAAAATATGTGGTTGGAGAGCTCATT*
	enr1162	CCGAGTGAAGATCCCCTTTTA*
	enpr1142	FAM-CCAGCACTCTCGTCGGTGACTGTTCA-BHQ*
WT1	elnf	CGCTATTCGCAATCAGGGTTA**
	elnr	GGGCGTGTGACCGTAGCT**
	elnpr	FAM-AGCACGGTCACCTTCGACGGGA-BHQ**

Примечание: * – согласно Europe against cancer program [Beillard E et al.]; ** – согласно рекомендациям группы EuropeanLeukemiaNet [Cilloni D. et al., 2009].

Результаты экспрессии гена WT1 нормируются на уровень экспрессии эндогенного контроля (ген GUS) (формула 1) и были выражены в относительном уровне экспрессии гена-мишени.

$$RGE = \text{количество копий гена GUS} / \text{количество копий гена WT1} \quad (1).$$

3. Интерпретация результатов.

3.1 Оценка качества ПЦР

В результате ПЦР получают несколько типов данных – данные о цикле, на котором кривая амплификации пересекает пороговый уровень (threshold), так называемый пороговый цикл C_t , а также 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 10000 копий гена, в C_t это составляет не более 26-29 циклов.

3.2 Оценка уровня экспрессии и определение минимальной остаточной болезни при анализе с использованием абсолютного количественного определения 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 минимальной

остаточной болезни 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 10000 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.

Если качество кДНК низкое (например, менее 10000 копий гена Абельсон), и химерный ген амплифицируется, говорят, 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.

3.3 Оценка уровня экспрессии и определение минимальной остаточной болезни при анализе с использованием полуколичественного определения 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 (таблица 2). 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 C_t ИГ следует вычесть значение C_t КГ на момент постановки диагноза (ΔC_t). Затем 2 следует возвести в степень ΔC_t . 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, $C_t > 26-29$ 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.

Если качество кДНК низкое (например, $C_t > 26-29$ циклов при амплификации гена Абельсон), и химерный ген амплифицируется, можно говорить 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.

Возможные ошибки и осложнения: отсутствуют.

