

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

Д.Л.Пиневиц

« 28 » августа 2016 г.

Регистрационный № 068-1016



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

УЧРЕЖДЕНИЕ - РАЗРАБОТЧИК:

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

АВТОРЫ:

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

Минск, 2016

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

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

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Острый миелоидный лейкоз.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Нет.

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

ОМЛ – острый миелоидный лейкоз

ТГСК – трансплантация гемопоэтических стволовых клеток

ЛАИФ – лейкоз-ассоциированный иммунофенотип

ПК – периферическая кровь

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ПЦФ – проточная цитофлуориметрия

РНК – рибонуклеиновая кислота

ТГСК – трансплантация гемопоэтических стволовых клеток

ФСБ – фосфатно-солевой буфер

ЭДТА - этилендиаминтетрауксусная кислота

RGE – относительная экспрессия гена

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;
- спектрофотометр;
- термомиксер;
- холодильник (t 2⁰C - 8⁰C) с морозильным отделением (t - 20⁰C);
- центрифуга с охлаждением на 14000 оборотов/мин (объем пробирок 1,5-2

мл);

- дозаторы для работы с объемами растворов в диапазоне от 0,1 до 1000 мкл;
- ДТТ;
- Taq 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 – антибактериальный и противогрибковый препарат);
- наконечники для дозаторов с аэрозольными барьерами (объем – от 0,1 до 1000 мкл);
- пробирки (объем - 0,2-50 мл), пробирки с антикоагулянтом (ЭДТА, цитратом

ОПИСАНИЕ МЕТОДОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МОБ

А. Иммунофенотипическое определение aberrантной экспрессии антигенов лейкомиических клеток методом шести – восьмицветной проточной цитофлуориметрии.

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

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

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

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

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

Для определения ЛАИФ достаточно хотя бы одного из вышеперечисленных признаков.

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

промаркированные пробирки. В каждую пробирку вносят одно или несколько моноклональных антител, конъюгированных с различными флуорохромами.

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

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

Методологический подход заключается в анализе степени экспрессии определенных ИФТ-маркеров (или их комбинации) в КМ пациента и сопоставлении с экспрессией данных маркеров на лейкозных клетках до начала специфической терапии на CD45+ клетках КМ. Для этого, предварительно, из анализа исключаются лейкоциты, не относящиеся к миелобластам, путем выделения области изучаемых

клеток во всех пробах по CD45 маркеру. Используют моноклональные антитела в следующих комбинациях: IgG1/IgG2a/CD45, CD7/CD13/CD45, CD34/CD33/CD45, CD34/CD117/CD45 дополнительными маркерами используются CD20, CD7, CD4, CD2.

Б. Определение МОБ с использованием ПЦР.

Определение МОБ с использованием ПЦР основано на количественном определении специфических молекулярно-генетических маркеров (PML/RAR α , RUNX1-RUNX1T1 (AML1-ETO), CBFB-MYH11), либо различных вариантах реарранжировок MLL (MLL-AF4, MLL-ENL, MLL-ELL, MLL-AF6, MLL-AF9, MLL-AF10), либо дупликации внутри гена (MLL-PTD, FLT3-ITD). Определение данных маркеров проводится на ДНК или кДНК в зависимости от мишени и включает несколько этапов: пробоподготовка (выделение мононуклеаров из периферической крови или КМ, выделение ДНК или РНК с последующим синтезом кДНК), проведение ПЦР в реальном времени и интерпретации 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 65°C. Охлаждают на льду не менее минуты, осаждают конденсат со стенок и добавляют остальные реагенты до конечного объема 20 мкл: 4 мкл 5x буфера, 1 мкл 0,1 М ДТТ, 1 мкл ингибитора РНКаз (40 единиц/мкл), 1 мкл обратной транскриптазы, которая работает при 50-55°C (200 единиц/мкл). Инкубируют последовательно при комнатной температуре 5 минут, при 50°C в течение 30-60 минут, 70°C в течение 15 минут. Помещают образец на 4°C. 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 МОБ с помощью ПЦР в реальном времени по молекулярно-генетическим маркерам

2.1 Определение МОБ по перестройкам гена MLL

После определения типа химерного гена необходимо подобрать праймеры для определения МОБ с использованием ПЦР в реальном времени. Количественная интерпретация данных, полученных в ходе ПЦР в реальном времени требует 100% эффективности амплификации. Для этого праймеры подбирают таким образом,

чтобы они амплифицировали фрагменты размером 50-150 пар оснований, так как при увеличении длины амплифицируемого участка эффективность амплификации снижается. Это накладывает определенные ограничения на дизайн праймеров, не позволяет 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 определения МОБ используются разные подходы в зависимости от типа химерного гена.

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

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

На первом этапе определяют оптимальную комбинацию праймеров. Так, если диагностическая ПЦР выявила экспрессию гена MLL-AF9, для проведения реакции готовят 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 1 – Последовательности олигонуклеотидов для оценки минимальной остаточной болезни у пациентов с перестройками генов MLL-AF9, MLL-ENL

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

После проведения ПЦР выбирают реакцию, дающую наименьшее значение C_t , 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

А) MLL-F1/MLL-T1/AF9-R1;

Б) MLL-F1/MLL-T1/AF9-R2;

В) MLL-F1/MLL-T1/AF9-R3.

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

А) MLL-F2/MLL-T2/AF9-R1;

Б) MLL-F2/MLL-T2/AF9-R2;

В) MLL-F2/MLL-T2/AF9-R3.

Если диагностическая ПЦР выявила экспрессию гена MLL-ENL, для проведения реакции готовят реакцию 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 C_t , 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 C_t (с использованием которой амплификация выявляется на более ранних циклах ПЦР). В дальнейшем эту комбинацию используют для оценки уровня МОБ.

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

В случае, если отсутствуют стандартные праймеры/проба для оценки уровня МОБ, продукты амплификации, полученные в ходе диагностики, секвенируют с использованием праймеров, указанных в таблице 3. Для этого 3 мкл очищенного продукта смешивается с прямым или обратным праймером и вносятся реактивы в соответствии с методикой, описанной в наборе, содержащем флуоресцентно меченые дидезоксинуклеотиды. После проведения реакции секвенирования в продукт секвенирования объемом 20 мкл вносится 5 мкл 0,125 М ЭДТА, 65 мкл 96%

спирта, инкубируется в течение 15 минут и осаждается при 14000 оборотов в минуту. После удаления супернатанта в пробирку вносится 120 мкл 70% спирта и центрифугирование повторяют в течение 20 минут. Затем супернатант удаляют, осадок сушат, ресуспендируют в 15-20 мкл формамида, денатурируют в течение 5 минут при 95⁰С и загружают в генетический анализатор для проведения капиллярного электрофореза продуктов секвенирующей реакции.

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

Размер ПЦР продукта – 50-150 пар оснований;

Размер праймеров (олигонуклеотидов) – 18-23 основания;

Температура отжига праймеров – 58-62⁰С;

Содержание GC – от 30 до 80%;

Максимальное количество одинаковых последовательных оснований – 5;

Размер пробы (олигонуклеотида) – 18-30 оснований;

Температура отжига праймеров – 68-72⁰С;

Содержание GC – от 30 до 80%;

Проба размещается между праймерами и метится с 5' конца красителем, с 3' конца – гасителем;

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

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

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

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

ген	Название праймеры/пробы	5 – 3 последовательность
<i>ABL1</i>	ENF1003	TGGAGATAACAСТСТАAGCATAACTAAAGGT
	ENPr1043	Fam CCAТТТТТGGТТТGGGCTTCACACCATT BHQ1
	ENR1063	GATGTAGTTGCTTGGGACCCA
<i>BCR-ABL1</i>	ENF402 BCR для p190	CTGGCCCAACGATGGCGA
	ENP541 ABL	Fam CCCTTCAGCGGCCAGTAGCATCTGA BHQ1
	ENR561 ABL	CACTCAGACCCTGAGGCTCAA
	ENF501 BCR для p210	TCCGCTGACCATCAAYAAGGA
<i>AML1-ETO</i>	ENF701 AML1	CACCTACCACAGAGCCATCAA A
	ENP747 AML1	Fam ACCTCGAAATCGTACTGAGAAGCACTCCA BHQ1
	ENR761 ETO	ATCCACAGGTGAGTCTGGCATT
<i>PML-RARa</i>	ENF903 PML для bcr1	TCTTCCTGCCCAACAGCAA
	ENF906 PML для bcr2	ACCTGGATGGACCGCCTAG

	ENF905 PML для bcr3	CCGATGGCTTCGACGAGTT
	ENP942 RARa	Fam AGTGCCCAGCCCTCCCTCGC BHQ1
	ENR962 RARa	GCTTGTAGATGCGGGGTAGAG
<i>CBFB- MYH11</i>	ENF803 CBFB	CATTAGCACAAACAGGCCTTTGA
	ENPr843 CBFB	Fam TCGCGTGTCTTCTCCGAGCCT BHQ1
	ENR862MYH11 для типа A	AGGGCCCGCTTGGACTT
	ENR863MYH11 для типа D	CCTCGTTAAGCATCCCTGTGA
	ENR865MYH11 для типа E	CTCTTTCTCCAGCGTCTGCTTAT

Для химерных онкогенов BCR-ABL1, PML-RARa, AML-ETO, CBFB-MYH11 и для контрольного гена ABL1 предусмотрены коммерческие стандарты для определения абсолютного количества копий генов. Для генов BCR-ABL1, PML-RARa, AML-ETO, CBFB-MYH11 диапазон стандартов включает следующие концентрации: 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^5 , 10^6 . Диапазон стандартов для ABL1 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 пробамии, согласно инструкции производителя с 300 нМ праймеров и 200 нМ пробы и 5 мкл кДНК или стандартов. Общий объем реакционной смеси составляет 25 мкл. Обязательна постановка отрицательного контроля. Реакционную смесь инкубируют 2 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 МОБ по дупликации гена FLT3-ITD полуколичественным методом.

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

Для проведения реакции готовят 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. Общий объем реакционной смеси составляет 25 мкл.

Расчет МОБ производят как отношение показателей количества мутантного FLT3-ITD (отражающее количество опухолевых клеток в образце) к контрольному гену альбумина ALB (отражающее количество всех клеток в образце, как опухолевых так и нормальных) относительно 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. 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%.

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

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

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

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

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 Ct , 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 Ct 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 Ct это составляет не более 26-29 циклов.

3.1 Оценка уровня экспрессии и определение МОБ 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 МОБ в процентах (%) от диагноза. Изменение уровня МОБ можно также выражать в логарифмах, когда 1 логарифму соответствует изменение в 10 раз.

Если качество кДНК низкое (например, менее 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.

Низкое качество кДНК (например, менее 10000 копий гена Абельсон), и амплификация химерного гена свидетельствуют о том, что экспрессия гена в образце присутствует, но количественно интерпретировать данные не представляется возможным с использованием данного материала. Рекомендуют также перевыделить РНК/пересинтезировать кДНК и повторить ПЦР.

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

3.2 Оценка уровня экспрессии и определение МОБ 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. Выбранный контрольный ген целесообразно использовать постоянно для данного типа химерных генов, предпочтительнее – для всех анализов, проводимых в лаборатории.

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

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

Низкое качество кДНК (например, $Ct > 26-29$ циклов при амплификации гена Абельсон), и амплификация химерного гена свидетельствует 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.

В. Методика флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH)

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

2. Остывшие стекла просматриваются под оптическим микроскопом с общим увеличением x100, выбираются участки с достаточной клеточностью и равномерно распределенными клетками. Участок помечается.

3. Помещают стекла в раствор 2xSSC, предварительно прогретый до 37°C, на 30 минут.

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

5. 10-15 минут стекла сушат вертикально при комнатной температуре.

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

7. ДНК денатурируют и гибридизуют на режиме указанном фирмой-производителем (температура и время). Оптимальное время гибридизации 16-20 часов.

8. Покровные стекла быстро снимают и отмывают в растворе 0,4xSSC/0,3% NP40 в течение 2 минут при температурах, указанных производителем.

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

10. Дегидратируют образцы в серии спиртов (70, 80 и 96 % этанол) по 2 минуты при комнатной температуре. Затем 15-20 минут стекла сушат вертикально при комнатной температуре в темноте.

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

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

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

Возможные ошибки и осложнения: отсутствуют.

Алгоритм определения МОБ при ОМЛ

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

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



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



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



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

МОБ

молекулярно-генетическим методом пациенту с ОМЛ при наличии молекулярно-

генетического маркера 2) взятие КМ для определения МОБ методом проточной цитометрии.

На втором году наблюдения исследование МОБ проводится 1 раз в шесть месяцев только тем пациентам, у которых есть молекулярно-генетический маркер.

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

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

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