

2. Baxter E.J., Scott L.M., Campbell P.J., East C., Fourouclas N., Swanton S., et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet*. 2005; 365(9464): 1054–61.
3. Catalog of somatic mutations in cancer. <http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>
4. Scott L.M. The JAK2 exon 12 mutations: a comprehensive review. *Am. J. Hematol.* 2011; 86(8): 668–76.
5. Wu Z., Zhang X., Xu X., Chen Y., Hu T., Kang Z., et al. The mutation profile of JAK2 and CALR in Chinese Han patients with Philadelphia chromosome-negative myeloproliferative neoplasms. *J. Hematol. Oncol.* 2014; 7: 48. doi: 10.1186/s13045-014-0048-6.
6. Pardanani A., Lasho T.L., Finke C., Hanson C.A., Tefferi A. Prevalence and clinicopathologic correlates of JAK2 exon 12 mutations in JAK2V617F-negative polycythemia vera. *Leukemia*. 2007; 21(9): 1960–3.
7. Passamonti F., Elena C., Schnittger S., Skoda R.C., Green A.R., Girodon F., et al. Molecular and clinical features of the myeloproliferative neoplasm associated with JAK2 exon 12 mutations. *Blood*. 2011; 117(10): 2813–6.
8. Pietra D., Li S., Brisci A., Passamonti F., Rumi E., Theodorides A., et al. Somatic mutations of JAK2 exon 12 in patients with JAK2 (V617F)-negative myeloproliferative disorders. *Blood*. 2008; 111(3): 1686–9.
9. Scott L.M., Tong W., Levine R.L., Scott M.A., Beer P.A., Stratton M.R., et al. Green AR. JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. *N. Engl. J. Med.* 2007; 356(5): 459–68.
10. Percy M.J., Scott L.M., Erber W.N., Harrison C.N., Reilly J.T., Jones F.G., et al. The frequency of JAK2 exon 12 mutations in idiopathic erythrocytosis patients with low serum erythropoietin levels. *Haematologica*. 2007; 92(12): 1607–14.
11. Jones A.V., Cross N.C., White H.E., Green A.R., Scott L.M. Rapid identification of JAK2 exon 12 mutations using high resolution melting analysis. *Haematologica*. 2008; 93(10): 1560–4.
12. Ugo V., Tondeur S., Menot M.L., Bonnin N., Le Gac G., Tonetti C., et al.; French Intergroup of Myeloproliferative disorders. Interlaboratory development and validation of a HRM method applied to the detection of JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera patients. *PLoS One*. 2010; 5(1): e8893.
13. Schnittger S., Bacher U., Haferlach C., Geer T., Müller P., Mittermüller J., et al. Detection of JAK2 exon 12 mutations in 15 patients with JAK2V617F negative polycythemia vera. *Haematologica*. 2009; 94(3): 414–8.
14. Laughlin T.S., Moliterno A.R., Stein B.L., Rothberg P.G. Detection of exon 12 Mutations in the JAK2 gene: enhanced analytical sensitivity using clamped PCR and nucleotide sequencing. *J. Mol. Diagn.* 2010; 12(3): 278–82.
15. Furtado L.V., Weigelin H.C., Elenitoba-Johnson K.S., Betz B.L. A multiplexed fragment analysis-based assay for detection of JAK2 exon 12 mutations. *J. Mol. Diagn.* 2013; 15(5): 592–9.
16. Dunaeva E.A., Mironov K.O., Dribnokhodova O.P., Subbotina T.N., Bashmakova E.E., Olkhovskiy I.A., Shipulin G.A. The quantitative testing of V617F mutation in gen JAK2 using pyrosequencing technique. *Russian Clinical Laboratory Diagnostics Journal (Klinicheskaya laboratornaya diagnostika)*. 2014; 59(11): 60–3. (in Russian)
17. Mironov K.O., Dunaeva E.A., Dribnokhodova O.P., Shipulin G.A. Detection of genetic polymorphism with the use of Genetic analysis based on pyrosequencing PYROMARK Q24. *Directory manager of clinical laboratory diagnostics. Russian Journal (Spravochnik zaveduyushchego KDL)*. 2011; 4: 39–48. (in Russian)
18. Lillie R.D. *Histopathologic technic and practical histochemistry*. New York: McGraw Hill Book Co; 1965.
19. Kjaer L., Westman M., Hasselbalch Riley C., Høgdall E., Weis Bjerrum O., Hasselbalch H. A highly sensitive quantitative real-time PCR assay for determination of mutant JAK2 exon 12 allele Burden. *PLoS One*. 2012; 7(3): 1–8.
20. Theodorides A., Passweg J.R., Medinger M., Looser R., Li S., Hao-Shen H., et al. The allele burden of JAK2 mutations remains stable over several years in patients with myeloproliferative disorders. *Haematologica*. 2008; 93(12): 1890–3.
21. Li S., Kralovics R., De Libero G., Theodorides A., Gisslinger H., Skoda R.C. Clonal heterogeneity in polycythemia vera patients with JAK2 exon12 and JAK2-V617F mutations. *Blood*. 2008; 111(7): 3863–6.
22. Tsiatis A.C., Norris-Kirby A., Rich R.G., Hafez M.J., Gocke C.D., Eshleman J.R., et al. Comparison of Sanger sequencing, pyrosequencing, and melting curve analysis for the detection of KRAS mutations: diagnostic and clinical implications. *J. Mol. Diagn.* 2010; 12(4): 425–32.
23. Dribnokhodova O.P., Mironov K.O., Dunaeva E.A., Demidova I.A., Barinov A.A., Voytsekhovskaya Ya.A., et al. The detection of activating somatic mutations in gene kras using pyrosequencing technique. *Russian Clinical Laboratory Diagnostics Journal (Klinicheskaya laboratornaya diagnostika)*. 2013; 58(6): 49–51. (in Russian)
24. Xie G., Xie F., Wu P., Yuan X., Ma Y., Xu Y., et al. The mutation rates of EGFR in non-small cell lung cancer and KRAS in colorectal cancer of Chinese patients as detected by pyrosequencing using a novel dispensation order. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 2015; 34(1): 63. doi: 10.1186/s13046-015-0179-9.
25. Milbury C.A., Li J., Makrigiorgos G.M. Ice-COLD-PCR enables rapid amplification and robust enrichment for low-abundance unknown DNA mutations. *Nucleic Acids Res.* 2011; 39(1): e2. doi: 10.1093/nar/gkq899/

Поступила 23.09.15

Принята к печати 12.07.16

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 616.155.392.2-036.11-036.86-07

Комков А.Ю.^{1,2}, Мирошниченкова А.М.², Ольшанская Ю.В.², Мякова Н.В.², Дьяконова Ю.Ю.²,
Минервина А.А.¹, Мамедов И.З.¹, Лебедев Ю.Б.¹, Масчан А.А.², Масчан М.А.²

ДЕТЕКЦИЯ ПЕРЕСТРОЕК ИММУНОГЛОБУЛИНОВЫХ ГЕНОВ ПРИ ОСТРЫХ ЛИМФОБЛАСТНЫХ ЛЕЙКОЗАХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ

¹ФАНО России ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина
и Ю.А. Овчинникова» РАН, 117997, г. Москва, Россия;

²ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии, иммунологии
им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, 117997, г. Москва, Россия

Мониторинг минимальной остаточной болезни является одним из важнейших инструментов при терапии острых лимфобластных лейкозов. Однако применение его в клинической практике имеет ряд существенных ограничений, связанных с методологическими сложностями, высокой стоимостью и зачастую неоднозначностью интерпретации результатов. В данной работе описывается система для идентификации клональных перестроек в локусах иммуноглобулиновых генов с использованием метода высокопроизводительного секвенирования нового поколения. Проведена апробация системы на 17 клинических образцах, взятых у детей, больных В-клеточным острым лимфобластным лейкозом. Для 16 исследованных образцов обнаружено от 1 до 6 различных перестроек иммуноглобулиновых генов. Сравнение новой системы с традиционно используемой системой BIOMED-2 показало высокую корреляцию результатов. Дальнейшее развитие системы позволит создать высоконадежный и чувствительный метод для мониторинга минимальной остаточной болезни.

Ключевые слова: острый лимфобластный лейкоз; минимальная остаточная болезнь; перестройки иммуноглобулиновых генов; высокопроизводительное секвенирование.

Для цитирования: Комков А.Ю., Мирошниченкова А.М., Ольшанская Ю.В., Мякова Н.В., Дьяконова Ю.Ю., Минервина А.А., Мамедов И.З., Лебедев Ю.Б., Масчан А.А., Масчан М.А. Детекция перестроек иммуноглобулиновых генов при острых лимфобластных лейкозах с использованием высокопроизводительного секвенирования нового поколения. *Гематология и трансфузиология*. 2016; 61(4): 200-204. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0234-5730-2016-61-4-200-204>

Komkov A.Yu.^{1,2}, Miroshnichenkova A.M.², Olshanskaya Yu.V.², Myakova N.V.², Diakonova Yu.Yu.²,
Minervina A.A.¹, Mamedov I.Z.¹, Lebedev Yu.B.¹, Maschan A.A.², Maschan M.A.²

DETECTION OF IMMUNOGLOBULIN GENES REARRANGEMENTS IN PATIENTS WITH ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA USING HIGHTHROUGHPUT NEXT GENERATION SEQUENCING

¹Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry Russian Academy of Sciences,
Moscow, 117997, Russian Federation

²D. Rogachev Federal Research Center for Pediatric Hematology, Oncology and Immunology,
Moscow, 117997, Russian Federation

Monitoring of minimal residual disease (MRD) proved to be a valuable tool for predicting relapse in patients with acute lymphoblastic leukemia (ALL). However, the universal use of MRD monitoring in routine clinical practice is limited because current MRD assays have some methodological difficulties, high price and ambiguity of assay results interpretation. Here we describe next generation sequencing based system for the detection of clonal rearrangements in immunoglobulin genes loci. We performed testing of the system on 17 initial bone marrow samples from B-ALL patients. We revealed 1 to 6 characteristic immunoglobulin genes rearrangements in each of 16 samples. These results are in a good accordance with the results obtained by traditional BIOMED-2 assay. Further improvement of the reported system will provide highly reliable and sensitive technique for MRD monitoring.

Key words: acute lymphoblastic leukemia; minimal residual disease; immunoglobulin genes rearrangements; highthroughput sequencing.

For citation: Komkov A.Yu., Miroshnichenkova A.M., Olshanskaya Yu.V., Myakova N.V., Diakonova Yu.Yu., Minervina A.A., Mamedov I.Z., Lebedev Yu.B., Maschan A.A., Maschan M.A. Detection of immunoglobulin genes rearrangements in patients with acute lymphoblastic leukemia using highthroughput next generation sequencing. *Hematology and Transfusiology. Russian Journal (Gematologiya i transfusiologiya)*. 2016; 61(4): 200-204. (in Russian). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0234-5730-2016-61-4-200-204>

Acknowledgments. The study was supported by Grant of Ministry of Education and Science of the Russian Federation (RFMEF160414X0118).
Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received 10 November 2016
Accepted 22 November 2016

Определение минимальной остаточной болезни (МОБ) при лейкозах является одним из важнейших инструментов прогнозирования течения заболевания и определения терапевтической стратегии [1]. Для мониторинга МОБ используют различные маркеры и методологические подходы. В опухолевых клетках при острых лимфобластных лейкозах (ОЛЛ) достаточно часто обнаруживаются перестройки локусов иммуноглобулиновых рецепторов, которые происходят по механизму V(D)J-рекомбинации. Поскольку в результате V(D)J-рекомбинации может образоваться огромное количество вариантов, такой вид маркера удобно использовать для мониторинга МОБ: конкретная перестройка отсутствует в нормальных клетках и уникальна для абнормального клона, а значит ее обнаружение в костном мозге после химиотерапии однозначно указывает на наличие лейкоэмических клеток. Первичная идентификация иммуноглобулиновых перестроек, характерных для патогенного клона при ОЛЛ, на первый взгляд не представляет существенной проблемы: содержание опухолевых клеток в клиническом образце костного мозга или крови пациента составляет от 20 до 95%. Такую идентификацию стандартно проводят с использованием набора BIOMED-2 [2]. Данная система основана на ПЦР-амплификации локусов генов иммуноглобулиновых рецепторов с помощью не-

скольких смесей праймеров с последующим секвенированием полученных ампликонов по методу Сэнгера. Несмотря на широкое использование данной системы на протяжении последних 15 лет, она имеет ряд недостатков, наиболее существенным из которых является невозможность идентификации диагностических перестроек, произошедших в обоих аллелях одного локуса. Кроме того, использование набора BIOMED-2 достаточно трудоемко и для идентификации перестройки требуется довольно много времени. В связи с этим несколькими исследовательскими группами был предложен подход, при котором детекцию перестроек проводят с использованием высокопроизводительного секвенирования нового поколения (High Throughput Sequencing – HTS или Next Generation Sequencing – NGS) [3–5]. Использование нового метода позволяет различать перестройки двух аллелей в одном локусе и при определенных условиях сократить время и стоимость анализа в расчете на один образец. На основе проведенных исследований были разработаны коммерчески доступные наборы (например, LymphoTrack, InvivoScribe). Однако созданные наборы не позволяют анализировать полную панель перестроек, так как содержат набор праймеров лишь для части иммуноглобулиновых генов.

В данной работе мы описываем созданную оригинальную систему для первичной детекции перестроек иммуноглобулиновых локусов. Разработанная система позволяет проводить детекцию перестроек во всех иммуноглобулиновых локусах, используемых в стандартном наборе BIOMED-2. Проведена апробация системы на наборе из 20 первичных образцов, взятых у больных ОЛЛ.

Материал и методы

В исследование были включены 17 детей больных ОЛЛ в возрасте от 1 года до 15 лет (медиана возраста 4 года). В выборку были включены больные с различным типом В-ОЛЛ по результатам исследования с цитофлюориметрическим окрашиванием образцов (см. таблицу). Исследование было одобрено локальным этическим комитетом ФНКИЦ ДГОИ.

Библиотеки для массивного секвенирования получали в ходе двух этапов ПЦР-амплификации. На обоих этапах каждую ПЦР проводили в объеме 25 мкл, содержащем 1X TERSUS Buffer («Евроген», Россия), 1X полимеразу TERSUS («Евроген», Россия), 5 нмоль каждого нуклеозидтрифосфата («Thermo Scientific», США).

Для корреспонденции:

Масчан Михаил Александрович, доктор медицинских наук, профессор, заместитель генерального директора, директор Высшей школы молекулярной и экспериментальной медицины ФНКИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева. E-mail: mmaschan@yandex.ru.

For correspondence:

Maschan Michael A., MD, PhD, deputy-director of the Dmitriy Rogachev Research Center for pediatric hematology, oncology and immunology. Moscow, 117997, Russian Federation. E-mail: mmaschan@yandex.ru.

Information about authors:

Komkov A.Yu., <http://orcid.org/0000-0001-9113-698X>; Miroshnichenkova A.M., <http://orcid.org/0000-0003-1833-0430>; Olshanskaya Yu.V., <http://orcid.org/0000-0002-2352-7716>; Myakova N.V., <http://orcid.org/0000-0002-4779-1896>; Diakonova Yu.Yu., <http://orcid.org/0000-0002-8725-7532>; Minervina A.A., <http://orcid.org/0000-0001-9884-6351>; Mamedov I.Z., <http://orcid.org/0000-0002-3992-9285>; Lebedev Yu.B., <http://orcid.org/0000-0003-4554-4733>; Maschan A.A., <http://orcid.org/0000-0002-0016-6698>; Maschan M.A., <http://orcid.org/0000-0003-1735-0093>.

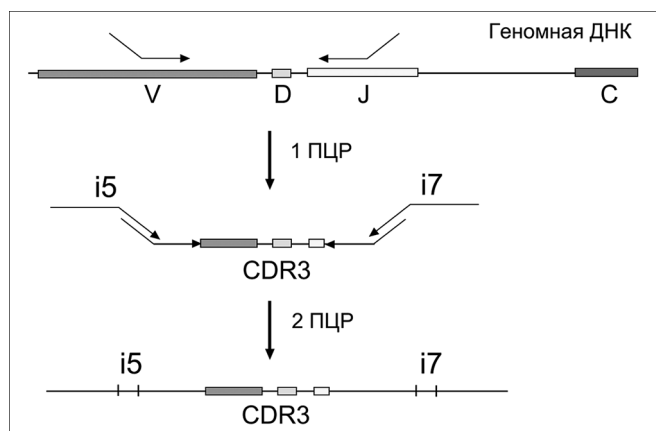


Схема получения библиотек для секвенирования на платформе Illumina. Прямоугольниками разных цветов обозначены геномные сегменты (V, D, J) из которых формируется перестройка в результате рекомбинации. CDR3 – гипервариабельный участок; i5 и i7 – 8-нуклеотидные баркоды образца Illumina.

На первом этапе для каждого образца ДНК выполняли 8 мультиплексных ПЦР, каждая из которых содержала по 40 нг геномной ДНК и соответствующий набор олигонуклеотидных праймеров (5 пмоль каждого). Амплификацию проводили методом "touchdown": предварительный прогрев 95 °C 2 мин, затем четыре цикла с профилем 95 °C 20 с, 68 °C 20 с, 72 °C 40 с, каждые следующие четыре цикла ПЦР осуществляли при пониженной на 2 °C температуре отжига вплоть до достижения 60 °C, затем на последних 15 циклах амплификации температуру отжига поднимали до 72 °C. По завершении ПЦР из каждой реакционной смеси отбирали по 5 мкл, смешивали и экстрагировали ДНК с помощью 0,8 объема магнитных частиц AmPure XP Beads ("Beckman Coulter", США). Реакционная смесь для второго этапа амплификации в дополнение к указанному выше компонентам содержала в качестве матрицы экстрагированные ампликоны, полученные на первом этапе, и пару олигонуклеотидных праймеров (5 пмоль каждого). Температурный профиль амплификации включал предварительный прогрев 2 мин при температуре 95 °C и 15 циклов с профилем 95 °C 20 с, 55 °C 20 с, 72 °C 40 с. Из полученных реакционных смесей с помощью 0,8 объема магнитных частиц AmPure XP Beads экстрагировали ДНК, которую затем секвенировали на платформе Illumina (MiSeq, длина чтения 2x150). Анализ данных секвенирования проводили с помощью веб-платформы Galaxy (<https://usegalaxy.org>) и программы IgBLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast>).

Результаты

Описание и принцип действия системы

При разработке системы для инициальной детекции перестроек мы использовали принцип, примененный в работах [3–5] для идентификации перестроек локуса IGH. Общий принцип такого подхода проиллюстрирован на рисунке. Для получения библиотек, содержащих перестройки иммуноглобулиновых локусов, адаптированных для высокопроизводительного секвенирования на платформе Illumina, проводят ПЦР-амплификацию в две стадии. На первой стадии в качестве матрицы используют геномную ДНК, выделенную из инициального образца костного мозга больных ОЛЛ. Для амплификации всех локусов проводят параллельную амплификацию с 8 разными наборами праймеров, соответствующих генам иммуноглобулинов (IGH, IGL, IGK) и Т-клеточных рецепторов (TRB, TRG, TRD). Наборы праймеров позволяют детектировать как полные (VDJ), так и неполные (DJ) перестройки локусов TRB и IGH. Каждый из 66 праймеров, составляющих 8 наборов, состоит из специфической 3'-части, соответствующей своему иммуноглобулиновому локусу и универсальной 5'-части, содержащей олигонуклеотиды, необходимые для секвенирования. На второй стадии амплификации вводят последовательности, необходимые для гибридизации на сиквеновую ячейку Illumina и 8 нуклеотидные баркоды образцов с двух сторон каждой молекулы

(см. рисунок, i5 и i7). Использование двойного баркодирования потенциально позволяет проанализировать до 384 индивидуальных клинических образцов за один запуск секвенатора. После двухстадийной амплификации проводят очистку полученных библиотек, после чего они напрямую секвенируются в приборе Illumina MiSeq. Общее время подготовки библиотек с момента получения геномной ДНК до запуска прибора составляет около 6 ч.

Проверка и валидация системы на клинических образцах ОЛЛ

Для проверки разработанной системы была проведена детекция перестроек шести иммуноглобулиновых локусов в 17 первичных образцах ОЛЛ (см. таблицу). В результате проведенного секвенирования и анализа полученных данных в 16 образцах были выявлены клональные маркеры опухолевых лимфоцитов, каждый из которых представляет собой нуклеотидную последовательность V(D)J-перестройки одного из иммуноглобулиновых локусов с аномально высокой долей среди всего массива сиквенов данного локуса. Число обнаруженных в одном образце перестроек варьировало от 1 до 6. Доля сиквенов, представляющих собой перестройку, варьировала от 17 до 78%. Для 1 образца перестройки не были обнаружены, а распределение численности отдельных сиквенов каждого из анализируемых локусов соответствовало таковому у здорового человека. Был проведен анализ структуры каждого из выявленных маркеров и идентифицированы V, D и J-сегменты, образовавшие каждую перестройку. Для 4 исследованных образцов было проведено определение перестройки традиционным методом, основанным на амплификации с набором праймеров BIOMED-2 и секвенировании методом Сэнгеру. Полученные результаты совпадают с результатами, полученными с использованием разработанной нами NGS-системы.

Обсуждение

Мониторинг МОБ является важным инструментом прогнозирования риска развития рецидива как у взрослых, так и у детей, страдающих ОЛЛ. Если до недавнего времени единственным методом профилактики рецидива при персистенции МОБ у больных лейкозами из предшественников В-лимфоцитов являлась токсичная и применимая далеко не у всех больных миелоаблативная терапия с трансплантацией гематопозитических предшественников, то с появлением инновационных методов иммунотерапии – биспецифических активаторов Т-лимфоцитов (блинатуомаб) и Т-лимфоцитов с химерными рецепторами (CART), которые способны эффективно элиминировать МОБ, открывает совершенно новые возможности в лечении ОЛЛ [6].

До недавнего времени для детекции МОБ применяли либо проточную цитометрию с мониторингом клеток с «лейкемическим иммунофенотипом», либо поиск и секвенирование по Сэнгеру специфичных для конкретного больного реарранжировок генов Т-клеточного рецептора и иммуноглобулинов. Оба этих метода имеют свои недостатки и малоприменимы для массовых исследований, особенно в странах с большой территорией и сложной логистикой перемещения биологических образцов.

Метод высокопроизводительного секвенирования нового поколения находит все более широкое применение в клинической практике, в том числе и для мониторинга МОБ [1, 4, 5, 7–11]. Несмотря на кажущуюся дороговизну метода, его использование дает ряд существенных преимуществ по сравнению с традиционным секвенированием по Сэнгеру при сравнимой стоимости анализа в пересчете на один образец. К таким преимуществам относятся возможность различать множественные перестройки для одного иммуноглобулинового локуса, идентифицировать минорные варианты лимфоидных клонов, оценивать общее распределение патогенных и нормальных перестроек в образце. Другими словами, детекция иммуноглобулиновых перестроек с использованием NGS является более чувствительной и достоверной по

Характеристика больных и результаты идентификации перестроек иммуноглобулиновых локусов

Образец	Тип ОЛЛ	Локус	V*	D*	J*	CDR3**
10802	B3	IGH	V4-39	D2-2	J6	ARDRGL##YQLLWTLGLGVLLRYGR
		IGH	V3-30	D2-2	J6	ARG#YQLLWTLGLGVLLRYGR
		IGH		D3-3	J5	
11160	B2	IGL	V3-25		J3	QSADSSGTYPYWV
		IGH	V3-11	D2-2	J6	ARD#TGYSSTSCFTRQQTITTTTVWT
		TCRG	V11		J1	AL#E
11525	B3	IGK	V1-37		J5	QRTYNAPPPA
		TCRB	V14	D2	J2	GREGTDTQY
10575	B	IGH	V3-74	D1-26	J6	ASRSSHYQWELLEATTTTTWTS
		IGH		D1-26	J6	
16113	B2	IGH	V3-23	D2-15	J6	AQEGIL#WW#LLLRAITTTTVWTS
		IGH	V4-39	D2-15	J4	AREKQGCGSGGSCYVVALTT
		IGH	V3-30	D2-15	J4	ARDDIVVVVAATLLLL#L
		TCRG	V2		JP2	ATWDGQSDWIKT
		IGK	V2-30		J2	MQGTHWPQH
16294	B2	IGH	V4-34	D2-2	J5	ARAESPYSSTSCSTGSTP
		IGH		D3-9	J4	
		IGH		D2-2	J4	
		TCRD	V3	D3	J1	AFPRLPPG#GWPINSS
		TCRD	V3	D3	J1	ALILSSYGGGYAATDKLI
16398	B3	IGH	V2-26	D1-26	J4	ARMTAHWKDQALEDIVGATRRALT
		IGH		D3-16	J4	
		IGH		D1-26	J4	
		TCRG	V11		JP1	ACWTQAGWFKI
15801	B2	TCRG	V4		J1	ATWDGPPENYYKK
		IGH	V3-74		J6	YGMDV
		TCRB	V14		J2-3	ASSPKLRS
		TCRB	V27		J2-5	ASSLTPCHSGDPV
		IGH	V4-34	D1-7	J4	ARKLEL#L
		IGL	V3-25		J1	QSADSSGTYV
13452	B2	IGH	V1-2	D3-22	J5	ITTKGGSTP
		TCRG	V11		J1	ACWIRRIIR
		TCRG	V3		J1	ATWDRGRGLL#E
13630	B2	IGH	V3-33	D2-8	J6	AREKRNLGELGYCTNGVCYTTTTW
		IGH	V3-7	D7-27	J3	ARAGTGDRG#GF#Y
		IGK	V-26		J5	ARCTRSQVT
14006	B	IGL	V3-1		J2	QAWDSSK
		IGK	V1-37		J4	QRTYNAPPRSPLT
		IGH	V3-53	D6-6	J4	ARGGSSSSYFDY
		TCRG	V2		J1	ATWDGPEVR
14108	B	IGL	V2-14		J2	SSYTSSSTPGG
14199	B3	TCRG	V9		J1	ALWRDYYKK
		IGH	V3-30	D6-19	J4	KGDGRLVL#L
		IGH	V1-45	D5-24	J6	ATEENYYYGMDV
14379	B	TCRG	V3		J1	ATWDPQG#E
14501	B3	IGH	V3-23	D2-8	J6	AKDLQGILY#WCMLLLRYGR
		IGH	V3-30	D2-8	J6	ATSKEYCTNGVCYYYYGMDV
		TCRG	V5		J1	ATWD##IIIR
		TCRB	V4-1	D2	J2-5	ASSLAGGGGETQY
		IGL	V3-19		J3	NSRDSSGNHLGV
13603	B	IGK	V2-29		J3	MQGV
		IGH	V4-30	D2-21	J6	AEWGLNCGGDCYSDLLLLRYGR
		TCRD	V3	D3	J1	AFKTARWGIGSDKLI

Примечание. * – указаны V, D и J-сегменты образовавшие перестройку. В случае неполной перестройки локусов IGH, TRB и TRD V-сегмент отсутствует; ** – аминокислотные последовательности CDR3 для каждой перестройки; # – стоп-кодон для неполных перестроек локусов IGH, TRB и TRD последовательность CDR3 не приводится.

сравнению с традиционным подходом. Однако разработка надежной тест-системы для детекции перестроек была ограничена некоторыми методическими сложностями, к которым относятся прежде всего разработка оптимальных смесей олигонуклеотидных праймеров и алгоритм интерпретации результатов секвенирования. В приведенном исследовании разработана и протестирована такая система для детекции клональных перестроек лейкозных клеток при ОЛЛ с использованием высокопроизводительного секвенирования. В отличие от ранее разработанных наборов данная система позволяет детектировать одновременно перестройки всех иммуноглобулиновых локусов, для которых показаны перестройки при ОЛЛ.

Проведенное тестирование системы показало как ее высокую чувствительность, так и достаточно высокую достоверность при сравнении с традиционно используемым аналогом. Дальнейшее развитие данной работы предполагает исследования на большей выборке пациентов и совершенствование программного обеспечения для анализа данных секвенирования. Следующим этапом является создание интегрированной тест-системы, позволяющей проводить не только детекцию перестроек в исходном образце, но и определение непосредственно МОБ в образцах после химиотерапии. Успешная реализация данного проекта приведет к созданию высокопроизводительного метода для высокочувствительного мониторинга МОБ при ОЛЛ.

Финансирование. Исследование было поддержано грантом Министерства образования и науки Российской Федерации, уникальный идентификатор проекта RFMEFI60414X0118.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. van Dongen J.J., van der Velden V.H., Brüggemann M., Orfao A. Minimal residual disease diagnostics in acute lymphoblastic leukemia: need for sensitive, fast, and standardized technologies. *Blood*. 2015; 125(26): 3996–4009.
2. van Dongen J.J., Langerak A.W., Brüggemann M., Evans P.A., Hummel M., Lavender F.L., et al. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia*. 2003; 17(12): 2257–317.
3. Kotrova M., Muzikova K., Mejstrikova E., Novakova M., Bakardjieva-Mihaylova V., Fiser K., et al. The predictive strength of next-generation sequencing MRD detection for relapse compared with current methods in childhood ALL. *Blood*. 2015; 126(8): 1045–7.
4. Wu D., Sherwood A., Fromm J.R., Winter S.S., Dunsmore K.P., Loh M.L., et al. High-throughput sequencing detects minimal residual disease in acute T lymphoblastic leukemia. *Sci. Transl. Med.* 2012; 4(134): 134ra163. doi: 10.1126/scitranslmed.3003656.
5. Wu J., Jia S., Wang C., Zhang W., Liu S., Zeng X., et al. Minimal Residual Disease Detection and Evolved IGH Clones Analysis in Acute B Lymphoblastic Leukemia Using IGH Deep Sequencing. *Front. Immunol.* 2016; 7: 403.
6. Topp M.S., Gökbuget N., Zugmaier G., Degenhard E., Goebeler M.E., Klinger M., et al. Long-term follow-up of hematologic relapse-free survival in a phase 2 study of blinatumomab in patients with MRD in B-lineage ALL. *Blood*. 2012; 120(26): 5185–7. doi: 10.1182/blood-2012-07-441030.
7. Campana D. Minimal residual disease monitoring in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Curr. Opin. Hematol.* 2012; 19(4): 313–8. doi: 10.1097/MOH.0b013e3283543d5c.
8. Clemente M.J., Przychodzen B., Jerez A., Dienes B.E., Afaible M.G., Husseinadeh H., et al. Deep sequencing of the T-cell receptor repertoire in CD8+ T-large granular lymphocyte leukemia identifies signature landscapes. *Blood*. 2013; 122(25): 4077–85. doi: 10.1182/blood-2013-05-506386.
9. Faham M., Zheng J., Moorhead M., Carlton V. E., Stow P., Coustan-Smith E., et al. Deep-sequencing approach for minimal residual disease detection in acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2012; 120(26): 5173–80. doi: 10.1182/blood-2012-07-444042.
10. Ladetto M., Brüggemann M., Monitillo L., Ferrero S., Pepin F., Drandi D., et al. Next-generation sequencing and real-time quantitative PCR for minimal residual disease detection in B-cell disorders. *Leukemia*. 2014; 28(6): 1299–307.
11. Logan A.C., Vashi N., Faham M., Carlton V., Kong K., Buno I., et al. Immunoglobulin and T cell receptor gene high-throughput sequencing quantifies minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia and predicts post-transplantation relapse and survival. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2014; 20(9): 1307–13. doi: 10.1016/j.bbmt.2014.04.018.

Поступила 10.11.16

Принята к печати 22.11.16

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016
УДК 615.382.041

Берковский А.Л., Сергеева Е.В., Суворов А.В., Гурвиц И.Д., Анисимова Е.В., Савченко В.Г.

ПОЛУЧЕНИЕ ЛИОФИЛИЗИРОВАННОЙ ПЛАЗМЫ С СОХРАНЕННОЙ АКТИВНОСТЬЮ ФАКТОРОВ СВЕРТЫВАНИЯ

ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России, 125167, Москва, Россия

Применение лиофилизированной плазмы имеет ряд преимуществ перед свежемороженой плазмой (СЗП) как для оказания трансфузионной помощи в полевых условиях, так и для проведения диагностических исследований системы гемостаза. Выполнение диагностических исследований требует наличия биологических стандартов, плазм-калибраторов и контрольных материалов с высокой стабильностью целевых показателей при хранении лиофилизированных реагентов. Процесс лиофилизации плазмы вызывает значительные изменения коагулологических показателей и сопровождается повышением ее pH. Целью работы являлось получение лиофилизированной плазмы крови человека без выраженных при лиофилизации и хранении изменений активности факторов свертывания крови. Показано, что подкисление пулированной СЗП от не менее 20 доноров перед лиофилизацией до значений pH 7,0–7,1 буферным раствором HEPES в конечной концентрации 50 мМ повышало стабильность факторов системы гемостаза и сохраняло физиологический уровень pH плазмы после лиофилизации. В условиях ускоренного хранения именно такие лиофилизированные плазмы характеризовались большей стабильностью всех определяемых коагулологических показателей. Таким образом, предложенный подход позволяет получать стабильные при хранении лиофилизированные формы диагностических реагентов и контрольных материалов.

Ключевые слова: лиофилизированная плазма; pH; методы стабилизации; факторы свертывания крови; плазм-калибраторы; гемостазиологические стандарты.

Для цитирования: Берковский А.Л., Сергеева Е.В., Суворов А.В., Гурвиц И.Д., Анисимова Е.В., Савченко В.Г. Получение лиофилизированной плазмы с сохраненной активностью факторов свертывания. *Гематология и трансфузиология*. 2016; 61(4): 204–208. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0234-5730-2016-61-4-204-208>