

Министерство науки и высшего образования РФ  
Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение высшего образования  
«**СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ**»  
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии  
Кафедра геномики и биоинформатики

УТВЕРЖДАЮ  
Заведующая кафедрой

\_\_\_\_\_      \_\_\_\_\_  
подпись      инициалы, фамилия  
« \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 20\_\_ г.

**МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ**

Использование молекулярно-генетических маркеров для оценки  
посттрансплантационных осложнений

тема

06.04.01 – Биология  
06.04.01.06 – Геномика и биоинформатика

Руководитель \_\_\_\_\_ доцент, канд. биол. наук Т.Н. Субботина  
подпись, дата      должность, ученая степень

Выпускник \_\_\_\_\_ Д.В. Курочкин  
подпись, дата

Рецензент \_\_\_\_\_ профессор, д-р. мед. наук Ю.И. Гринштейн  
подпись, дата      должность, ученая степень

Красноярск 2022

## АВТОРЕФЕРАТ

Магистерская диссертация по теме «Использование молекулярно-генетических маркеров для оценки посттрансплантационных осложнений» содержит 52 страницы текстового документа, 7 иллюстраций, 6 таблиц и 63 использованных источников.

Ключевые слова: ТРАНСПЛАНТАЦИЯ ПОЧКИ, CF-DNA, DD-CFDNA, ОСТРОЕ ОТТОРЖЕНИЕ, СЫВОРОТОЧНЫЙ КРЕАТИНИН, С-РЕАКТИВНЫЙ БЕЛОК.

Цель работы – оценка количества cf-DNA донора в плазме реципиента.

Исходя из поставленной цели, были сформулированы следующие задачи:

1. Подобрать генетические маркеры для идентификации cf-DNA в плазме реципиента.
2. Разработать тест-систему для количественного определения cf-DNA в плазме реципиента с использованием цифровой ПЦР.
3. Сопоставить полученные результаты количественного определения cf-DNA в плазме реципиента с показателями некоторых биохимических маркеров.

Актуальность диссертационной работы заключается в том, что для мониторинга состояния аллотрансплантата при трансплантации почки, используются неспецифические клинико-лабораторные показатели, которые имеют низкую прогностическую ценность для выявления продолжающегося активного отторжения. Именно недостатки мониторинга состояния пересаженных органов привели к большому интересу к неинвазивным стратегиям выявления повреждения или отторжения трансплантата.

Анализ количества cf-DNA донора был выполнен с использованием 27 образцов плазмы, полученных от трех женщин, которым в 2021 году была проведена трансплантация почки в Федеральном Сибирском научно-клиническом центре ФМБА России г. Красноярск. В ходе проделанной работы были подобраны генетические маркеры для идентификации cf-DNA донора в

плазме реципиента, а также была разработана тест-система с использованием цифровой ПЦР для количественного определения cf-DNA. Результаты количественного определения cf-DNA оказались сопоставимы с показателями некоторых биохимических маркеров.

## **ABSTRACT**

Master's thesis on "Use of molecular genetic markers to assess post-transplant complications" contains 52 pages of text document, 7 illustrations, 5 tables and 63 references.

Key words: TRANSPLANTATION OF THE KIND, CF-DNA, DD-CFDNA, ACUTE REJECTION, SERUM CREATININ, C-REACTIVE PROTEIN.

The aim of this work was to estimate the amount of donor cf-DNA in the recipient's plasma.

On the basis of this aim the following aims were formulated:

1. Select genetic markers to identify cf-DNA in recipient's plasma.
2. To develop a test-system for quantitative determination of cf-DNA in a recipient's plasma using digital PCR.
3. To compare the results of cf-DNA quantification with biochemical markers.

The relevance of the thesis work is that to monitor allograft damage in kidney transplantation, nonspecific clinical and laboratory indicators are used, which have low prognostic value for detecting ongoing active rejection. It is the lack of monitoring of transplanted organs that has led to a great deal of interest in non-invasive strategies to detect graft damage or rejection.

Donor cf-DNA amount analysis was performed using 27 plasma samples obtained from three women who underwent kidney transplantation in 2021 at the Federal Siberian Research and Clinical Centre of FMBA of Russia, Krasnoyarsk. In the course of this work, genetic markers were selected to identify donor cf-DNA in the recipient's plasma, and a test system using digital PCR was developed to quantify cf-DNA. The results of cf-DNA quantification were comparable with biochemical markers.

## СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	6
1 ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ.....	8
1.1 Трансплантация.....	8
1.2 Виды трансплантации.....	9
1.3 Послеоперационная терапия.....	10
1.4 Методы оценки гистосовместимости донора и реципиента.....	12
1.5 Типы острого отторжения и лежащие в его основе патофизиологические механизмы.....	13
1.6 Стандартные биомаркеры острого отторжения.....	15
1.7 Ограничения использования стандартных биомаркеров.....	17
1.8 Современные биомаркеры острого отторжения.....	17
1.9 Бесклеточная ДНК.....	18
1.10 Использование бесклеточной ДНК в диагностике заболеваний.....	19
1.11 Бесклеточная ДНК как маркер приживаемости трансплантата.....	20
1.12 Генетические маркеры для оценки количества dd-cfDNA.....	21
1.13 Ген <i>SRY</i> и его применение в диагностике.....	22
1.14 Использование цифровой ПЦР для количественного анализа.....	24
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	26
2.1 Объект исследования.....	26
2.2 Отделение плазмы из цельной крови.....	26
2.3 Выделение cf-DNA.....	27
2.4 Измерение концентрации cf-DNA.....	29
2.5 Постановка ddPCR.....	30
2.6 Анализ биохимических показателей.....	30
2.7 Выделение геномной ДНК.....	30
2.8 Анализ SNP.....	32
РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	35
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	36
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	37
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	38

## ВВЕДЕНИЕ

Трансплантация почки – один из лучших вариантов лечения пациентов с терминальной стадией болезни [1]. Успешная аллотрансплантация почки улучшает качество жизни и увеличивает выживаемость пациентов по сравнению с длительным диализом [2]. Однако отторжение аллотрансплантата остается серьезной проблемой для пациентов с трансплантацией почки [3].

Золотым стандартом мониторинга состояния трансплантатов твердых органов традиционно является биопсия. Биопсия может быть выполнена при подозрении на патологию трансплантата, показанную клинически, или в рамках обычного протокола мониторинга. Однако биопсия представляет собой инвазивную процедуру, которая неудобна для пациентов, к тому же около 25% образцов биопсии непригодны к использованию.

Помимо этого, для мониторинга повреждения аллотрансплантата при трансплантации почки, используются такие клиничко-лабораторные показатели как уровень сывороточного креатинина, наличие протеинурии, уровень донор-специфических антител, скорость клубочковой фильтрации [4,5,6]. Хотя уровень сывороточного креатинина и скорость клубочковой фильтрации остаются основой для оценки функции почечного аллотрансплантата, мониторинг динамики данных показателей имеет низкую прогностическую ценность для выявления продолжающегося активного отторжения.

Именно недостатки мониторинга пересаженных органов привели к большому интересу к неинвазивным стратегиям выявления повреждения или отторжения трансплантата.

Один из предложенных способов обнаружения повреждения трансплантата заключается в измерении количества бесклеточной ДНК донора (dd-cfDNA) в плазме или моче реципиента [7,8].

По мере разрушения клеток донорского аллотрансплантата нуклеиновые кислоты становятся фрагментированными, в результате чего dd-cfDNA размером примерно 120-160 пар оснований высвобождаются в кровь и выводятся из крови печенью и почками с периодом полураспада около 30 мин

[9]. Считается, что механизмы высвобождения бесклеточной ДНК (cf-DNA) в кровотоки являются результатом нескольких возможных механизмов, включая гибель клеток в результате апоптоза или некроза, в дополнение к активной секреции различными активированными клетками иммунной системы [10,11,12,13,14].

dd-cfDNA обычно имеет низкую концентрацию, всего несколько тысяч геномных копий / мл [15] и составляет <1% от всей внеклеточной ДНК, когда нет активного повреждения аллотрансплантата [8]. Однако во время отторжения аллотрансплантата значительно большее количество dd-cfDNA высвобождается из поврежденного аллотрансплантата в кровотоки [9]. Раннее повышение уровня общей dd-cfDNA во время острого отторжения аллотрансплантата наблюдалось у реципиентов с трансплантацией почки [10,16]. Эти наблюдения подтвердили предпосылку возможности количественного измерения и интерпретации dd-cfDNA как инструмента для оценки относительного состояния аллотрансплантата и диагностики возможных осложнений. [7,8,15,17,18].

Цель работы – оценка количества cf-DNA донора в плазме реципиента.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

1. Подобрать генетические маркеры для идентификации cf-DNA в плазме реципиента.
2. Разработать тест-систему для количественного определения cf-DNA в плазме реципиента с использованием цифровой ПЦР.
3. Сопоставить полученные результаты количественного определения cf-DNA в плазме реципиента с показателями некоторых биохимических маркеров.

# **1 ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ**

## **1.1 Трансплантация**

Трансплантация органов – это изъятие органов или мягких тканей у донора и передача их реципиенту [1]. Для проведения трансплантации необходимы веские причины: пересадка органов и тканей может быть осуществлена только в том случае, когда другие медицинские средства не могут гарантировать сохранения жизни реципиента или восстановления его здоровья. Основными показаниями к проведению операции являются неизлечимые заболевания, патологии и дефекты, не поддающиеся лечению терапевтическими и хирургическими методами, которые угрожают жизни пациента.

Если акцентировать внимание на трансплантации почки, то помимо низких показателей, определяющих качество жизни, пациенты на заместительной диализной терапии имеют значительно меньшую прогнозируемую продолжительность жизни. Так, пациенты, получающие гемодиализ в возрасте 40-59 лет, живут в среднем на 11 лет меньше по сравнению с теми, кому выполнена трансплантация [2]. Для больных, находящихся в возрастной группе 20-39 лет эта разница составляет уже 17 лет. Прогрессирующий дефицит донорских органов привел к тому, что с целью увеличения количества проводимых операций в последнее время повсеместно наблюдается тенденция к развитию прижизненного донорства.

Трансплантация органов имеет множество противопоказаний из-за наличия заболеваний, которые могут усугубиться в результате проведения операции и представлять угрозу жизни пациента, в том числе привести к смерти. Абсолютные противопоказания включают в себя: инфекционные заболевания в других органах наравне с теми, которые планируют заменить, в том числе наличие туберкулеза, СПИДа; нарушение функционирования жизненно важных органов, поражение ЦНС; раковые опухоли; наличие пороков развития и врожденных дефектов, не совместимых с жизнью.



## 1.2 Виды трансплантации

В зависимости от источника и вида пересаживаемых трансплантатов различают 6 видов трансплантации [19,20]:

1. Аутотрансплантация (аутологическая трансплантация) – реципиент трансплантата является донором для самого себя, например, трансплантация кожи с неповреждённых участков при тяжёлых ожогах. Аутотрансплантация обеспечивает истинное приживание пересаживаемого субстрата, так как не возникает иммунологического конфликта в виде реакции отторжения трансплантата. По этому признаку аутотрансплантация на сегодняшний день является самым совершенным видом трансплантации.

2. Изотрасплантация – донором трансплантата является генетически и иммунологически 100% соответствующий реципиенту однояйцевый близнец реципиента.

3. Аллотрансплантация (гетерологичная трансплантация) – донором трансплантата является генетически и иммунологически чуждый организм. Существенное значение для аллотрансплантации имеет преодоление тканевой несовместимости тканей донора и реципиента.

4. Ксенотрансплантация (межвидовая) – трансплантация органов от животного другого биологического вида человеку. В современной хирургии пересадка органов и тканей животных человеку – наиболее проблемный вид трансплантации. Главным препятствием для использования донорских органов и тканей от разных животных является выраженная тканевая иммунная несовместимость, приводящая к отторжению ксенотрансплантатов организмом реципиента. Поэтому пока не решена проблема тканевой несовместимости, клиническое применение ксенотрансплантатов ограничено.

5. Эксплантация (протезирование) – пересадка неживого небиологического субстрата (эндопротезы).

6. Реплантация – хирургическая операция по приживлению отделенного при травме участка ткани, органа или конечности на прежнее место.

По месту имплантации органа все трансплантации делят на два вида [19,20]:

1. Ортотопическая трансплантация. Донорский орган имплантируют на то же место, где находился соответствующий орган реципиента. Так осуществляют пересадку сердца, лёгких, печени.

2. Гетеротопическая трансплантация. Донорский орган имплантируют не на место нахождения органа реципиента, а в другую область. Причём неработающий орган реципиента может быть удалён, а может и находиться на своём обычном месте. Гетеротопическую трансплантацию выполняют при пересадке почки, органной пересадке поджелудочной железы.

### **1.3 Послеоперационная терапия**

После проведения трансплантации для предотвращения отторжения необходимо назначение иммуносупрессивной терапии.

Начальная иммуносупрессия охватывает первые 3 месяца после трансплантаций, для которых характерны неустойчивая функция трансплантата и повышенная аллореактивность с максимальной вероятностью кризов отторжения. Задачей иммуносупрессии в этот период является предупреждение и лечение раннего отторжения при минимальном риске дополнительных повреждений уже исходно пострадавшего в результате ишемии или реперфузии донорского органа. Тактика иммуносупрессивной терапии также должна быть направлена на снижение риска других серьезных, в первую очередь, инфекционных осложнений. Начальная иммуносупрессия состоит из индукционной и базисной (обязательной) терапии [21].

Поддерживающая иммуносупрессия может быть разделена на два подпериода. Первый из них, относительно короткий (до 1 года), может быть обозначен как период ранней поддерживающей терапии, когда постепенно планомерно снижаются дозы иммунодепрессантов. Второй – период продолжающейся на протяжении всего срока функционирования пересаженной почки поддерживающей иммуносупрессии, когда уровень иммуносупрессии

относительно стабилен и достаточен для предупреждения отторжения при минимизации риска ее осложнений [21]. В этот период в связи с развитием дисфункции трансплантата может потребоваться изменение режима иммуносупрессии.

Однако ни один из применяемых режимов иммуносупрессии не исключает развития отторжения, вероятность которого наиболее высока в первые 3 месяца после трансплантации. Острое отторжение представляет собой результат иммунного ответа реципиента на антигены донора. Выделяют сверхострое (на операционном столе), раннее острое (в течение 1 нед.), острое (в течение 3 мес.) и хроническое (отсроченное во времени) отторжение. Современным стандартом признается частота острого отторжения в течение первого года не более 10-20%, а годовое выживание трансплантата – не менее 90%. Субклиническое отторжение, выявляемое при протокольных биопсиях, достигает 9% к 6 месяцам после трансплантации. Последний показатель строго взаимосвязан с развитием хронического отторжения, поэтому достаточный уровень иммуносупрессии в течение 1 года после трансплантации является наилучшей мерой профилактики хронического отторжения, включая гуморальное [21].

Гистологические признаки рецидива исходного заболевания нередко отмечаются в трансплантатах. Несмотря на возможность рецидивирования некоторых заболеваний почек, суммарный 10-летний риск потери трансплантата от возвратного заболевания не превышает 10%.

Снижение ранней и отдаленной смертности после трансплантации почки сегодня является в большой степени результатом понимания того, когда следует минимизировать или прекратить иммуносупрессию даже ценой потери трансплантата. Прекращение иммуносупрессии может быть необходимым у пациентов с инфекцией или опухолями. Пациентов с прогрессивно ухудшающейся функцией трансплантата, несмотря на проведенное в полном объеме лечение отторжения, лучше вернуть на диализ, удалив трансплантат, и

поставить в лист ожидания нового трансплантата. Если трансплантат не удаляется, нужно постепенно редуцировать иммуносупрессию [21].

При появлении патологических проявлений со стороны нефункционирующего трансплантата рекомендуется незамедлительно выполнить нефрэктомия. Нефрэктомия – хирургическое вмешательство, к которому прибегают, если функциональность или анатомическое строение органа настолько нарушено, что восстановить их не представляется возможным. Принимая решение об удалении органа, хирург руководствуется многими факторами – общим состоянием пациента, наличием проблем с функциональностью другой почки, возможностью распространения патологического процесса на близлежащие органы и системы [21].

#### **1.4 Методы оценки гистосовместимости донора и реципиента**

На данный момент успешность операций связана с правильным подбором генов иммунного ответа (ГИО) человека и их белковых продуктов антигенов тканевой совместимости (HLA). Установлено, что системы HLA или ГИО представляют собой наиболее полиморфную систему генов, включающую более 10 тыс. аллельных вариантов, которые неравномерно распределены среди отдельных этнических групп. Основное положение современной трансплантологии заключается в необходимости поиска максимально совместимых пар донор-реципиент по ГИО и их белковым продуктам HLA-антигенам, поскольку подавление иммунного ответа реципиента на несовместимые HLA-антигены донора с помощью иммунодепрессивных препаратов неминуемо ведет к угнетению противои инфекционного иммунитета реципиента. Результатом последнего является развитие тяжелых, в том числе летальных, осложнений [22].

HLA обеспечивает и контролирует почти все этапы иммунного ответа организма человека. Как известно, HLA – это высокополиморфная структура, включающая 3 класса генов (I, II, III), которые состоят из нескольких локусов. Кроме того, для каждого локуса существуют тысячи аллельных вариантов [23].

Такое разнообразие аллельных вариантов обуславливает индивидуальность набора аллелей генов HLA у каждого человека, а также необходимость подбора биологически совместимого донора для реципиента перед проведением трансплантации. Причем благоприятным исходом является наибольшее совпадение по аллелям HLA [23].

Согласно руководству по диагностическому лабораторному обеспечению трансплантации солидных органов всем донорам и реципиентам проводят HLA-типирование по локусам I и II классов HLA-A, HLA-B, HLA-DR [23]. HLA-типирование проводится с помощью метода ПЦР-SSR на наборах низкого разрешения. Детекция осуществляется методом электрофореза в 2% агарозном геле.

### **1.5 Типы острого отторжения и лежащие в его основе патофизиологические механизмы**

Эпизоды острого отторжения наиболее распространены в первые недели после трансплантации [24]. Их можно разделить на Т-клеточно-опосредованное (TCMR) и антитело-опосредованное (ABMR) отторжение. При TCMR лимфоциты инфильтрируют и пролиферируют в интерстициальном пространстве. Лимфоциты могут вызывать цитотоксическое воздействие на эпителиальные клетки почечных канальцев, тем самым вызывая тубулит. Отторжение сосудов выявляется, когда мононуклеарные клетки проникают в артерии, вызывая тем самым артериит и, в конечном итоге, тяжелый трансмуральный некроз кровеносных сосудов.

Адаптивная иммунная система играет центральную роль в TCMR (Рисунок 1).

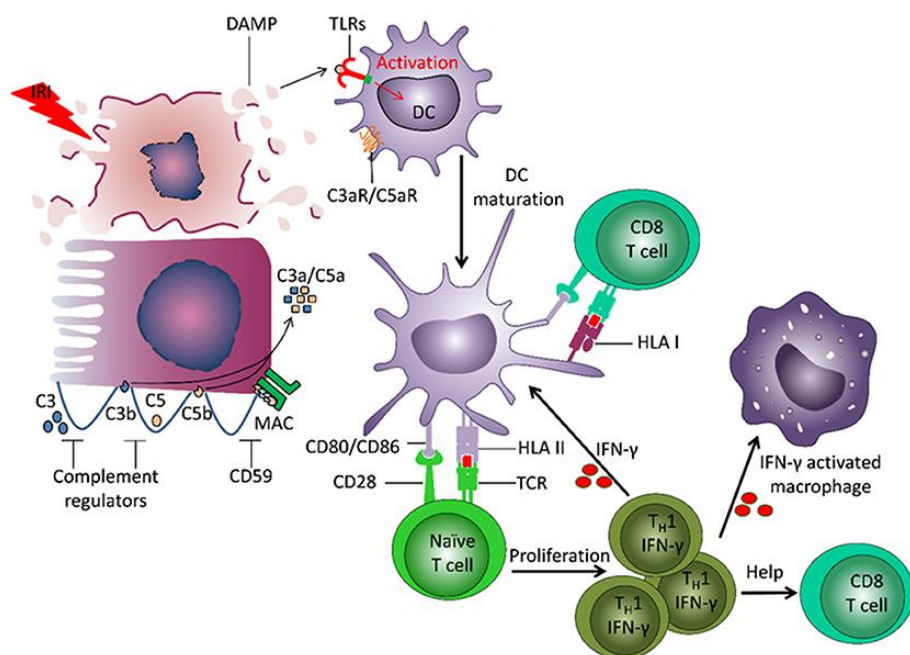


Рисунок 1 – Вовлечение врожденного и адаптивного иммунитета в развитие повреждения трансплантата [25]

Прямое аллораспознавание опосредовано взаимодействием между Т-клеточным рецептором (TCR) на Т-клетках реципиента и несовпадающими антигенами лейкоцитов человека на антигенпрезентирующих клетках донора. Косвенное аллораспознавание также играет определенную роль. Взаимодействие HLA/пептид-TCR и сигналы ко-стимуляции способствуют пролиферации и дифференцировке Т-клеток. CD8<sup>+</sup> Т-клетки выделяют перфорин и гранзим В, которые вызывают апоптоз клеток-мишеней [26]. Моноциты и миелоидные DCs также инфильтрируют трансплантат и способствуют острому отторжению [27].

ABMR отторжение может наблюдаться в течение первого года после трансплантации [28]. ABMR отторжение опосредованно донор-специфическими антителами, которые нацелены на HLA- или не-HLA-антигены на эндотелии донора. Взаимодействие антиген-антитело приводит к антителозависимой клеточной цитотоксичности и активации комплемента, вызывая лизис клеток-мишеней. Повреждение эндотелиальных клеток приводит к агрегации тромбоцитов и привлечению лейкоцитов с помощью

цитокинов, хемокинов и хемоаттрактантов, что в свою очередь может привести к острому отторжению [29].

## **1.6 Стандартные биомаркеры острого отторжения**

Мониторинг пациентов с трансплантацией почки является важной частью посттрансплантационного лечения [30]. Концентрация сывороточного креатинина является наиболее известным и наиболее часто используемым маркером для оценки функции почек, данный маркер был впервые описан в 1937 г. [31]. Креатинин является продуктом распада креатинфосфата в мышечной ткани, вырабатывается с относительно постоянной скоростью, в зависимости от мышечной массы, фильтруется в клубочках почечных телец, и активно секретруется в проксимальных канальцах [32]. Канальцевая секреция в норме способствует выведению креатинина почками на 10%, но увеличивается при снижении скорости клубочковой фильтрации (СКФ), в результате чего концентрация сывороточного креатинина остается в пределах нормы до тех пор, пока СКФ не упадет ниже 60-70 мл/мин [33]. Некоторое количество креатинина также поступает из пищи. Употребление мяса вносит существенный вклад в экскрецию креатинина с мочой как в результате увеличения общего пула креатина, так и в результате желудочно-кишечной абсорбции [32].

При трансплантации почки существуют другие детерминанты, которые могут влиять на метаболизм креатинина, такие как кортикостероиды, которые обладают прямым катаболическим эффектом [34] и вызывают изменение соотношения мышечной массы к общей массе тела [35].

Канальцевая секреция креатинина может быть заблокирована некоторыми препаратами, такими как триметоприм, обычно используемый при трансплантации почки [36]. Кроме того, хроническое отторжение и острый канальцевый некроз могут способствовать снижению канальцевой секреции креатинина.

Измерение уровня сывороточного креатинина рекомендуется в качестве скринингового теста для выявления изменений в функции аллотрансплантата [37], коррекции иммуносупрессивных препаратов [38]. Также было показано, что сывороточный креатинин сам по себе может быть предиктором долгосрочной выживаемости трансплантата и пациента [39]. В соответствии с рекомендациями KDIGO (Kidney Disease Improving Global Outcomes) острая почечная недостаточность определяется как повышение уровня креатинина в сыворотке  $>0,3$  мг/дл в течение 48 часов, процентное увеличение креатинина в сыворотке на  $\geq 50\%$  (в 1,5 раза по сравнению с исходным уровнем) или снижение диуреза (олигурия  $<0,5$  мл/кг/ч более 6 часов) [25].

Также рекомендуется проводить скрининг на полиомавирус и вирус Эпштейна-Барр в течение первых 3 месяцев после трансплантации. Выполнение биопсии почки необходимо в случае необъяснимого повышения уровня креатинина в сыворотке крови.

В классификации отторжения аллотрансплантата Banff имеются стандартизированные критерии для гистологической диагностики острого отторжения, оценивая таким образом воспаление в различных почечных компартментах [40]. Поражения микроциркуляции, а также отложение белка C4d в перитубулярных капиллярах и специфические донорские антитела в сыворотке крови пациента указывают на острое отторжение.

Рутинные иммунологические лабораторные тесты применяются для определения иммунологической сенсibilизации пациента и оценки риска неблагоприятного исхода трансплантации. Тест на комплемент-зависимую цитотоксичность проводится перед трансплантацией, введение данного теста привело к значительному снижению частоты возникновения острого отторжения [41]. Аналогичным образом, скрининг на аллоантитела HLA до трансплантации помогает оптимизировать выбор донора. Посттрансплантационный скрининг на HLA-аллоантитела используется для определения типа острого отторжения и помогает установить возможное влияние антител на функцию трансплантата.



## **1.7 Ограничения использования стандартных биомаркеров**

Изменения уровня креатинина в сыворотке крови не являются специфичными для повреждения трансплантата: изменение уровня может указывать на внутренний почечный процесс, такой как острое отторжение или инфекция трансплантата [30]. Кроме того, процесс острого отторжения включает различные стадии, при этом клинические признаки повреждения трансплантата появляются на поздних стадиях, после стадии субклинического повреждения [42].

Проведение биопсии может привести к осложнениям у реципиента [3]. Помимо этого, для всех процедур биопсии требуется госпитализация. Это в свою очередь делает данную процедуру дорогостоящей.

Таким образом, существует необходимость в альтернативных, менее инвазивных, но чувствительных маркерах для диагностики острого отторжения трансплантата. Выявление и валидация биомаркеров, которые коррелируют с острым отторжением или предсказывают его наличие, могут улучшить принятие терапевтических решений [43].

## **1.8 Современные биомаркеры острого отторжения**

Во многих исследованиях изучают молекулы, которые, как ожидается, играют важную роль в патофизиологии отторжения. Многие исследовательские группы изучали общие подмножества иммунных клеток (Т-клетки, В-клетки, моноциты), а также иммунную активацию с помощью хемокинов CXCL9 и CXCL10, иммунный эффекторный путь цитотоксических Т-клеток (гранзим В, перфорин, FasL) и специфическую для донора реактивность по количеству Т-клеток, вырабатывающих IFN $\gamma$  в ответ на аллогенные донорские клетки [44].

Также во многих исследованиях изучались молекулы, которые в более общем плане отражают повреждение почечной паренхимы: молекула повреждения почек 1, нейтрофильный желатиназа-ассоциированный липокалин и бесклеточная ДНК [45,46,7,8].

## 1.9 Бесклеточная ДНК

Внеклеточные нуклеиновые кислоты встречаются повсеместно – в биологических жидкостях и различных средах, включая почву и водные биотопы. Однако совсем недавно исследования показали, что определенные типы внеклеточной ДНК могут играть достаточно важную роль в живом организме и указывать на патологические состояния. Бесклеточная ДНК, относится ко всем неинкапсулированным ДНК в кровотоке и впервые была обнаружена в плазме крови в 1948 году у здоровых людей [47].

Бесклеточная ДНК представляет собой около 150 п. н. двухцепочечной ДНК, которая высвобождается из нуклеосом во время апоптоза и некроза. Молекулы cf-DNA находятся в виде мономеров, димеров и тримеров. Большая часть cf-DNA циркулирует в виде нуклеосомы или хроматосомы, поскольку свободная ДНК уязвима к быстрой деградации нуклеазами. Важной характеристикой cf-DNA является период ее полураспада в кровяном русле (30 минут – 2 часа), что может свидетельствовать о процессе непрерывного высвобождения из апоптотических или некротических клеток [47].

Существует множество разновидностей cf-DNA, самыми важными из которых являются бесклеточная митохондриальная ДНК, опухолевая и фетальная, однако все они обладают схожими свойствами. Концентрации cf-DNA варьируются как в нормальных физиологических условиях (7-18 нг/мл у здоровых людей), так и при диагностированных заболеваниях (800 нг/мл у больных раком пищевода) [47].

Первоначальное открытие бесклеточной ДНК в 1948 году Манделем и Метаисом привело к многочисленным исследованиям, оценивающим роль cf-DNA в различных заболеваниях [48]. Изначально бесклеточная ДНК применялась для исследования онкомаркеров у онкологических больных, однако наиболее успешным применением cf-DNA в качестве клинического биомаркера является неинвазивное пренатальное тестирование (НИПТ) для выявления патологий плода, поскольку показывает более высокую точность в сравнении, например, с биохимическим скринингом. В последнее время

интерес к бесклеточной ДНК увеличился в сфере трансплантологии, поскольку определение количества бесклеточной ДНК в плазме или моче пациента может помочь в определении раннего отторжения пересаженного органа [49].

### **1.10 Использование бесклеточной ДНК в диагностике заболеваний**

После обнаружения cf-DNA в крови человека были предприняты попытки выяснить связь между патологическими состояниями и уровнем бесклеточной ДНК. Для определения возможности использования cf-DNA в клинической диагностике была определена концентрация ДНК в крови при различных заболеваниях (вирусные, аутоиммунные, онкологические, травматические, радиационные поражения). Было выявлено, что уровень cf-DNA сильно возрастает при облучении радиацией, травматических поражениях и аутоиммунных заболеваниях, а при вирусных патологиях уровень бесклеточной ДНК остается относительно невысоким, поэтому прогностическую значимость может иметь лишь сравнение уровней cf-DNA в динамике [50].

Одним из наиболее успешных исследованных методов является измерение cf-DNA у онкологических больных, поскольку уровни cf-DNA повышаются уже на ранней стадии заболевания [51].

В 1997 году была найдена фетальная бесклеточная ДНК в плазме и сыворотке беременных женщин, что поспособствовало изучению ДНК плода в качестве потенциального маркера для неинвазивной пренатальной диагностики. Одни из первых работ были направлены на обнаружение последовательностей Y-хромосомы для установления пола ребенка, а также на устранение резус-конфликта. В настоящее время одной из важнейших функций НИПТ является ранняя диагностика хромосомных заболеваний плода и принятие мер, направленных на устранение найденной проблемы. Так, например, при вынашивании плода с Синдромом Дауна, уровень фетальной ДНК в плазме и сыворотке крови матери увеличивается в 2 раза [52].

Другой важной областью клинического применения анализа cf-DNA является мониторинг эффективности трансплантации органов. В основе

подхода лежит предположение о том, что во время повреждения пересаженного органа значительно большее количество dd-cfDNA из разрушенных клеток аллотрансплантата высвобождается в кровотоки [9].

### **1.11 Бесклеточная ДНК как маркер приживаемости трансплантата**

При отторжении трансплантата из-за разрушения его клеток в общий кровоток начинает выделяться dd-cf-DNA, что приводит к увеличению ее количества в организме реципиента. Раннее повышение уровней dd-cfDNA наблюдается у пациентов во время острого нарушения функции трансплантата, что подтверждает предположение о возможном использовании измерения количественных уровней dd-cfDNA в качестве альтернативного маркера отторжения органа.

В некоторых исследованиях говорится о временном повышении уровней dd-cfDNA в раннем посттрансплантационном периоде, однако, у стабильных пациентов, принимающих иммуносупрессивную терапию, этот показатель снижается до исходных значений примерно на 7-10 день после трансплантации [48]. Причем значение уровней dd-cfDNA и скорость их снижения зависит от типа пересаженного органа: так, более высокие значения наблюдаются у реципиентов легких и печени, что, по-видимому, связано с большей массой пересаженных клеток; скорость снижения количества донорской бесклеточной ДНК у пациентов после трансплантации сердца происходит медленнее, чем, например, после пересадки печени [53].

В целом, исследования показывают, что уровни донорской бесклеточной ДНК имеют высокие показатели точности и могут предсказать острое отторжение пересаженного органа, причем способность к прогнозированию оказывается одинаковой для всех типов органов [48]. При этом наиболее высокие показатели cf-DNA наблюдаются при остром отторжении трансплантата, опосредованном антителами.

В нескольких исследованиях сравнивалась dd-cfDNA с другими маркерами повреждения трансплантата [7]. Он превосходит стандартные

биохимические показатели как в почках (сывороточный креатинин), так и в печени (аминотрансферазы), причем уровни dd-cfDNA повышаются раньше и обеспечивают лучшее распознавание при остром отторжении.

Методы, используемые для количественного определения dd-cfDNA у реципиента в плазме, включают полимеразную цепную реакцию (ПЦР) в реальном времени [54], капельную цифровую ПЦР (ddPCR) [55] и массовое параллельное секвенирование [7], также известное как секвенирование следующего поколения (NGS). ddPCR и NGS требуют генотипирования донора, они оценивают наличие одного нуклеотидного полиморфизма, при котором реципиент гомозиготен по определенному аллелю, а донор – нет.

### **1.12 Генетические маркеры для оценки количества dd-cfDNA**

По данным зарубежной литературы, для количественной оценки dd-cfDNA используют ddPCR с помощью ряда генетических маркеров, например, обнаружение HLA [54].

Во многих исследованиях использовались информативные однонуклеотидные полиморфизмы, которые присутствуют у донора, но не у реципиента. Однонуклеотидный полиморфизм (SNP) – отличия последовательности ДНК размером в один нуклеотид (А, Т, G или С) в геноме (или в другой сравниваемой последовательности) представителей одного вида или между гомологичными участками гомологичных хромосом [56]. Поскольку количество SNPs в человеческом геноме исчисляется миллионами, необходимо найти полиморфизмы с высокой частотой минорных аллелей (MAF) 0,4-0,5. Основываясь на расчетах равновесия Харди–Вайнберга, SNP с MAF от 0,4 до 0,5 имеет почти равное распределение обоих аллелей в данной популяции и, следовательно, имеет вероятность 11,5-12,5% наличия другого (гомозиготного) генотипа у двух особей этой популяции (например, донора и реципиента) [56].

Следовательно, набора из 30-35 SNPs достаточно, чтобы идентифицировать по меньшей мере 3 информативных однонуклеотидных

полиморфизма для каждой пары донор-реципиент, которые можно использовать в дальнейшем анализе [56].

Наиболее простым методом, используемым в исследованиях, является обнаружение повтора Y-хромосомы гена *SRY* [57]. Для женщин-реципиентов мужских органов относительно просто идентифицировать специфичную для донора cf-DNA с помощью молекулярных анализов, нацеленных на гены Y-хромосомы. Однако, несмотря на простоту обнаружения и отсутствие необходимости в донорском материале для генотипирования, это ограничивает количественную оценку dd-cfDNA небольшой долей реципиентов трансплантата, поэтому не подходит для широкого использования.

### 1.13 Ген *SRY* и его применение в диагностике

*SRY* (Sex-determining region Y protein) расположен на Y-хромосоме и функционирует как активатор транскрипции, модулирующий развитие яичек [58]. Ген *SRY* не имеет интронов и локализован на коротком плече Y-хромосомы, в области Yp11.3 (точнее, от 2 655 792 до 2 654 896 пары оснований на коротком плече Y-хромосомы). Его единственный экзон состоит из 897 пар нуклеотидов. Расположение гена *SRY* на Y-хромосоме представлено на рисунке 2.

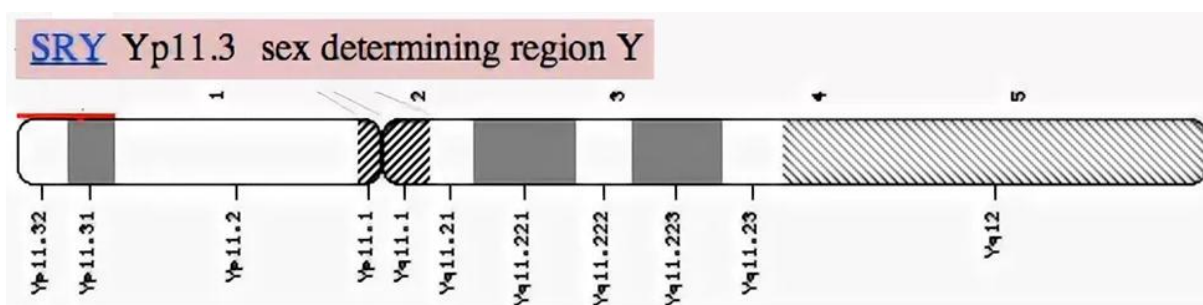


Рисунок 2 – Расположение гена *SRY* на Y-хромосоме [58]

Предполагается, что *SRY* развился до фактического формирования Y-хромосомы примерно 300 миллионов лет назад из-за дублирования гена фактора транскрипции *SRY* (*SOX3*), что привело к появлению первичного определителя пола, присутствующего сегодня у млекопитающих [59].

*SRY* является членом семейства *SOX* транскрипционных факторов развития. Как и другие *SOX*-белки, белок *SRY* имеет сигнатурную последовательность, состоящую из 79 аминокислот, известную как домен HMG, который позволяет связываться с подобной консенсусной последовательностью ДНК [60].

*SRY* отвечает за инициирование процесса определения пола у мужчин. Определение пола у мужчин и сперматогенез контролируются генами, расположенными на Y-хромосоме. Белок *SRY* играет ключевую роль в инициировании каскада мужской дифференцировки и предотвращает развитие женских репродуктивных структур [58].

Основная функция *SRY* – индуцировать дифференцировку клеток Сертоли. Точнее, *SRY* индуцирует дифференцировку пре-Сертолиевых клеток, которые становятся Сертолиевыми клетками, в семенных канатиках. Модель определения пола представлена на рисунке 3.

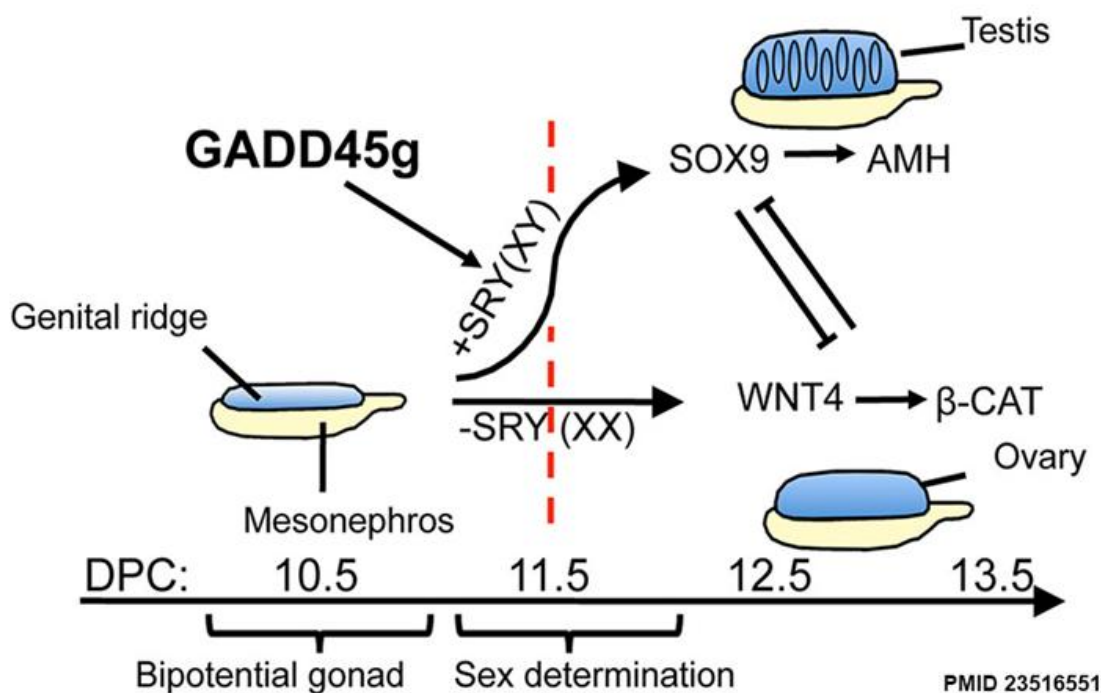


Рисунок 3 – Модель определения пола [61]

Экспрессия гена *SRY* индуцирует экспрессию *SOX9*, дифференцировку клеток Сертоли и формирование яичного шнура. У мужчин антимюллеров гормон индуцирует регрессию мюллеровского протока, а тестостерон

индуцирует дифференцировку вольфовского протока в семявыносящие протоки, семенные пузырьки и придатки яичка.

Мутации в гене *SRY* могут привести к появлению женского организма с генотипом XY (синдром Свайера). Транслокация части Y-хромосомы, содержащей этот ген, на X-хромосому приводит к появлению мужского организма с генотипом XX.

Ген *SRY* является одним из наиболее специфичных маркеров на Y-хромосоме, поэтому его использование может быть целесообразно для диагностики уровней cf-DNA в крови реципиента.

#### **1.14 Использование цифровой ПЦР для количественного анализа**

Обнаружение и количественное определение специфических последовательностей нуклеиновых кислот с помощью ПЦР имеет основополагающее значение для большого объема исследований и растущего числа молекулярных диагностических тестов. Первое поколение пользователей ПЦР выполняло анализ по конечной точке методом гель-электрофореза для получения качественных результатов. Появление real-time ПЦР породило второе поколение, которое позволило проводить количественную оценку путем мониторинга прогрессирования амплификации после каждого цикла с использованием флуоресцентных зондов [62].

По сравнению с одиночными реакциями, мультиплексирование не только увеличивает число мишеней, измеряемых в одиночных реакциях, но и уменьшает количество клинического материала, требуемого для проведения исследования множества однонуклеотидных полиморфизмов, путем измерения более одной мишени в одной реакции. Это свойство особенно важно при исследовании в плазме внеклеточных ДНК, когда при всех различиях присутствуют примерно 1000 геномных эквивалентов на 1 мл крови, и это позволяет в достаточной мере разводить пробу для анализа ДНК [63].

Цифровая ПЦР – усовершенствованный метод ПЦР, который может быть использован для количественного определения продуктов амплификации



нуклеиновых кислот. Основное различие между ddPCR и традиционной ПЦР заключается в методе измерения количества нуклеиновых кислот, причем метод цифровой ПЦР является наиболее точным.

Традиционный метод ПЦР проводит только одну реакцию на один образец, в то время как при использовании ddPCR образец разделяется на большое количество фракций, в каждой из которых осуществляется независимая реакция. Увеличение числа фракций повышает точность и, следовательно, позволяет увидеть даже небольшие различия в концентрациях между последовательностями нуклеиновых кислот [63].

Подобно количественной ПЦР, ddPCR использует два основных типа химических веществ для обнаружения нуклеиновых кислот: интеркалирующие красители двухцепочечной ДНК и зонды. Оба метода обнаружения генерируют флуоресцентный сигнал, пропорциональный количеству ДНК. При взаимодействии с двухцепочечной ДНК ДНК-связывающие красители стабилизируются в возбужденном состоянии, что приводит к сильной флуоресценции. ДНК-связывающие красители неспецифичны и взаимодействуют с двухцепочечными молекулами ДНК независимо от их последовательности. В отличие от этого, зонды, в основе которых процесс гидролиза, являются специфичными для последовательности.

В настоящее время в коммерчески доступных цифровых системах ПЦР используются два подхода. Первый подход использует микролунки или микрожидкостные камеры для разделения образца на сотни нанолитровых перегородок. Микрофлюидные чипы упрощают настройку реакции, но их сложно масштабировать для достижения высокой производительности. Второй подход основан на цифровой капельной ПЦР.

## **2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

### **2.1 Объект исследования**

В работу включено 23 пациента, из них 9 доноров и 14 реципиентов, которым в 2021-2022гг в Федеральном Сибирском научно-клиническом центре ФМБА России (г. Красноярск) была проведена операция по трансплантации почки. На основании предварительной оценки совместимости доноров и реципиентов было сформировано 14 пар донор-реципиент, из них 5 пар, где донор-мужчина, а реципиент-женщина; 1 пара – донор-женщина и реципиент-женщина; 1 пара – донор-женщина, а реципиент-мужчина; 7 пар донор-мужчина и реципиент-мужчина.

Выполнение работы предполагает использование двух подходов. Первый может быть использован только для случаев, в которых донор – мужчина, а реципиент – женщина и подразумевает использование специфической последовательность гена *SRY* для выявления мужской dd-cfDNA в плазме женщины. Вторым подход применим для всех случаев донор-реципиент и подразумевает предварительное проведение генотипирования с целью поиска таких SNP, по которым донор и реципиент имеют разные аллельные варианты в гомозиготном состоянии.

На данном этапе работы, в соответствии с первым подходом, объектом исследования являлась cfDNA и геномная ДНК, полученная от 3 реципиентов из 5 вышеобозначенных пар, в которых донор – мужчина, а реципиент – женщина.

Также, в соответствии со вторым подходом объектом исследования являлась геномная ДНК от остальных 10 пар донор-реципиент.

### **2.2 Отделение плазмы из цельной крови**

Забор крови у реципиентов осуществлялся по следующей схеме: 3 раза в неделю первые 2 недели после операции, в дальнейшем один раз в неделю до выписки пациента из больницы.

Для отбора крови использовался 1 вакутейнер объемом 8 мл с сиреневой крышкой (содержащий EDTA в качестве антикоагулянта). После отбора крови вакутейнер несколько раз (6-8) мягко переворачивали (избегая встряхивания) для смешивания крови с антикоагулянтом. После этого вакутейнеры помещали вертикально в штатив и хранили при комнатной температуре до момента отделения плазмы. Отбор плазмы осуществляли по следующей схеме:

1. Для отделения плазмы от форменных элементов вакутейнеры центрифугируйте 15 минут в центрифуге при ускорении  $2500\times g$  при комнатной температуре.

2. Медленно, не дергая поршень автоматической пипетки (на 1мл) отберите полученную плазму (2 мл).

3. Перенесите плазму в чистую пробирку на 2 мл. Повторно центрифугируйте отобранную плазму в течение 15 мин при  $2500\times g$  при комнатной температуре.

4. Медленно отберите плазму, оставив некоторое количество плазмы (около 100 мкл) над осадком, перенесите плазму в чистую пробирку на 2 мл.

5. Пробирку с оставшейся клеточной массой заморозьте и храните при  $-70^{\circ}\text{C}$ .

### **2.3 Выделение cf-DNA**

cf-DNA из 2 мл плазмы крови получали с помощью набора QIAmp MinElute scf-DNA (Qiagen, Valencia, CA). Выделение бесклеточной ДНК проводилось согласно следующему протоколу:

1. Смешайте компоненты в пробирке объемом 5 мл и инкубируйте в течение 10 минут при комнатной температуре на ротаторе.

2. Кратковременно центрифугируйте (30 с при  $200\times g$ ), чтобы удалить раствор в колпачке.

3. Поместите пробирку с раствором магнитных частиц в магнитный штатив для пробирок объемом 5 мл. Дайте постоять 4 минуты, пока раствор не станет прозрачным. Отберите супернатант.

4. Снимите пробирку с магнитного штатива и добавьте 200 мкл буфера для элюирования магнитных частиц (Bead Elution Buffer). Перемешайте на вортексе, чтобы повторно собрать магнитные частицы, и смыть остатки магнитных частиц со стенки пробирки. Перенесите смесь в пробирку для элюирования магнитных частиц (Bead Elution Tube). Инкубируйте в течение 5 минут на шейкере при комнатной температуре и 300 об / мин.

5. Поместите пробирку для элюирования магнитных частиц (Bead Elution Tube), содержащую раствор, в магнитный штатив для пробирок объемом 2 мл. Дайте постоять 5 минут, пока раствор не станет прозрачным.

6. Перелейте супернатант в новую пробирку для элюирования магнитных частиц (new Bead Elution Tube). Добавьте 300 мкл буфера ACB и перемешайте на вортексе. Немного центрифугируйте пробирку, чтобы удалить капли с внутренней стороны крышки.

7. Перелейте смесь супернатанта и буфера ACB из шага 6 в колонку QIAamp UCP MinElute и центрифугируйте в течение 1 мин при 6000×g. Поместите колонку QIAamp UCP MinElute в чистую пробирку на 2 мл.

8. Добавьте 500 мкл буфера ACW2 в колонку QIAamp UCP MinElute и центрифугируйте в течение 1 минуты при 6000×g. Поместите колонку QIAamp UCP MinElute в чистую пробирку для сбора 2 мл.

9. Центрифугируйте на полной скорости (20 000×g; 14 000 об / мин) в течение 3 мин.

10. Поместите колонку QIAamp UCP MinElute в чистую пробирку для элюирования объемом 1,5 мл (1.5 ml elution tube). Откройте крышку и инкубируйте пробирку с колонкой в шейкере для микроцентрифужных пробирок при 56°C в течение 3 минут, чтобы полностью высушить мембрану.

11. Осторожно добавьте 50 мкл dH<sub>2</sub>O в центр мембраны. Закройте крышку и инкубируйте при комнатной температуре в течение 1 минуты. Центрифугируйте на полной скорости (20 000×g; 14 000 об / мин) в течение 1 минуты для элюирования нуклеиновых кислот.

12. Весь элюат снова перенесите на колонку и центрифугируйте на полной скорости (20 000×g; 14 000 об / мин) в течение 1 минуты для повышения концентрации образца.

#### **2.4 Измерение концентрации cf-DNA**

Концентрацию cf-DNA измеряли на Qubit 3.0 (Invitrogene) с помощью набора реагентов Quant-iT™ dsDNA HS Assay Kit.

Измерение концентрации cf-DNA производилось согласно методике:

1. Разморозьте все реагенты при комнатной температуре.
2. Приготовьте рабочую смесь: 1×n мкл реагента + 199×n мкл буфера
3. Добавьте в пробирки:
  - а) для стандартов 190 мкл рабочей смеси + 10 мкл стандарта;
  - б) для исследуемых образцов: 199-180 мкл рабочей смеси + 1-20 мкл ДНК.
4. Вortexируйте 2-3 сек, чтобы сбросить капли.
5. Инкубируйте 2 мин.
6. Включите Qubit в сеть. Если прибор находится в спящем режиме, нажмите любую кнопку для перехода в рабочий режим.
7. Выберите вид анализа (dsDNA HS Assay), используя кнопки ↑ и ↓. Нажмите GO.
8. Произведите калибровку:
  - а) вставьте Стандарт №1, нажмите GO;
  - б) вставьте Стандарт №2, нажмите GO.
9. Вставьте исследуемую пробу, нажмите GO. На экране появится число.
10. Рассчитайте концентрацию ДНК в исходном образце: выберите Calculate sample concentration используя кнопки ↑ и ↓, нажмите GO.
11. Запишите результат.
12. Уберите исследуемую пробу из прибора, вставьте следующую и нажмите GO.

## 2.5 Постановка ddPCR

Мультиплексная Taqman система включала участки гена *SRY* (ампликон длиной 84 bp) для оценки наличия мужской донорской cf-DNA у женщин-реципиентов и гена *RPP30* для оценки общей cf-DNA (таблица 1).

Таблица 1 – Последовательности праймеров и зондов

Ген	Последовательность 5'-3'
SRY-F	CGCTTAACATAGCAGAAGCA
SRY-R	AGTTTCGAACTCTGGCACCT
SRY- probe	FAM-TGTCGCACTCTCCTTGTTTTTGACA-BHQ1

Реакционная смесь объемом 20 мкл включала 10 мкл 2x ddPCR Supermix for Probes (No dUTP) (Bio-Rad), по 1 мкл 20x смеси праймеры/зонд (финальная концентрация 900нМ/250нМ) и 8 мкл cf-DNA. Цифровую ПЦР проводили с помощью системы QX200 (Bio-Rad) с предварительной ручной генерацией капель. Амплификацию проводили на термоциклере C1000 (Bio-Rad) по следующей программе: денатурация при 95°C в течение 3 минут, затем 40 циклов при 94°C в течение 30 секунд, 58°C в течение 1 минуты; деактивация фермента при 98°C в течение 10 минут и охлаждение при 4°C в течение 15 минут. Результаты анализировали в программе QuantaSoft Analysis Pro (Bio-Rad).

## 2.6 Анализ биохимических показателей

Концентрацию сывороточного креатинина и С-реактивного белка определяли на автоматическом биохимическом анализаторе AU480 (Beckman Coulter, США) с помощью набора реагентов «Creatinine» и «C-reactive protein» (Beckman Coulter, США) в соответствии с инструкцией производителя.

## 2.7 Выделение геномной ДНК

ДНК выделяли стандартным методом с использованием набора «ДНК-Сорб-В» (ИнтерЛабСервис, Москва). Принцип метода основан на том, что исследуемый образец обрабатывается лизирующим раствором. В результате

происходит деструкция клеточных мембран, биополимерных комплексов и высвобождение ДНК. К лизирующему образцу добавляли сорбент.

Далее растворенная ДНК в присутствии лизирующего раствора связывается с частицами сорбента, в то время как другие компоненты лизированного биологического материала остаются в растворе и удаляются при осаждении сорбента центрифугированием и его последующей отмывке. При добавлении буфера для элюции к сорбенту происходит переход ДНК с поверхности сорбента в раствор, который отделяется от частичек сорбента центрифугированием.

В результате указанной процедуры получается высокоочищенный препарат ДНК, свободный от ингибиторов реакции амплификации, что обеспечивает высокую аналитическую чувствительность ПЦР-исследования.

Выделение ДНК с использованием набора «ДНК-Сорб-В» осуществляли по следующей методике:

1. В 1,5 мл пробирку типа Eppendorf добавить по 1 мл гемолитика. Затем внести в пробирку с гемолитиком 250 мкл исследуемой цельной крови и перемешать на вортексе.
2. Оставить пробирку при комнатной температуре на 5 мин, еще раз перемешать на вортексе и оставить еще на 5 мин.
3. Центрифугировать пробирку на микроцентрифуге при 8 тыс об/мин в течение 2 мин. Отобрать надосадочную жидкость вакуумным отсасывателем, не задевая осадка.
4. Внести в пробирку 300 мкл лизирующего раствора. Пробу тщательно перемешать на вортексе и прогреть 5 мин при температуре 65 °С. Процентрифугировать 5 с при 5 тыс об/мин на микроцентрифуге.
5. Добавить в пробирку 25 мкл ресуспендированного сорбента универсального. Перемешать на вортексе, поставить в штатив на 2 мин, еще раз перемешать и оставить в штативе на 5 мин.

6. Осадить сорбент универсальный в пробирке центрифугированием при 5 тыс об/мин в течение 30 с. Удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель.

7. Добавить в пробу по 300 мкл раствора для отмывки 1, перемешать на вортексе. Осадить сорбент универсальный центрифугированием при 5 тыс об/мин на микроцентрифуге в течение 30 с. Удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель.

8. Добавить в пробирку 500 мкл раствора для отмывки 2, перемешать на вортексе, процентрифугировать 30 с при 10 тыс об/мин на микроцентрифуге. Удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель.

9. Повторить процедуру отмывки, следуя пункту 8, удалить надосадочную жидкость полностью.

10. Поместить пробирку в термостат при температуре 65°C на 5-10 мин для подсушивания сорбента универсального. При этом крышка пробирки должна быть открыта.

11. В пробирку добавить 50 мкл TE-буфера для элюции ДНК. Перемешать на вортексе. Поместить в термостат при температуре 65°C на 5мин, периодически встряхивая на вортексе.

12. Процентрифугировать пробирку при 13 тыс об/мин в течение 1 мин на микроцентрифуге. Надосадочная жидкость содержит очищенную ДНК.

## **2.8 Анализ SNP**

TaqMan-ПЦР проводили с использованием набора реагентов для проведения ПЦР-РВ «Синтол» (Россия) в присутствии флуоресцирующего зонда. Количество реагентов, вносимых в одну пробу, представлено в таблице 2.



Таблица 1 – количество реагентов на одну пробу ТаqMan-ПЦР

Реагенты	Количество на одну пробу, мкл
H <sub>2</sub> O	12,75
dNTPs	2,5
10x ПЦР буфер Б	2,5
MgCl <sub>2</sub>	2,5
Смесь праймеров и зондов	2,5
ДНК-полимераза	0,25
Образец ДНК	2

ТаqMan-ПЦР проводилась на приборе CFX96 (Bio-Rad, США) по следующей программе, представленной на рисунке 4.

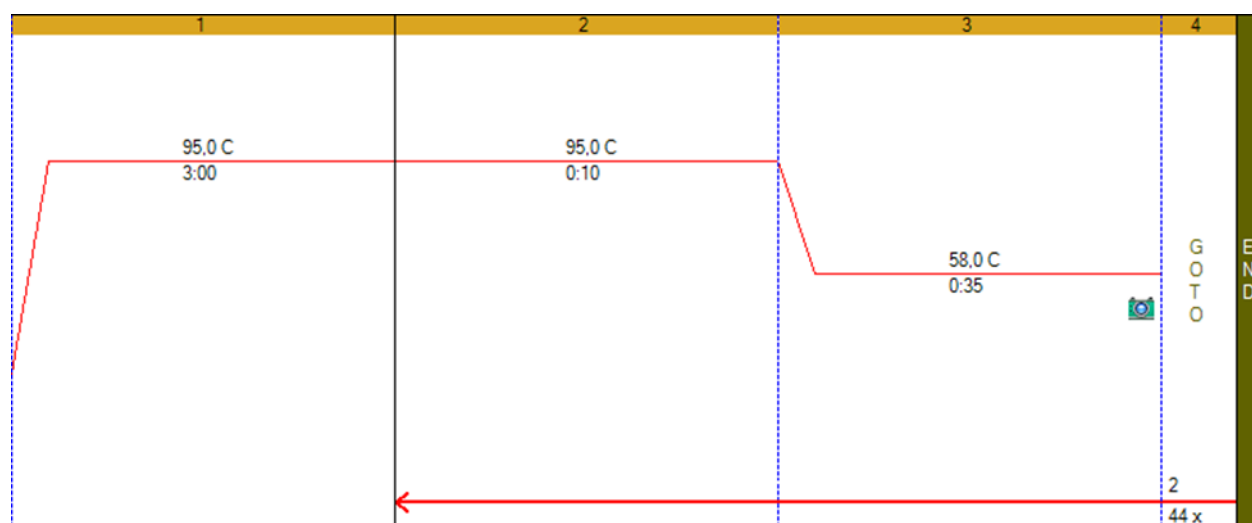


Рисунок 4 – Программа амплификации ТаqMan-ПЦР

Приготовленную общую смесь раскапывали по 23 мкл в каждую пробирку, после чего в пробирки вносили 2 мкл образцов ДНК. Пробирки центрифугировали на микроцентрифуге для сброса капель, далее помещали в прибор для амплификации.

В качестве генетических маркеров были апробированы варианты SNPs, предложенные коллегами из лаборатории фармакогеномики Института Химической Биологии и Фундаментальной Медицины СО РАН г. Новосибирск (Табл. 3).

Таблица 3 – Список праймеров использованных для генотипирования

<b>№</b>	<b>Название праймеров</b>	<b>№</b>	<b>Название праймеров</b>	<b>№</b>	<b>Название праймеров</b>
1	FX	11	FX	21	Gpla
2	VEGF 2019963	12	AMH 1040 7022	22	Hueх
3	TEX 15	13	Tezt 100	23	CDKN 1333049
4	ESRI	14	Сур 19	24	CDCA4 7451008
5	Pzac 49	15	OGGI	25	GNB3
6	Proc 25	16	Fut	26	Сур    B2
7	MnSod	17	P53	27	DARC 3845624
8	FGG	18	ABO 643434	28	TERT 669
9	Stxbp5	19	ILIB	29	917997 F/N
10	СурIBI	20	IL6 796		

## **РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**

Из текста магистерской диссертации изъятые результаты интеллектуальной деятельности, которые имеют потенциальную коммерческую научную ценность в силу неизвестности их третьим лицам.

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

1. Подобраны генетические маркеры для идентификации cf-DNA в плазме реципиента.
2. Разработана тест-система с использованием цифровой ПЦР для количественного определения cf-DNA в плазме реципиента.
3. Результаты количественного определения cf-DNA в плазме реципиентов-женщин в динамике послеоперационного периода наблюдения сопоставимы с такими биохимическими показателями, как креатинин и С-реактивный белок.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

cf-DNA – бесклеточная ДНК

dd-cfDNA – бесклеточная ДНК донора

ГИО – гены иммунного ответа

HLA – система главного комплекса гистосовместимости

TCMR – Т-клеточно-опосредованное отторжение

ABMR – антитело-опосредованное отторжение

TCR – Т-клеточный рецептор

KDIGO – kidney Disease Improving Global Outcomes

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ddPCR – капельная цифровая ПЦР

NGS – секвенирование следующего поколения

SNP – однонуклеотидный полиморфизм

*SRY* – sex-determining region Y protein

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Wolfe R. A. et al. Comparison of mortality in all patients on dialysis, patients on dialysis awaiting transplantation, and recipients of a first cadaveric transplant //New England journal of medicine. – 1999. – Т. 341. – №. 23. – p. 1725-1730.
2. Meier- Kriesche H. U. et al. Kidney transplantation halts cardiovascular disease progression in patients with end- stage renal disease //American Journal of Transplantation. – 2004. – Т. 4. – №. 10. – p. 1662-1668.
3. Rao P. S. et al. Survival on dialysis post–kidney transplant failure: results from the Scientific Registry of Transplant Recipients //American Journal of Kidney Diseases. – 2007. – Т. 49. – №. 2. – p. 294-300.
4. Schinstock C. et al. Kidney transplant with low levels of DSA or low positive B-flow crossmatch: an underappreciated option for highly-sensitized transplant candidates //Transplantation. – 2017. – Т. 101. – №. 10. – p. 2429.
5. Cheungpasitporn W. et al. De novo donor specific antibody following BK nephropathy: The incidence and association with antibody mediated rejection //Clinical Transplantation. – 2018. – Т. 32. – №. 3. – p. e13194.
6. Leeaphorn N. et al. Outcomes of kidney retransplantation after graft loss as a result of BK virus nephropathy in the era of newer immunosuppressant agents //American Journal of Transplantation. – 2020. – Т. 20. – №. 5. – p. 1334-1340.
7. Bloom R. D. et al. Cell-free DNA and active rejection in kidney allografts //Journal of the American Society of Nephrology. – 2017. – Т. 28. – №. 7. – p. 2221-2232.
8. Gielis E. M. et al. Cell- free DNA: an upcoming biomarker in transplantation //American journal of transplantation. – 2015. – Т. 15. – №. 10. – p. 2541-2551.

9. Pattar S. K., Greenway S. C. Circulating nucleic acids as biomarkers for allograft injury after solid organ transplantation: current state-of-the-art //Transplant Research and Risk Management. – 2019. – T. 11. – p. 17-27.
10. García Moreira V. et al. Cell-free DNA as a noninvasive acute rejection marker in renal transplantation //Clinical chemistry. – 2009. – T. 55. – №. 11. – p. 1958-1966.
11. Lichtenstein A. V. et al. Circulating nucleic acids and apoptosis //Annals of the New York Academy of Sciences. – 2001. – T. 945. – №. 1. – p. 239-249.
12. Jahr S. et al. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells //Cancer research. – 2001. – T. 61. – №. 4. – p. 1659-1665.
13. Stroun M. et al. About the possible origin and mechanism of circulating DNA: Apoptosis and active DNA release //Clinica chimica acta. – 2001. – T. 313. – №. 1-2. – p. 139-142.
14. Brinkmann V. et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria //science. – 2004. – T. 303. – №. 5663. – p. 1532-1535.
15. Beck J. et al. Donor-derived cell-free DNA is a novel universal biomarker for allograft rejection in solid organ transplantation //Transplantation proceedings. – Elsevier, 2015. – T. 47. – №. 8. – p. 2400-2403.
16. Sigdel T. K. et al. A rapid noninvasive assay for the detection of renal transplant injury //Transplantation. – 2013. – T. 96. – №. 1. – p. 97.
17. Bromberg J. S. et al. Biological variation of donor-derived cell-free DNA in renal transplant recipients: clinical implications //The journal of applied laboratory medicine. – 2017. – T. 2. – №. 3. – p. 309-321.
18. Altuğ Y. et al. Analytical validation of a single-nucleotide polymorphism-based donor-derived cell-free DNA assay for detecting rejection in kidney transplant patients //Transplantation. – 2019. – T. 103. – №. 12. – p. 2657.

19. Алешинская, А. Е. Трансплантация органов и тканей / А. Е. Алешинская, Я. С. Барабанщикова, В. Н. Гужова //МЦНП «Новая наука». – 2020. – С. 173-182.
20. Будчанов, Ю.И. Трансплантационная иммунология //Учебно-методическое пособие для студентов. – 2012.
21. Профессиональная ассоциация: Общероссийская общественная организация трансплантологов «Российское трансплантологическое общество». Национальные клинические рекомендации: трансплантация почки. – 2016.
22. Алексеев, Л.П. Иммуногенетика человека и клиническая трансплантация органов в России / Л.П. Алексеев, Р.М. Хаитов, А.Г. Долбин [и др.] //Иммунология. – 2015. - №2. – С. 76-89.
23. Парыгина, О. А. Иммуногенетические особенности реципиентов и доноров солидных органов в Красноярском крае и республике Хакасия / О. А. Парыгина, С. В. Верещагина, Т.Н. Субботина //Молекулярная диагностика. – 2019. – Т. 2. – С. 97-98.
24. Naesens M. et al. The histology of kidney transplant failure: a long-term follow-up study //Transplantation. – 2014. – Т. 98. – №. 4. – p. 427-435.
25. Eikmans M. et al. Non-invasive biomarkers of acute rejection in kidney transplantation: novel targets and strategies //Frontiers in medicine. – 2019. – p. 358.
26. Nankivell B. J., Alexander S. I. Rejection of the kidney allograft //New England Journal of Medicine. – 2010. – Т. 363. – №. 15. – p. 1451-1462.
27. Zuidwijk K. et al. Increased influx of myeloid dendritic cells during acute rejection is associated with interstitial fibrosis and tubular atrophy and predicts poor outcome //Kidney international. – 2012. – Т. 81. – №. 1. – p. 64-75.
28. Wehmeier C. et al. Acute rejection phenotypes in the current era of immunosuppression: a single-center analysis //Transplantation Direct. – 2017. – Т. 3. – №. 3.



29. Colvin R. B. Antibody-mediated renal allograft rejection: diagnosis and pathogenesis //Journal of the American Society of Nephrology. – 2007. – T. 18. – №. 4. – p. 1046-1056.
30. Josephson M. A. Monitoring and managing graft health in the kidney transplant recipient //Clinical Journal of the American Society of Nephrology. – 2011. – T. 6. – №. 7. – p. 1774-1780.
31. Popper H., Mandel E. Filtrations and reabsorptions leitung in der nierenpathologie //Erg Inn Med Kinder. – 1937. – T. 53. – p. 685-95.
32. Perrone R. D., Madias N. E., Levey A. S. Serum creatinine as an index of renal function: new insights into old concepts //Clinical chemistry. – 1992. – T. 38. – №. 10. – p. 1933-1953.
33. Shemesh O. et al. Limitations of creatinine as a filtration marker in glomerulopathic patients //Kidney international. – 1985. – T. 28. – №. 5. – p. 830-838.
34. Horber F. F., Scheidegger J., Frey F. J. Overestimation of renal function in glucocorticosteroid treated patients //European journal of clinical pharmacology. – 1985. – T. 28. – №. 5. – p. 537-541.
35. El Haggan W. et al. The evolution of weight and body composition in renal transplant recipients: two-year longitudinal study //Transplantation proceedings. – Elsevier, 2006. – T. 38. – №. 10. – p. 3517-3519.
36. Berglund F., Killander J., Pompeius R. Effect of trimethoprim-sulfamethoxazole on the renal excretion of creatinine in man //The Journal of urology. – 1975. – T. 114. – №. 6. – p. 802-808.
37. Kasiske B. L. et al. Recommendations for the outpatient surveillance of renal transplant recipients //Journal of the American Society of Nephrology. – 2000. – T. 11. – №. suppl 1. – p. S1-S86.
38. Ojo A. Assessing post transplant renal function //Medscape Transplant. – 2004. – T. 5. – №. 2. – p. 1-4.

39. Hariharan S. et al. Post-transplant renal function in the first year predicts long-term kidney transplant survival //Kidney international. – 2002. – T. 62. – №. 1. – p. 311-318.
40. Loupy A. et al. The Banff 2015 kidney meeting report: current challenges in rejection classification and prospects for adopting molecular pathology. – 2017.
41. Patel R., Terasaki P. I. Significance of the positive crossmatch test in kidney transplantation //New England Journal of Medicine. – 1969. – T. 280. – №. 14. – p. 735-739.
42. Nankivell B. J., Chapman J. R. The significance of subclinical rejection and the value of protocol biopsies //American Journal of Transplantation. – 2006. – T. 6. – №. 9. – p. 2006-2012.
43. Menon M. C., Murphy B., Heeger P. S. Moving biomarkers toward clinical implementation in kidney transplantation //Journal of the American Society of Nephrology. – 2017. – T. 28. – №. 3. – p. 735-747.
44. van den Boogaardt D. E. M. et al. The ratio of interferon- $\gamma$  and interleukin-10 producing donor-specific cells as an in vitro monitoring tool for renal transplant patients //Transplantation. – 2006. – T. 82. – №. 6. – p. 844-848.
45. Han W. K. et al. Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1): a novel biomarker for human renal proximal tubule injury //Kidney international. – 2002. – T. 62. – №. 1. – p. 237-244.
46. Singer E. et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin: pathophysiology and clinical applications //Acta physiologica. – 2013. – T. 207. – №. 4. – p. 663-672.
47. Sherwood, K. Characteristics, properties, and potential applications of circulating cell-free DNA in clinical diagnostics: a focus on transplantation / K. Sherwood, E. T. Weimer. //Journal of Immunological Methods. – 2018. – V. 463. – p. 27-38.

48. Knight, S. R. Donor-specific cell-free DNA as a biomarker in solid organ transplantation. A systematic review / S. R. Knight, A. Thorne, M. L. L. Faro //Transplantation. – 2019. – V. 103, I. 2. – p. 273-283.
49. Burnham, P. Myriad Applications of Circulating Cell-Free DNA in Precision Organ Transplant Monitoring / P. Burnham, K. Khush, I. De Vlaminc. //AnnalsATS. – 2016 – V.14, I. 3 – p. 237-241.
50. Танкович, С.Н. Циркулирующие ДНК крови и их использование в медицинской диагностике. / С. Н. Танкович, В. В. Власов, П. П. Лактионов. //Молекулярная биология. – 2008. – Т. 42, №1. – С. 12-23.
51. Laktionov P. P. et al. Cell- surface- bound nucleic acids: free and cell- surface- bound nucleic acids in blood of healthy donors and breast cancer patients //Annals of the New York Academy of Sciences. – 2004. – Т. 1022. – №. 1. – p. 221-227.
52. Ковалева, Ю.А. Определение внеклеточных ДНК крови – клиническое и диагностическое значение. / Ю. А. Ковалева, А. А. Хасанов, Л. М. Сигнатулина. //Практическая медицина. – 2010. – Т. 43. – С. 63-66.
53. Beck, J. Early detection of rejection after heart transplantation by a universal digital PCR method. / J. Beck, L. Reinhard, M. Oellerich, [et al.] //Clinical Chemistry. – 2015. – V.61 – p. 180.
54. Zou, J, Duffy B, Slade M, et al. Rapid detection of donor cell free DNA in lung transplant recipients with rejections using donor-recipient HLA mismatch. / J. Zou, B. Duffy, M. Slade, [et al.] //Human Immunology – 2017. – V. 78. – p. 342–349.
55. Agbor-Enoh, S. Applying rigor and reproducibility standards to assay donor-derived cell-free DNA as a non-invasive method for detection of acute rejection and graft injury after heart transplantation. //J Heart Lung Transplant. – 2017. – V. 36. – p. 1004–1012

56. Beck, J. A Universal Droplet Digital PCR Approach for Monitoring of Graft Health After Transplantation Using a Preselected SNP Set. / J. Beck, M. Oellerich, E. Schütz //Methods in Molecular Biology. – 2018. - V. 1768. – p. 335–348
57. Macher, H. C. Monitoring of transplanted liver health by quantification of organ-specific genomic marker in circulating DNA from receptor //PloS one. – 2014. – V. 9, №. 12. – p. e113987.
58. Cheryl S. Rosenfeld. Brain Sexual Differentiation and Requirement of SRY: Why or Why Not? //Front Neurosci. – 2017 – V.16. – I. 11. – p. 632.
59. Wallis, M. C., Waters, P. D., Delbridge, M. L., Kirby, et al. Sex determination in platypus and echidna: autosomal location of SOX3 confirms the absence of SRY from monotremes. //Chromosome Res. – 2007. – V. 15. – p. 949–959
60. Sekido, R., and Lovell-Badge, R. Sex determination involves synergistic action of SRY and SF1 on a specific Sox9 enhancer //Nature – 2008. – V. 453. – p. 930–934.
- 61 Johnen H. et al. Gadd45g is essential for primary sex determination, male fertility and testis development //PLoS One. – 2013. – T. 8. – №. 3. – p. e58751.
62. Benjamin J. Hindson, Kevin D. Ness, Donald A. Masquelier. High-Throughput Droplet Digital PCR System for Absolute Quantitation of DNA Copy Number //Analytical chemistry. – 2011 – V. 83. – p. 8604–8610.
63. Хьюгет Дж., Вейл А. Цифровая ПЦР как новая технология и ее потенциальный вклад в молекулярную диагностику //Клиническая лабораторная диагностика. – 2014 – Т. 59. – № 11. – С. 6-8.

Министерство науки и высшего образования РФ  
Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение высшего образования  
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии  
Кафедра геномики и биоинформатики

УТВЕРЖДАЮ

Заведующая кафедрой

 Н.С. Анисимов

подпись

инициалы, фамилия

«24» июня 2022 г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

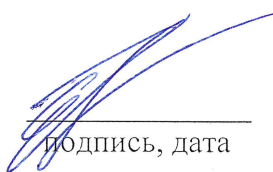
Использование молекулярно-генетических маркеров для оценки  
посттрансплантационных осложнений

тема

06.04.01 – Биология

06.04.01.06 – Геномика и биоинформатика

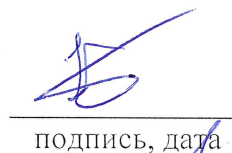
Руководитель

  
подпись, дата

доцент, канд. биол. наук  
должность, ученая степень

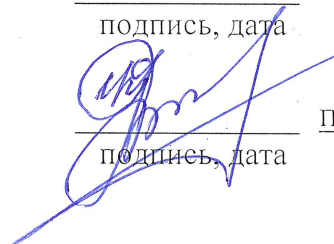
Т.Н. Субботина

Выпускник

  
подпись, дата

Д.В. Курочкин

Рецензент

  
подпись, дата

профессор, д-р. мед. наук  
должность, ученая степень

Ю.И. Гринштейн

Красноярск 2022